(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0004776
(43) 공개일자 2025년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/20 (2017.01) *A61K 47/22* (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/39591 (2013.01)
A61K 47/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7037663
(22) 출원일자(국제) 2023년04월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월12일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/059468
(87) 국제공개번호 WO 2023/198727
국제공개일자 2023년10월19일
(30) 우선권주장
63/330,748 2022년04월13일 미국(US)

(71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
(72) 발명자
두뵈우프 제레미 장-피에르
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
모익스 엘렌 도로시
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

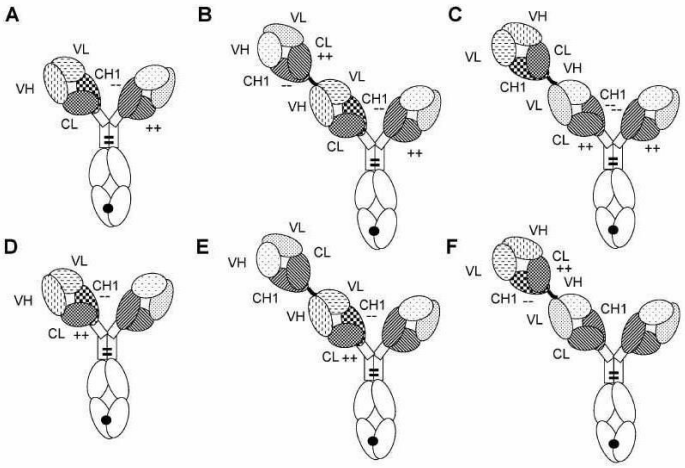
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 **항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 약학 조성물 및 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 약학 조성물 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 47/22 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자
라부리 사티아 크리슈나 키쇼어
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
쉰하머 카린
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
폴라스 일로나 엘리자베스
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
파스트 라르스 요나스
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
이른가르틴거 마이케
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
프린츠 미리암
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
퀴벳 니 보일론 애들린 발렌타인
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게

명 세 서

청구범위

청구항 1

약 1 내지 25 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체;

약 10 내지 50 mM의 완충제;

약 ≥200 mM의 등장화제;

약 0 내지 15 mM의 메티오닌; 및

약 ≥ 0.2 mg/ml의 계면활성제

를 포함하고, pH가 약 5.0 내지 약 6.0 범위인, 액상 약학 조성물로서,

상기 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 다음을 포함하는, 액상 약학 조성물:

a) CD20에 특이적으로 결합하는, 다음을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

(i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

(ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

(iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

(i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

(ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

(iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

b) CD3에 특이적으로 결합하는, 다음을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

(i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

(ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

(iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

(i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

(ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

(iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 농도가 약 1 내지 5 mg/ml 범위인, 액상 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 농도가 약 0.9 내지 1.1 mg/ml 범위인, 액상 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 농도가 약 1 mg/ml인, 액상 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 다음을 포함하는, 액상 약학 조성물:

a) CD20에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및

b) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 다음을 포함하는, 액상 약학 조성물:

a) CD3, 특히 CD3 엡실론에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 분자로서; Fab 경쇄와 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되는, 제1 Fab 분자;

b) CD20에 특이적으로 결합하는 제2 Fab 및 제3 Fab 분자로서, 이때 제2 Fab 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서 위치 124의 아미노산이 리신(K)(Kabat에 따른 넘버링)으로 치환되고 위치 123의 아미노산이 리신(K) 또는 아르기닌(R), 특히 아르기닌(R)(Kabat에 따른 넘버링)으로 치환되고, 제2 Fab 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산이 글루탐산(E)(EU 넘버링)으로 치환되고 위치 213의 아미노산이 글루탐산(E)(EU 넘버링)으로 치환되는, 제2 Fab 및 제3 Fab 분자; 및

c) 안정적으로 결합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 글로피타맙인, 액상 약학 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 완충제는 히스티딘 완충액, 선택적으로 히스티딘 HCl 완충액인, 액상 약학 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 완충제는 농도가 약 15 내지 25 mM인, 액상 약학 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 완충제는 농도가 약 20 mM인, 액상 약학 조성물.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 완충제는 약 5.2 내지 약 5.8의 pH를 제공하는, 액상 약학 조성물.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 등장화제는 염, 당 및 아미노산의 군에서 선택되는, 액상 약학 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 등장화제는 수크로스 또는 염화나트륨인, 액상 약학 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 등장화제는 약 200 mM 이상 농도의 수크로스인, 액상 약학 조성물.

청구항 15

청구항 13 또는 14에 있어서, 등장화제는 약 200 mM 내지 280 mM 농도의 수크로스인, 액상 약학 조성물.

청구항 16

청구항 13 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 등장화제는 약 240 mM 농도의 수크로스인, 액상 약학 조성물.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 메티오닌은 농도가 약 5 내지 15 mM인, 액상 약학 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 메티오닌은 농도가 약 10 mM인, 액상 약학 조성물.

청구항 19

청구항 1 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 계면활성제는 농도가 약 0.2 내지 0.8 mg/ml인, 액상 약학 조성물.

청구항 20

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20 또는 폴록사머 188인, 액상 약학 조성물.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 계면활성제는 0.2 내지 0.8 mg/ml 농도의 폴리소르베이트 20인, 액상 약학 조성물.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 계면활성제는 약 0.5 mg/ml 농도의 폴리소르베이트 20인, 액상 약학 조성물.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서,

약 1 내지 5 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체;

약 15 내지 25 mM의 히스티딘 완충액;

약 200 내지 280 mM의 수크로스;

약 0 내지 15 mM의 메티오닌; 및

약 0.2 내지 0.8 mg/ml의 PS20

을 포함하고, pH가 약 5 내지 약 6인, 액상 약학 조성물.

청구항 24

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서,

약 1 mg/ml의 글로피타맙;

약 20 mM의 히스티딘 완충액;

약 240 mM의 수크로스;

약 10 mM의 메티오닌; 및

약 0.5 mg/ml의 PS20

을 포함하고, pH가 약 5.5인, 액상 약학 조성물.

청구항 25

청구항 1 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체에 대한 PS20의 몰비가 100 미만인, 액상 약학 조성물.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체에 대한 PS20의 몰비가 50 내지 100인, 액상 약학 조성물.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체에 대한 PS20의 몰비가 약 79인, 액상 약학 조성물.

청구항 28

세포 증식성 장애를 치료하는 데 유용한 약제를 제조하기 위한, 청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 따른 액상 약학 조성물의 용도.

청구항 29

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 세포 증식성 장애의 치료 또는 진행 지연을 필요로 하는 대상체에서 세포 증식성 장애를 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 데 사용하기 위한 액상 약학 조성물.

청구항 30

세포 증식성 장애의 치료 또는 진행 지연을 필요로 하는 대상체에서 세포 증식성 장애를 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법으로서, 청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 따른 액상 약학 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 31

청구항 28 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 세포 증식성 장애는 암인, 용도, 이러한 용도를 위한 액상 약학 조성물 또는 방법.

청구항 32

전술한 발명.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 약학 조성물 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생명공학 치료제 개발에 있어 가장 큰 과제 중 하나는 단백질의 안정성인데, 이는 시장에 출시되기 전 여러 가공 단계에서 유지되어야 한다. 더욱이 단백질의 안정성은 보관 도중뿐만 아니라 환자에게 투여하는 동안에도 유지되어야 한다. 치료용 항체는 대상체에게, 예를 들어, 정맥내 또는 피하 투여에 의해 투여하기 위해 수용성 담체에 제형화될 수 있다. 이러한 약학 조성물을 보관, 취급 및 투여하는 동안, 필터, 보관 용기, 튜빙, 주사기, 정맥내 주사액 백 및 기타 용기의 표면에 단백질이 흡착되는 것과 같이 분해 및 표면 흡착을 통해 발생할 수 있는 치료 항체의 손실을 완화하는 것이 필요하다. 저농도와 고농도 제형 모두 연구 개발 및 제조 과정에서 각자의 과제에 직면하게 된다. 예를 들어, 농도가 낮으면 표면 흡착에 큰 영향을 받는 반면, 농도가 높으면 점도가 높아질 수 있다.

[0003] 약학 조성물에 비교적 낮은 농도의 치료용 단백질이 포함된 경우, 이러한 요인으로 인해 단백질 손실이 급격히 증가하여 약학 조성물의 치료 효능이 감소할 수 있다.

[0004] 그러므로 해당 기술 분야에서 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 저용량 항-CD20/항-CD3 이중특이성

항체, 예를 들어, 저용량 항-CD20/항-CD3 T 세포-관여 이중특이성 항체, 예를 들어, 글로피타맙)가 안정적이고 흡착으로 인해 손실되지 않는 약학 제형을 개발해야 할 필요성이 있다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 T 세포-관여 이중특이성 항체(TCB), 예를 들어, 글로피타맙, RO7082859, 또는 RG6026)의 약학 조성물 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다. 공개된 조성물 및 관련 방법은 제형화된 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)를 낮은 농도로 전달하는 문제를 해결하여, 환자가 보관 및 투여 중에 단백질 손실이 거의 없거나 전혀 없이 의도한 용량의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)를 투여받도록 보장한다.

[0006] 한 양상에서, 본 발명은 다음을 포함하는 액상 약학 조성물을 특징으로 하며:

[0007] 약 1 내지 25 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체;

[0008] 약 10 내지 50 mM의 완충제;

[0009] 약 ≥200 mM의 등장화제;

[0010] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0011] 약 ≥ 0.2 mg/ml의 계면활성제;

[0012] pH가 약 5.0 내지 약 6.0 범위이며,

[0013] 여기서 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 다음을 포함한다:

[0014] a)다음을 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0015] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0016] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0017] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0018] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0019] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0020] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0021] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0022] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0023] b) 다음을 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0024] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0025] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0026] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0027] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

[0028] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0029] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0030] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0031] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0032] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙) 농도는 약 1 내지 5 mg/ml 범위이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙) 농도는 약 0.9-1.1 mg/ml 범위이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중

특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙) 농도는 약 1 mg/ml이다.

[0033] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 다음을 포함한다:

[0034] a) CD20에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및

[0035] b) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인.

[0036] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 다음을 포함한다:

[0037] a) CD3, 특히 CD3 엡실론에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 분자로서; Fab 경쇄와 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되는 제1 Fab 분자;

[0038] b) CD20에 특이적으로 결합하는 제2 Fab 및 제3 Fab 분자로서, 제2 Fab 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서 위치 124의 아미노산이 리신(K)(Kabat에 따른 넘버링)으로 치환되고 위치 123의 아미노산이 리신(K) 또는 아르기닌(R), 특히 아르기닌(R)(Kabat에 따른 넘버링)으로 치환되고, 제2 Fab 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산이 글루탐산(E)(EU 넘버링)으로 치환되고 위치 213의 아미노산이 글루탐산(E)(EU 넘버링)으로 치환된 제2 Fab 및 제3 Fab 분자; 및

[0039] c) 안정적으로 결합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인.

[0040] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 글로피타맙이다.

[0041] 한 실시형태에서, 완충제는 히스티딘 완충액, 선택적으로 히스티딘 HCl 완충액이다. 한 실시형태에서, 완충제는 농도가 약 15 내지 25 mM이다. 한 실시형태에서, 완충제는 농도가 약 20 mM이다. 한 실시형태에서, 완충제는 약 5.2 내지 약 5.8의 pH를 제공한다.

[0042] 한 실시형태에서, 등장화제는 염, 당 및 아미노산의 군에서 선택된다. 한 실시형태에서, 등장화제는 수크로스 또는 염화나트륨이다. 한 실시형태에서, 등장화제는 약 200 mM 이상 농도의 수크로스이다. 한 실시형태에서, 등장화제는 약 200 mM - 280 mM 농도의 수크로스이다. 한 실시형태에서, 등장화제는 약 240 mM 농도의 수크로스이다.

[0043] 한 실시형태에서, 메티오닌은 농도가 약 5-15 mM이다.

[0044] 한 실시형태에서, 메티오닌은 농도가 약 10 mM이다. 한 실시형태에서, 계면활성제는 농도가 약 0.2-0.8 mg/ml이다. 한 실시형태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20 또는 폴록사머 188이다. 한 실시형태에서, 계면활성제는 0.2-0.8 mg/ml 농도의 폴리소르베이트 20이다. 한 실시형태에서, 계면활성제는 약 0.5 mg/ml 농도의 폴리소르베이트 20이다.

[0045] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0046] 다음을 포함하는 약 1 내지 5 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0047] a) 다음을 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0048] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0049] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0050] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0051] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0052] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0053] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0054] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0055] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0056] b) 다음을 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0057] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0058] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0059] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0060] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

[0061] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0062] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0063] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0064] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3;

[0065] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0066] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0067] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0068] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0069] pH는 약 5 내지 약 6이다.

[0070] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0071] 약 1 mg/ml의 글로피타맙;

[0072] 약 20 mM의 히스티딘 완충액;

[0073] 약 240 mM의 수크로스;

[0074] 약 10 mM의 메티오닌; 및

[0075] 약 0.5 mg/ml의 PS20,

[0076] pH는 약 5.5이다.

[0077] 한 실시형태에서 본 발명은 세포 증식성 장애를 치료하는 데 유용한 약제를 제조하기 위한, 전술한 양상 및 실시형태 중 어느 하나에 따른 액상 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0078] 또 다른 양상에서, 본 발명은 세포 증식성 장애를 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 데 사용하기 위한, 전술한 양상 및 실시형태 중 어느 하나의 약학 조성물을 특징으로 한다.

[0079] 또 다른 양상에서, 본 발명은 전술한 양상 및 실시형태 중 어느 하나의 약학 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 세포 증식성 장애를 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 데 사용하기 위한, 전술한 양상 및 실시형태 중 어느 하나의 약학 조성물을 특징으로 한다.

[0080] 특정 실시형태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.

[0081] 본 발명의 추가적인 양상은 본원에 기재된 발명과 관련이 있다.

[0082] 각각의 실시형태는 문맥상 명백히 달리 암시되지 않는 한 결합될 수 있다. 각각의 실시형태는 문맥상 명백히 달리 암시되지 않는 한, 본 발명의 각각의 양상에 적용될 수 있다.

[0083] 본 발명의 구체적인 실시형태는 이하의 특정 바람직한 실시형태 및 청구범위에 대한 보다 상세한 설명으로부터 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0084] 출원 파일에는 컬러로 완성된 하나 이상의 도면이 포함되어 있다. 색상 도면이 첨부된 본 특허 또는 특허 출원

공개본의 사본은 특허청에 요청 및 필요한 요금 지불시 제공될 것이다.

도 1A – 도 1N: 대표적인 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 구성을 보여주는 개략도.

도 2: 글로피타맙의 구조를 보여주는 개략도.

도 3: 제형 개발 GLP 독성 및 인체 연구로의 진입. F1 내지 F5 제형의 계면활성제 함량, 초기 vs. 5, 25 또는 40℃에서 6주 보관 후.

도 4A – 도 4C: 제형 개발 GLP 독성 및 인체 연구로의 진입, F1 내지 F5 제형의 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 초기 vs. 5, 25 또는 40℃에서 6주 보관 후. 도 4A: 주요 피크, 도 4B: 고분자량(HMW); 도 4C: 저분자량(LMW).

도 5A – 도 5C: 제형 개발 GLP 독성 및 인체 연구로의 진입, F1 내지 F5 제형의 이온 교환 크로마토그래피(IEC), 초기 vs. 5, 25 또는 40℃에서 6주 보관 후. 도 5A: 주요 피크, 도 5B. HMW; 도 5C. LMW.

도 6: 제형 개발 - 제형 F1에 대한 최대 84주까지의 분석 결과. F1 = 5 mg/ml RO7022859 (즉, 글로피타맙), 20 mM 히스티딘 HCl pH 5.5, 240 mM의 수크로스, 10 mM의 메티오닌, 0.05% (w/v) 폴리소르베이트 20.

도 7A – 도 7B: 제형 개발 GLP 독성 및 인체 연구로의 진입, 제형 F1 내지 F5의 huCD20 결합, 초기 vs. 5, 25 또는 40℃에서 3주 및 6주 보관 후(도 7A) 및 제형 F1 내지 F5의 huCD3 결합, 초기 vs. 5, 25 또는 40℃에서 3주 및 6주 보관 후(도 7B).

도 8A – 도 8B: 3상 및 상업적 제형화를 위한 개발 연구. 5℃에서 104주 보관 후 단백질 농도에 따른 글로피타맙 크기 배제(SE)-HPLC HMWS%(도 8A) 및 이온 교환(IE)-HPLC 산성 영역%(도 8B).

도 9A – 도 9B: 3상 및 상업적 제형화를 위한 개발 연구. 40℃에서 6주 보관 후 pH 및 안정화제(메티오닌) 첨가에 따른 글로피타맙 SE-HPLC HMWS%(도 9A) 및 산성 영역%(도 9B)

도 10: 3상 및 상업적 제형화를 위한 개발 연구. 25℃에서 26주 보관 후 등장화제에 따른 글로피타맙 SE-HPLC HMWS%(눈에 보이는 입자 형성 포함) 및 IE-HPLC 산성 영역%.

도 11A – 도 11B: 3상 및 상업적 제형화를 위한 개발 연구. 25℃에서 7일간 진탕 후 계면활성제에 따른 글로피타맙 SE-HPLC HMWS%(눈에 보이는 입자 형성을 포함)(도 11A) 및 IE-HPLC 산성 영역%(도 11B)

도 12: 3상 및 상업적 제형화를 위한 개발 연구. 초기 및 5° C에서 104주 보관 후 단백질 농도에 따른 글로피타맙 PS20 함량[mg/ml] 및 눈에 보이는 입자 형성.

도 13: 장기 안정성 데이터: 안정성에 대한 실시예의 글로피타맙 DP 배치의 PS20 함량(2-8℃에서 보관).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 본 발명은 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 약학 조성물 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다. 공개된 조성물 및 관련 방법은 제형화된 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체를 낮은 농도로 전달하는 문제를 해결하여, 환자가 보관 및 투여 중에 이중특이성 항체 손실이 거의 없거나 전혀 없이 의도한 용량의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체를 투여받도록 보장한다.

[0086] **I. 일반적인 기술**

[0087] 본 발명의 실시는 달리 지시되지 않는 한, 해당 분야의 기술에 속하는 분자 생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술들은 문헌들, 예를 들어, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook 외, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel 외, eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis 외, ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas 외, 2001)에 상세히 설명되어 있다.

[0088] **II. 정의**

[0089] 본원에서 사용되는 용어는 달리 정의되지 않는 한, 해당 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 용어를 따른다.

[0090] 본원에서 사용되는 용어 "분화 클러스터 20" 또는 "CD20"은, 달리 지시가 없는 한, 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함한 임의의 척추동물 출처의 천연 CD20을 지칭한다. CD20(B-림프구 항원 CD20, B-림프구 표면 항원 B1, Leu-16, Bp35, BM5 및 LF5로도 공지됨; 인간 단백질은 UniProt 데이터베이스 항목 P11836에 특성화되어 있음)은 pre-B 및 성숙한 B 림프구에서 발현되는 약 35kD의 분자량을 갖는 소수성 막횡단 단백질이다(Valentine, M.A. 외, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 11282-11287; Tedder, T.F., 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1988) 208-212; Stamenkovic, I., 외, *J. Exp. Med.* 167 (1988) 1975-1980; Einfeld, D.A., 외, *EMBO J.* 7 (1988) 711-717; Tedder, T.F., 외, *J. Immunol.* 142 (1989) 2560-2568). 이에 상응하는 인간 유전자는 막-스패닝 4-도메인, 서브패밀리 A, 구성원 1 (Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1)로서, MS4A1로도 공지되어 있다. 이 유전자는 막-스패닝 4A 유전자 패밀리의 구성원을 인코딩한다. 이 초기 단백질 패밀리의 구성원은 공통적인 구조적 특성 및 유사한 인트론/엑손 스플라이스 경계를 특징으로 하며 조혈 세포 및 비림프 조직들 사이에서 독특한 발현 패턴을 나타낸다. 이 유전자는 B 세포의 형질 세포로의 발달 및 분화에 일정한 역할을 하는 B 림프구 표면 분자를 인코딩한다. 이 패밀리 구성원은 패밀리 구성원들의 클러스터에서 11q12에 국재화되어 있다. 이 용어는 "전장"의, 비가공 CD20, 뿐만 아니라 세포에서 가공된 임의의 형태의 CD20을 포함한다. 이 용어는 또한 CD20의 자연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 이 유전자의 선택적 스플라이싱은 동일한 단백질을 인코딩하는 2개의 전사체 변이체를 생성한다. 한 실시형태에서, CD20은 인간 CD20이다.

[0091] 용어 "항-CD20 항체" 및 "CD20에 결합하는 항체"는 항체가 CD20을 표적하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 하기에 충분한 친화도로 CD20에 결합할 수 있는 항체를 나타낸다. 한 실시형태에서, 관련없는, 비-CD20 단백질에 항-CD20 항체의 결합 정도는, 예를 들면, 방사면역검정(RIA)으로 측정한 CD20에 대한 항체 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시형태들에서, CD20에 결합하는 항체는 ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM (예를 들어, 10^{-8} M 또는 그 미만, 예를 들어, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 특정 실시형태들에 있어서, 항-CD20 항체는 상이한 종의 CD20에서 보존되는 CD20의 에피토프에 결합한다.

[0092] "2형 항-CD20 항체"는 Cragg 외, Blood 103 (2004) 2738-2743; Cragg 외, Blood 101 (2003) 1045-1052, Klein 외, mAbs 5 (2013), 22-33에 기재되어 있는 2형 항-CD20 항체들의 결합 성질 및 생물학적 활성을 가지는 항-CD20 항체를 의미하며, 하기 표 1에 요약되어 있다.

[0093] **표 1. 1형 및 2형 항-CD20 항체들의 특성**

1형 항-CD20 항체	2형 항-CD20 항체
분류 1 CD20 에피토프에 결합	분류 2 CD20 에피토프에 결합
CD20을 지질 뗏목에 국재화	CD20 을 지질 뗏목에 국재화하지 않음
높은 CDC *	낮은 CDC *
ADCC 활성*	ADCC 활성*
B 세포에 대한 완전한 결합 능력	B 세포에 대한 대략 절반의 결합 능력
약한 동형 응집	동형 응집
낮은 세포 사멸 유도	강력한 세포 사멸 유도

[0094]

[0095] * IgG_1 이소형인 경우

[0096] 2형 항-CD20 항체의 예에는 예를 들어, 오비누투주맙(GA101), 토시투무맙(B1), 인간화 B-Ly1 항체 IgG1 (WO 2005/044859에 개시된 키메라 인간화 IgG1 항체), 11B8 IgG1 (WO 2004/035607에 개시됨), 및 AT80 IgG1이 포함된다.

[0097] 1형 항-CD20 항체의 예는, 예를 들어, 리툭시맙, 오파투무맙, 벨투주맙, 오카라투주맙, 오크렐리주맙, PRO131921, 유블리툭시맙, HI47 IgG3(ECACC, 하이브리도마), 2C6 IgG1(WO 2005/103081에 개시), 2F2 IgG1(WO 2004/035607 및 WO 2005/103081에 개시) 및 2H7 IgG1(WO 2004/056312에 개시)을 포함한다.

[0098] "CD3"은 달리 지시가 없는 한, 영장류(예를 들어 인간), 비인간 영장류(예를 들어 사이노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 비롯한 임의의 척추동물 출처의 임의의 천연 CD3을 지칭한다. 이 용어는 "전장"의, 가공되지 않은 CD3, 뿐만 아니라 세포에서 가공된 임의의 형태의 CD3를 포함한다. 이

용어는 또한 CD3의 자연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 한 실시형태에서, CD3은 인간 CD3, 특히 인간 CD3의 입실론 서브유닛(CD3ε)이다. 인간 CD3ε의 아미노산 서열은 UniProt (www.uniprot.org) 등록 번호 P07766 (버전 144), 또는 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1에 제시되어 있다. 사이노몰구스 원숭이[마카카 파시쿨라리스 (Macaca fascicularis)] CD3ε의 아미노산 서열은 NCBI GenBank 번호 BAB71849.1에 제시되어 있다.

[0099] 용어 "항-CD20/항-CD3 항체", "항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체" 및 "CD20 및 CD3에 결합하는 이중특이성 항체"는 항체가 CD20 및/또는 CD3을 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 하기에 충분한 친화도로 CD20 및 CD3 모두에 결합할 수 있는 이중특이성 항체를 지칭한다. 한 실시형태에서, CD20 및 CD3에 결합하는 이중특이성 항체의 관련되지 않은 비-CD3 단백질 및/또는 비-CD20 단백질에 대한 결합 정도는, 예를 들어, 방사면역검정(RIA)으로 측정한 CD3 및/또는 CD20에 대한 항체 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시형태들에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 각각의 CD20 및/또는 CD3에 ≤ 1μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM (예를 들어, 10^{-8} M 또는 그 미만, 예를 들어, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(K_D)로 결합한다. 특정 실시형태에서, CD20 및 CD3에 결합하는 이중특이성 항체는 상이한 종들의 CD3 중에서 보존된 CD3의 에피토프 및/또는 상이한 종들의 CD20 중에서 보존된 CD20의 에피토프에 결합한다. 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 한 예로는 글로피타맙(WHO 약물 정보(국제 일반의약품명), 권장 INN: 목록 83, 2020, 제34권, 제1호, 39페이지, 항-CD20/항-CD3 T 세포 관여 이중특이성 항체(TCB), CD20-TCB, RO7082859 또는 RG6026으로도 알려짐; CAS #: 2229047-91-8)이 있다.

[0100] 본원에 사용된 용어 "아미노산 돌연변이"는 아미노산 치환, 결실, 삽입 및 변형을 포함하는 것을 의미한다. 최종 구조체가 원하는 특성, 예를 들어, Fc 수용체에 대한 감소된 결합을 보유하는 한, 최종 구조체에 도달하도록 치환, 결실, 삽입 및 변형의 임의의 조합이 이루어질 수 있다. 아미노산 서열 결실 및 삽입은 아미노- 및/또는 카르복시-말단 결실 및 아미노산 삽입을 포함한다. 특정 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 예를 들어, Fc 영역의 결합 특성을 변경하기 위한 목적으로, 비보존적 아미노산 치환, 즉 하나의 아미노산을 상이한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 대체하는 것이 특히, 바람직하다. 아미노산 치환은 비-천연 발생 아미노산 또는 20개의 표준 아미노산의 자연 발생 아미노산 유도체(예를 들어, 4-하이드록시프롤린, 3-메틸히스티딘, 오르니틴, 호모세린, 5-하이드록시리신)에 의한 대체를 포함한다. 아미노산 돌연변이는 당업계에 잘 알려진 유전적 또는 화학적 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 유전적 방법은 부위 지향 돌연변이유발, PCR, 유전자 합성 등을 포함할 수 있다. 화학적 변형과 같은 유전 공학 이외의 방법에 의해 아미노산의 측쇄 기를 변경하는 방법이 또한 유용할 수 있는 것으로 고려된다. 동일한 아미노산 돌연변이를 나타내는 다양한 명칭이 본원에서 사용될 수 있다. 예를 들어, Fc 영역의 위치 329에 있는 프롤린의 글리신으로의 치환은 329G, G329, G329, P329G 또는 Pro329Gly로 표시될 수 있다.

[0101] "친화도"는 분자(예를 들어, 수용체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 짝(예를 들어, 리간드) 사이의 비공유 상호작용의 총합 강도를 지칭한다. 달리 표시되지 않은 한, 본원에 기재된 "결합 친화도"는 결합쌍(예를 들면, 수용체 및 리간드)의 구성원 간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 의미한다. 분자 X의 그의 짝 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(K_D)로 나타낼 수 있으며, 이는 해리 및 결합속도 상수(각각 k_{off} 및 k_{on})의 비이다. 따라서, 균등한 친화도는 상기 속도 상수들의 비율이 동일하게 유지되는 한 상이한 속도 상수를 포함할 수도 있다. 친화도는 당업계에서 잘 정립된 방법에 의해 측정될 수 있다. 친화도의 특정한 측정 방법은 표면 플라즈몬 공명(SPR)이다.

[0102] "친화도 성숙" 항체는 하나 이상의 초가변 영역(HVR)에 하나 이상의 변경을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여 이러한 변경이 있는 항체를 지칭하며, 이러한 변경은 항원에 대한 항체의 친화도를 개선한다.

[0103] 본원에 사용된 용어 "항원 결합 모이어티"는 항원 결정인자에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 한 실시형태에서, 항원 결합 모이어티는 그것이 부착된 실체(예를 들어, 사이토카인 또는 제2 항원 결합 모이어티)를 표적 부위에, 예를 들어 항원 결정인자를 보유하는 특정 유형의 종양 세포 또는 종양 기질에 대해 지시할 수 있다. 항원 결합 모이어티는 본원에 상세히 정의된 항체 및 이의 단편을 포함한다. 바람직한 항원 결합 모이어티는 항체 중쇄 가변 영역 및 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특정 실시형태들에서, 항원 결합 모이어티는 본원에 추가로 정의되고 당업계에 공지된 항체 불변 영역을 포함할 수 있다. 유용한 중쇄 불변 영역에는 5가지 이소형: α, δ, ε, γ 또는 μ 중 하나가 포함된다. 유용한 경쇄 불변 영역에는 κ 및 λ의 2가지 이소형 중 하나가 포함된다.

[0104] "결합하다", "특이적으로 결합하다", 또는 "~에 특이적인"은 결합이 항원에 대해 선택적이고 원치 않는 또는 비-특이적 상호작용과 구별될 수 있음을 의미한다. 특정한 항원 결정인자에 결합하는 항원 결합 모이어티의 능력은 효소-결합된 면역흡착 검정(ELISA) 또는 당업자에게 친숙한 다른 기술, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 기술(BIACORE® 장비상에서 분석됨)(Liljeblad 외, Glyco J 17, 323-329 (2000)), 및 전통적인 결합 검정(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))을 통해 측정될 수 있다. 한 실시형태에서, 관련 없는 단백질에 대한 항원 결합 모이어티의 결합 정도는 예를 들면, SPR에 의해 계측될 때 항원에 대한 항원 결합 모이어티의 결합의 약 10%보다 적다. 특정 실시형태에서, 항원에 결합하는 항원 결합 모이어티, 또는 그 항원 결합 모이어티를 포함하는 항원 결합 분자는 ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM(예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(K_D)를 갖는다.

[0105] "결합 감소", 예를 들어, Fc 수용체에 대한 결합 감소는 예를 들어 SPR에 의해 측정시 각각의 상호작용에서 친화도의 감소를 지칭한다. 명확성을 위해 이 용어는 0(또는 분석 방법의 검출 한계 미만)으로의 친화도 감소, 즉, 상호 작용의 완전한 제거를 포함한다. 역으로, "결합 증가"는 각각의 상호작용에서 결합 친화도의 증가를 지칭한다.

[0106] 본원에서 사용되는 용어 "항원 결합 분자"는 가장 넓은 의미로, 항원 결정인자에 특이적으로 결합하는 분자를 지칭한다. 항원 결합 분자의 예는 면역글로불린 및 유도체, 예를 들어, 이의 단편이다.

[0107] 본원에 사용된 용어 "항원 결정인자"는 "항원" 및 "에피토프"와 동의어이며 항원 결합 모이어티가 결합하여, 항원 결합 모이어티-항원 복합체를 형성하는 폴리펩티드 거대분자 상의 부위(예를 들어, 아미노산의 연속 신장부(stretch) 또는 비인접 아미노산들의 상이한 영역들로 구성된 입체형태 구성)를 지칭한다. 유용한 항원 결정인자는 예를 들어 종양 세포의 표면, 바이러스에 감염된 세포의 표면, 다른 질환 세포의 표면 상에서, 혈청내에서 유리 상태로 및/또는 세포외 기질(ECM)에서 발견될 수 있다. 본원에서 항원으로 지칭되는 단백질(예를 들어, CD3)은 달리 명시되지 않는 한, 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함하는 모든 척추동물 출처로부터 얻은 임의의 천연 형태의 단백질일 수 있다. 특정 실시형태에서 항원은 인간 단백질이다. 본원에서 특정 단백질을 지칭하는 경우, 이 용어는 "전장"의, 비가공 단백질, 뿐만 아니라 세포에서 가공된 임의의 형태의 단백질을 포함한다. 이 용어는 또한 단백질의 자연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 항원으로 유용한 대표적인 인간 단백질은 CD3, 특히, CD3의 엡실론 서브유닛이다(인간 서열의 경우 UniProt 번호 P07766(버전 130), NCBI RefSeq 번호 NP_000724.1 참조; 사이노몰구스[Macaca fascicularis] 서열의 경우 UniProt 번호 Q95LI5(버전 49), NCBI GenBank 번호 BAB71849.1 참조). 특정 실시형태에서, 본원에서 설명하는 T 세포 활성화 이중특이성 항원 결합 분자는 서로 다른 종의 CD3 또는 표적 세포 항원 사이에서 보존된 CD3 또는 표적 세포 항원의 에피토프에 결합한다.

[0108] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드"는 아미드 결합(펩티드 결합으로도 알려짐)에 의해 선형으로 연결된 단량체(아미노산)로 구성된 분자를 의미한다. "폴리펩티드"라는 용어는 2개 이상의 아미노산들의 사슬을 지칭하며 특정 길이의 생성물을 지칭하지 않는다. 따라서, 펩티드, 디펩티드, 트리펩티드, 올리고펩티드, "단백질", "아미노산 사슬" 또는 2개 이상의 아미노산 사슬을 지칭하는 데 사용되는 기타 용어들이 "폴리펩티드"의 정의에 포함되며, 용어 "폴리펩티드"는 이러한 용어를 대신하거나 이러한 용어와 상호교환적으로 사용될 수 있다. "폴리펩티드"라는 용어는 또한 폴리펩티드의 발현 후 변형의 생성물을 지칭하는 것으로 하며, 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질 분해 절단, 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 변형을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 폴리펩티드는 자연 생물학적 출처로부터 유래되거나 재조합 기술에 의해 생성될 수 있지만, 반드시 지정된 핵산 서열로부터 번역되는 것은 아니다. 이는 화학적 합성을 포함하여 어떤 방식으로든 생성될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 약 3개 이상, 5개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 50개 이상, 75개 이상, 100개 이상, 200개 이상, 500개 이상 또는 1,000개 이상, 또는 2,000개 이상 아미노산 크기일 수 있다. 폴리펩티드는 정의된 3차원 구조를 가질 수 있지만 반드시 그러한 구조를 갖는 것은 아니다. 정의된 3차원 구조를 갖는 폴리펩티드는 폴딩된(folded) 것이라 하고, 정의된 3차원 구조를 갖지 않지만 오히려 다수의 상이한 형태를 채택할 수 있는 폴리펩티드를 폴딩되지 않은(unfolded) 것이라 한다.

[0109] "단리된" 폴리펩티드 또는 이의 변이체 또는 유도체는 자연 환경에 있지 않은 폴리펩티드를 의미한다. 특정 수준의 정제가 필요하지 않다. 예를 들어, 단리된 폴리펩티드는 천연 또는 자연 환경으로부터 제거될 수 있다. 숙주 세포에서 발현된 재조합적으로 생성된 폴리펩티드 및 단백질은 임의의 적합한 기술에 의해 분리, 분획화되거나, 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 천연 또는 재조합 폴리펩티드와 마찬가지로 본 발명의 목적을 위해 단리된 것으로 간주된다.

[0110] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는, 서열들을 정렬하고 필요에 따라 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 갭을 도입한 후 참조 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기들과 동일한, 후보 서열의 아미노산 잔기들의 백분율로 정의되며, 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 고려하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 해당 분야의 기술 범위에 속하는 다양한 방식으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 MEGALIGN® (DNASTAR®) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 이루어질 수 있다. 당업자는 비교되는 서열들의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 구현하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열들을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에서 제작되었으며 소스 코드는 미국 워싱턴 D.C., 20559에 소재한 미국 저작권청에 사용자 문서와 함께 제출되었으며, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코에 소재한 Genentech, Inc.사로부터 공개적으로 이용가능하거나 소스 코드로부터 컴파일될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX® V4.0D를 포함한 UNIX® 운영 체제에서 사용되도록 컴파일해야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 변경되지 않는다. ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 경우에, 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이것과, 또는 이에 대항한 소정의 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성(대안적으로 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이것과, 또는 이에 대항한 소정의 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 소정의 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있음)은 아래와 같이 계산된다:

[0111] 100 x 분율 X/Y

[0112] 이 때 X는 A와 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치로 기록되는 아미노산 잔기의 수를 말하며, Y는 B의 전체 아미노산 잔기 수가 된다. 아미노산 서열 A의 길이는 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않는 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않은 것으로 인정된다. 달리 특정 언급이 없는 한, 본원에서 이용된 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 바로 전 단락에서 기재된 바와 같이 수득된다.

[0113] 본원에서 용어 “항체”는 가장 넓은 의미로 사용되고, 이들이 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한, 비제한적으로 단일클론 항체, 다중클론 항체, 다중특이성 항체(예를 들면, 이중특이성 항체), 및 항체 단편을 포함하는, 다양한 항체 구조를 포괄한다.

[0114] 용어 "전장 항체", "온전한 항체" 및 "전 항체(whole antibody)"는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 본원에 정의된 바와 같은 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭하기 위해 본원에서 호환적으로 사용된다.

[0115] "항체 단편"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 의미한다. 항체 단편의 예로는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')$_2$, 디아바디; 선형 항체; 단일 사슬 항체 분자 (예를 들어, scFv), 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본원에서 사용되는 용어 "항체 단편"에는 단일 도메인 항체도 포함된다.

[0116] "면역글로불린 분자"라는 용어는 자연 발생 항체의 구조를 갖는 단백질을 지칭한다. 예를 들어, IgG 분류의 면역글로불린은 이황화 결합된 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 도메인 N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VH), 이어서 중쇄 불변 영역으로도 불리는 3개의 불변 도메인(CH1, CH2, 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VL), 이어서 경쇄 불변 영역으로도 불리는 경쇄 불변(CL) 도메인을 갖는다. 면역글로불린의 중쇄는 α(IgA), δ(IgD), ε(IgE), γ(IgG), 또는 μ(IgM)라 불리는 5가지 분류 중 하나로 지정될 수 있으며, 이들 중 일부는 하위분류, 예를 들어, γ$_1$ (IgG$_1$), γ$_2$ (IgG$_2$), γ$_3$ (IgG$_3$), γ$_4$ (IgG$_4$), α$_1$ (IgA$_1$) 및 α$_2$ (IgA$_2$)로 세분될 수 있다. 면역글로불린의 경쇄는 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 카파(κ) 및 람다(λ)라고 하는 2가지 유형 중 하나로 지정될 수 있다. 면역글로불린은 본질적으로 면역글로불린 힌지 영역을 통해 연결된 2개의 Fab 분자와 Fc 도메인으로 구성된다.

[0117] 용어 "항원 결합 도메인"이란 용어는 항원의 일부 또는 전부에 특이적으로 결합하고 이에 상보성인 영역을 포함하는 항체의 부분을 지칭한다. 항원 결합 도메인은, 예를 들어, 하나 이상의 항체 가변 도메인(또한 항체 가변 영역이라 칭함)에 의해 제공될 수 있다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체

중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.

[0118] “가변 영역” 또는 “가변 도메인”은 항체가 항원에 결합하는데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄와 경쇄(차례로 VH 및 VL)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(FRs)과 3개의 초가변 영역(HVR들)을 포함한다. 예를 들어, Kindt 외, *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 91 페이지(2007)를 참조하라. 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다.

[0119] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-인코딩 서열을 이용하는 비-인간 출처로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 인간 항체의 정의에서 특히 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 제외한다.

[0120] "인간화" 항체는 비인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시형태에 있어서, 인간화 항체는 실질적으로 최소한 하나의, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함하는데, 이 때 HVR들 (가령, CDRs)의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 비-인간 항체에 대응하며, FRs의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 인간 항체의 것에 대응한다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체의 "인간화 형태", 예를 들어, 비-인간 항체는 인간화를 거친 항체를 지칭한다.

[0121] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 초가변("상보성 결정 영역" 또는 "CDR")이고/이거나 구조적으로 정의된 루프("초가변 루프") 및/또는 항원 접촉 잔기("항원 접촉")를 형성하는 항체 가변 도메인 영역들 각각을 지칭한다. 일반적으로, 항체들은 6개의 HVR: VH에 3개 (H1, H2, H3), 및 VL에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 본원의 예시적인 HVR은 다음을 포함한다:

[0122] (a) 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3)에서 나타나는 초가변 루프 (Chothia 및 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

[0123] (b) 아미노산 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), 및 95-102 (H3)에서 나타나는 CDR(Kabat 외, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

[0124] (c)아미노산 잔기 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), 및 93-101 (H3)에서 나타나는 항원 접촉부(MacCallum 외 *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); 및

[0125] (d) HVR 아미노산 잔기 46-56(L2), 47-56(L2), 48-56(L2), 49-56(L2), 26-35(H1), 26-35b(H1), 49-65(H2), 93-102(H3) 및 94-102(H3)를 포함하는, (a), (b) 및/또는 (c)의 조합.

[0126] 달리 명시되지 않는 한, 가변 도메인의 HVR 잔기 및 기타 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 상기 Kabat 외의 문헌에 따라 넘버링된다.

[0127] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역(HVR) 잔기들 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인들로 구성된다: FR1, FR2, FR3, 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열들은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 다음의 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0128] "인간 공통 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선별에 있어서 가장 일반적으로 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 선택된다. 일반적으로, 서열들의 하위군들은 Kabat 외, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3에서와 같은 하위군이다. 한 실시형태에서, VL의 경우, 하위군은 상기 Kabat 외의 문헌에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시형태에서, VH의 경우, 하위군은 상기 Kabat 외의 문헌에서와 같은 하위군 III이다.

[0129] 본원의 목적과 관련하여 "수용체 인간 프레임워크"는 하기 정의된 바와 같이, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인(VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인(VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 "유래된" 수용체 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하 또는 2개 이하이다. 일부 실시형태에서, VL 수용체 인간 프레임워크는 VL 인

간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 공통 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.

[0130] 항체의 "분류"는 그 중쇄가 갖는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 말한다. 항체에는 5가지 주요 분류가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들 중 몇몇은 하위분류(이소형), 예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, 및 IgA_2로 더욱 세분될 수 있다. 상이한 면역글로불린 분류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 차례로 α, δ, ε, γ 및 μ로 불린다.

[0131] 본원에서 사용되는 용어 IgG "이소형" 또는 "하위분류"는 그의 불변 영역들의 화학적 및 항원성 특징에 의해 정의된 면역글로불린의 임의의 하위분류들을 의미한다.

[0132] 본원에서 용어 "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. IgG 중쇄의 Fc 영역 경계는 약간 다를 수 있지만 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카르복실 말단까지 연장되는 것으로 정의된다. 그러나, 숙주 제포에 의해 생성된 항체는 중쇄의 C-말단으로부터 하나 이상, 특히 1개 또는 2개의 아미노산의 번역후 절단을 거칠 수 있다. 따라서, 전장 중쇄를 코딩하는 특이성 핵산 분자의 발현에 의해 숙주 세포에 의해 생성되는 항체는 전장 중쇄를 포함할 수 있고, 또는 전장 중쇄의 절단된 변이체(또한 본원에서 "절단된 변이체 중쇄"로 지칭됨)를 포함할 수 있다. 이는 중쇄의 최종 2개의 C-말단 아미노산이 글리신(G446) 및 리신(K447, EU 넘버링)인 경우일 수 있다. 따라서, Fc 영역의 C-말단 리신(Lys447), 또는 C-말단 글리신(Gly446) 및 리신(K447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 명시적으로 다른 언급이 없는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 EU 넘버링 체계, Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에서 설명된 소위 EU 색인에 따른다(또한 상기 참조). 본원에 사용된 Fc 도메인의 "서브유닛"은 이량체 Fc 도메인을 형성하는 2개의 폴리펩티드 중 하나, 즉 안정한 자가-결합이 가능한 면역글로불린 중쇄의 C-말단 불변 영역들을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, IgG Fc 도메인의 서브유닛은 IgG CH2 및 IgG CH3 불변 도메인을 포함한다.

[0133] "Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 결합을 촉진하는 변형"은 Fc 도메인 서브유닛의 번역 후 변형 또는 펩티드 백본의 조작으로서, Fc 도메인 서브유닛을 포함하는 폴리펩티드를 동일한 폴리펩티드와 결합시켜 동종이량체를 형성하는 것을 감소시키거나 예방한다. 본원에서 사용되는 결합을 촉진하는 변형은 특히, 결합하고자 하는 2개의 Fc 도메인 서브유닛들(즉, Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛) 각각에 대해 이루어진 별도의 변형을 포함하며, 여기서 이러한 변형은 2개의 Fc 도메인 서브유닛들의 결합을 촉진하기 위해 서로에 상보적이다. 예를 들어, 결합을 촉진하는 변형은 각각의 결합이 입체적으로 또는 정전기적으로 유리하도록 하기 위해 Fc 도메인 서브유닛들 중 하나 또는 둘 모두의 구조 또는 전하를 변경할 수 있다. 따라서, (이종)이량체화는 제1 Fc 도메인 서브유닛을 포함하는 폴리펩티드와 제2 Fc 도메인 서브유닛을 포함하는 폴리펩티드 사이에서 발생하며, 이는 각각의 서브유닛(예를 들어, 항원 결합 모이어티)에 융합된 추가 구성요소가 동일하지 않다는 의미에서 동일하지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서, 결합을 촉진하는 변형은 Fc 도메인 내의 아미노산 돌연변이, 구체적으로 아미노산 치환을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합을 촉진하는 변형은 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 각각에서 별도의 아미노산 돌연변이, 구체적으로 아미노산 치환을 포함한다.

[0134] "활성화 Fc 수용체"는 항체의 Fc 영역에 의한 결합 후 효과기 기능을 수행하도록 수용체-보유 세포를 자극하는 신호전달 사건을 이끌어 내는 Fc 수용체이다. 활성화 Fc 수용체는 FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), 및 Fcα RI (CD89)를 포함한다.

[0135] 항체와 관련하여 사용되는 용어 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역으로 인한 생물학적 활성을 지칭하며, 이는 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 효과기 기능들의 예에는 다음이 포함된다: C1q 결합 및 보체 의존적인 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식균작용(ADCP), 사이토카인 분비, 항원 제공 세포에 의한 면역 복합체-매개된 항원 흡수, 세포 표면 수용체(예를 들어 B 세포 수용체)의 하향조절, 및 B 세포 활성화.

[0136] 본원에서 사용되는 용어 "효과기 세포"는 효과기 모이어티 수용체, 예를 들어, 사이토카인 수용체 및/또는 Fc 수용체를 그 표면에 제시하고 이를 통해 효과기 모이어티, 예를 들어, 사이토카인 및/또는 항체의 Fc 영역에 결합하고 표적 세포, 예를 들어, 종양 세포의 파괴에 기여하는 림프구 집단을 지칭한다. 효과기 세포는, 예를 들어, 세포독성이나 대식세포 작용을 매개할 수 있다. 효과기 세포에는, $CD8^+$ 세포독성 T 세포, $CD4^+$ 헬퍼 T 세포, γδ T 세포, NK 세포, 림포카인 활성화 살해(LAK) 세포 및 대식세포/단핵구와 같은 효과기 T 세포가 포함되지

만 이에 제한되지는 않는다.

[0137] 본원에 사용된 용어 "조작하다", "조작된" 및 "조작"은 펩티드 백본의 임의의 조작 또는 자연 발생 또는 재조합 폴리펩티드 또는 이의 단편의 번역후 변형을 포함하는 것으로 간주된다. 조작에는 개별 아미노산들의 아미노산 서열의, 글리코실화 패턴의 또는 측쇄 기의 변형과 이러한 접근 방식의 조합이 포함된다. "조작"(특히 접두사 "글리코-"와 함께 사용시), 뿐만 아니라 용어 "글리코실화 조작"은 세포의 글리코실화 기작의 대사 조작을 포함하며, 세포에서 발현된 당단백질의 변경된 글리코실화를 달성하기 위한 올리고당 합성 경로의 유전적 조작을 포함한다. 또한, 글리코실화 조작은 글리코실화에 대한 돌연변이 및 세포 환경의 영향을 포함한다. 한 실시형태에서, 글리코실화 조작은 글리코실트랜스퍼라제 활성의 변경이다. 특정 실시형태에서, 조작은 글루코사미닐트랜스퍼라제 활성 및/또는 푸코실트랜스퍼라제 활성 변경을 가져온다. 글리코실화 조작은 "GnTIII 활성이 증가된 숙주 세포"(예를 들어, β(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII) 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 조작된 숙주 세포), "ManII 활성이 증가된 숙주 세포"(예를 들어, α-만노시다제 II(ManII) 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 조작된 숙주 세포), 또는 "α(1,6) 푸코실트랜스퍼라제 활성이 감소된 숙주 세포"(예를 들어, α(1,6) 푸코실트랜스퍼라제 수준을 감소된 수준으로 발현하도록 조작된 숙주 세포)를 얻는 데 사용될 수 있다.

[0138] 용어 "숙주 세포(host cell)", "숙주 세포주(cell line)", 및 "숙주 세포 배양물(culture)"은 상호교환적으로 이용되며, 외인성 핵산이 도입되어 있는 세포를 지칭하고 이러한 세포들의 자손을 포함한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 계대 수에 관계없이 일차 형질전환된 세포 및 이로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 핵산 함량이 모체 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있지만 돌연변이를 포함할 수 있다. 최초로 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 본원에 포함된다. 숙주 세포는 본 발명에 사용되는 단백질을 생성함에 사용될 수 있는 임의의 유형의 세포 시스템이다. 한 실시형태에서, 숙주 세포는 변형된 올리고당을 포함하는 항체를 생산할 수 있도록 조작된다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포는 β(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII) 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 조작되었다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포는 α-만노시다제 II (ManII) 활성을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 증가된 수준으로 발현하도록 조작되었다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예를 들어, 몇 가지 언급하자면, 포유동물 배양된 세포, 예를 들어, CHO 세포, 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 포함하나, 또한 유전자삽입 동물, 유전자삽입 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직내에 포함된 세포를 포함한다.

[0139] 본원에서 사용되는 용어 "GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드"는 β-1,4 링키지에 있는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 잔기를 N-연결된 올리고당의 트리만노실 코어의 β-연결된 만노사이드에 첨가하는 것을 촉매할 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 국제 생화학 및 분자생물학 명명 위원회(NC-IUBMB)에 따르면, 여기에는 특정 생물학적 검정에서 측정한 바와 같이 용량 의존성 유무에 관계없이, β(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(β-1,4-만노실-당단백질 4-베타-N-아세틸글루코사미닐-트랜스퍼라제(EC 2.4.1.144)라고도 함)의 활성과 유사하지만 반드시 동일하지는 않은 효소 활성을 나타내는 융합 폴리펩티드가 포함된다. 용량 의존성이 존재하는 경우, 그것은 GnTIII의 용량 의존성과 동일할 필요는 없지만, GnTIII와 비교했을 때 주어진 활성의 용량 의존성과 실질적으로 유사해야 한다(즉, 후보 폴리펩티드는 GnTIII에 비해 더 큰 활성을 나타내거나 최대 약 25배 적은 활성, 바람직하게는 최대 약 10배 적은 활성, 가장 바람직하게는 최대 약 3배 적은 활성을 나타낸다). 특정 실시형태에서 GnTIII 활성을 갖는 폴리펩티드는 GnTIII의 촉매 도메인 및 이종 골지체 상주 폴리펩티드의 골지체 국재화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 특히, 골지 국재화 도메인은 만노시다제 II 또는 GnTI의 국재화 도메인, 가장 특히 만노시다제 II의 국재화 도메인이다. 대안적으로, 골지 국재화 도메인은 만노시다제 I의 국재화 도메인, GnTII의 국재화 도메인, α 1,6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 국재화 도메인으로 구성된 군에서 선택된다. 이러한 융합 폴리펩티드를 생성하고 이를 사용하여 효과기 기능이 증가된 항체를 생산하는 방법은 WO2004/065540, 미국 가특허 출원 제 60/495,142 및 미국 특허 출원 공개공보 제 2004/0241817에 공개되어 있으며, 그 전체 내용은 명시적으로 본원에 참고로 통합된다.

[0140] 본원에서 사용되는 용어 "골지 국재화 도메인"은 골지 복합체 내의 위치에 폴리펩티드를 고정시키는 역할을 하는 골지 정주성 폴리펩티드의 아미노산 서열을 지칭한다. 일반적으로, 국재화 도메인은 효소의 아미노 말단 "꼬리"를 포함한다.

[0141] 본원에서 사용되는 용어 "ManII 활성을 갖는 폴리펩티드"는 N-연결된 올리고당의 분지형 $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$ 만

노스 중간체에서 말단 1,3- 및 1,6-연결된 α-D-만노스 잔기의 가수분해를 촉매할 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 여기에는, 국제 생화학 및 분자생물학 명명 위원회(NC-IUBMB)에 따라, 만노실 올리고사카라이드 1,3-1,6-α-만노시다제 II(EC 3.2.1.114)로도 알려진 골지 α-만노시다제 II의 활성과 유사하나 반드시 동일하지는 않은 효소 활성을 나타내는 폴리펩티드가 포함된다.

[0142] 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)은 항체 코팅된 표적 세포의 면역 효과기 세포에 의한 용해를 초래하는 면역 메커니즘이다. 표적 세포는 일반적으로 Fc 영역의 N-말단인 단백질 부분을 통해 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 이의 단편들이 특이적으로 결합하는 세포이다. 본원에 사용된 용어 "ADCC 증가/감소"는, 상기 정의된 ADCC의 메커니즘에 의해 표적 세포를 둘러싸고 있는 배지에서 주어진 항체 농도에서 주어진 시간에 용해되는 표적 세포 수의 증가/감소, 및/또는 ADCC의 메커니즘에 의해 주어진 시간에 주어진 수의 표적 세포의 용해를 달성하는 데 필요한 표적 세포를 둘러싼 배지에서 항체 농도의 감소/증가로 정의된다. ADCC의 증가/감소는, (당업자에게 공지된) 동일한 표준 생산, 정제, 제형 및 보관 방법을 사용하여 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 생성되었으나 조작되지 않은 동일한 항체에 의해 매개되는 ADCC와 비교된다. 예를 들면, 본원에 기재된 방법에 의해 변형된 패턴의 글리코실화를 갖도록(예를 들면, 글리코실트랜스퍼라제, GnTIII 또는 다른 글리코실트랜스퍼라제를 발현하도록) 조작된 숙주 세포에 의해 생성된 항체에 의해 매개된 ADCC의 증가는 동일 유형의 조작되지 않은 숙주 세포에 의해 생성된 동일한 항체에 의해 매개된 ADCC에 상대적인 것이다.

[0143] "증가된/감소된 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)을 갖는 항체"는 당업자에게 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 측정시 증가된/감소된 ADCC를 갖는 항체를 의미한다. 허용되는 시험관내 ADCC 검정법 중 하나는 다음과 같다:

[0144] 1) 이러한 검정법은 항체의 항원 결합 영역에 의해 인식되는 표적 항원을 발현하는 것으로 알려진 표적 세포를 사용하고;

[0145] 2) 이러한 검정법은 무작위로 선택된 건강한 기증자의 혈액에서 단리된 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 효과기 세포로 사용하며;

[0146] 3) 이러한 검정법은 다음 프로토콜에 따라 수행되고:

[0147] i) PBMC를 표준 밀도 원심분리 절차를 사용하여 단리하고 RPMI 세포 배양 배지에서 5 x 10^6개 세포/ml로 현탁시킨다;

[0148] ii) 표적 세포들을 표준 조직 배양 방법으로 성장시키고, 생존력이 90% 이상인 지수 성장 단계에서 수확하고, RPMI 세포 배양 배지에서 세척하고, ^{51}Cr의 100 마이크로-Curies로 표지시키고, 세포 배양 배지로 2회 세척하고, 10^5개 세포/ml의 밀도로 세포 배양 배지에 재현탁시키고;

[0149] iii) 100 마이크로리터의 상기 최종 표적 세포 현탁액을 96-웰 마이크로타이터 플레이트의 각 웰에 옮기고;

[0150] iv) 항체를 세포 배양 배지에서 4000ng/ml로부터 0.04ng/ml로 연속 희석하고 생성된 항체 용액 50마이크로리터를 96-웰 마이크로타이터 플레이트의 표적 세포에 첨가하여 상기 전체 농도 범위에 걸쳐 다양한 항체 농도를 삼중으로 테스트하고;

[0151] v) 최대 방출(MR) 대조군의 경우, 상기 표지된 표적 세포들을 포함하는 플레이트의 3개 추가 웰들은 항체 용액 대신 50 마이크로리터의 2% (v/v) 비-이온성 세제 수용액 (Nonidet, Sigma, St. Louis)을 제공받고 (상기 iv);

[0152] vi) 자발적 방출 (SR) 대조군의 경우, 표지된 표적 세포들을 포함하는 플레이트의 3개의 추가 웰들은 항체 용액 대신 50 마이크로리터의 RPMI 세포 배양 배지를 제공받고 (상기 iv);

[0153] vii) 그 후 96-웰 마이크로타이터 플레이트를 1분 동안 50 x g에서 원심분리하고 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하고;

[0154] viii) 50 마이크로리터의 PBMC 현탁액 (상기 i)을 각 웰에 첨가하여 25:1의 효과기:표적 세포 비율을 생성하고 플레이트를 37℃에서 4시간 동안 5% CO2 대기 하의 인큐베이터에 두었으며;

[0155] ix) 각 웰의 무세포 상층액을 수확하고 감마 계수기를 사용하여 실험적으로 방출된 방사능(ER)을 정량하고;

[0156] x) 각 항체 농도에서 특이적 용해 백분율을 식 (ER-MR)/(MR-SR) x 100에 따라 계산하며, 이 때 ER은 해당

항체 농도에 대해 정량화된 (상기 ix 참조) 평균 방사능이고, MR은 MR 대조군 (상기 V 참조)에 대해 정량화된 (상기 ix 참조) 평균 방사능, SR은 SR 대조군 (위의 vi 참조)에 대해 정량화된 (상기 ix 참조) 평균 방사능이며;

[0157] 4) "증가된/감소된 ADCC"는 상기 테스트한 항체 농도 범위 내에서 관찰된 특이적인 최대 용해의 최대 백분율 증가/감소 및 상기 테스트한 항체 농도 범위 내에서 관찰된 특이적 용해의 최대 백분율의 1/2을 달성하는 데 필요한 항체 농도 감소/증가로 정의된다. 상기 검정법으로 측정한 ADCC의 증가/감소는, 당업자에게 공지된 동일한 표준 생산, 정제, 제형 및 보관 방법을 사용하여 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 생성되었으나 조작되지 않은 동일한 항체에 의해 매개되는 ADCC와 비교된다.

[0158] 본원에서 사용되는 용어 "단일클론 항체"는 실질적으로 동질성 항체 집단으로부터 획득된 항체를 말하는데, 예를 들어, 개별 항체는 동일한 집단 및/또는 같은 에피토프에 결합하는 집단을 포함하는데, 다만, 변이체 항체, 예를 들어, 자연 발생적 돌연변이 또는 단일클론 항체 제재를 만드는 동안 발생되는 돌연변이를 가진 변이체 항체 가능성이 있으며, 이러한 변이체들은 일반적으로 소량으로 존재한다. 상이한 결정부위(에피토프)에 대해 지향된(directed) 상이한 항체를 통상적으로 포함하는 다중클론 항체 제제와 대조적으로, 단일클론 항체 제제의 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정부위에 대해 유도된다. 따라서, 수식어 "단일클론(monoclonal)"은 실질적으로 동질성 항체 집단으로부터 수득되는 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체 제조를 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 예를 들면, 본 발명에 따라 사용되는 단일클론 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법 그리고 인간 면역 글로불린 좌위의 전부 또는 일부를 포함하는 유전자삽입 동물을 이용하는 방법들을 비롯한(그러나 이에 제한되지 않음) 다양한 기술에 의해 제조 될 수 있으며, 상기 방법 및 단일클론 항체를 제조하는 다른 예시적인 방법이 본원에 기재되어 있다.

[0159] “네이키드(naked) 항체”는 이종 모이어티(예를 들어, 세포독성 모이어티) 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체를 의미한다. 이러한 네이키드 항체는 약학 제제로 존재할 수 있다.

[0160] "천연 항체"는 변하는 구조를 갖는 자연 발생 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들면, 천연 IgG 항체는 이종사량체 당단백질로써, 약 150,000 달톤이며, 2개의 동일한 경쇄와 2개의 동일한 중쇄를 포함하며, 이들은 이황화 결합에 의해 연결되어 있다. 도메인 N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VH), 이어서 3개의 불변 도메인(CH1, CH2, 및 CH3)을 가진다. 유사하게, N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VL), 이어서 불변 경쇄(CL) 도메인을 가진다. 항체의 경쇄는 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 카파(κ) 및 람다(λ)라고 하는 2가지 유형 중 하나로 지정될 수 있다.

[0161] 본원에서 항원 결합 모이어티 또는 도메인과 관련하여 "제1" 및 "제2", "제3" 등의 용어는 각 유형의 모이어티 또는 도메인이 하나 이상인 경우 구별의 편의를 위해 사용된다. 이러한 용어의 사용은 명시적으로 언급되지 않는 한 특정 순서 또는 방향을 부여하려는 의도가 아니다.

[0162] 용어 "다중특이성" 및 "이중특이성"은 항원 결합 분자가 적어도 2개의 별개의 항원 결정인자에 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다. 전형적으로, 이중특이성 항원 결합 분자는 2개의 항원 결합 부위를 포함하며, 이들 각각은 상이한 항원 결정인자에 대해 특이적이다. 특정 구체예들에서, 이중특이적 항원 결합 분자는 2개의 항원 결정인자, 특히, 2개의 별개 세포에서 발현되는 2개의 항원 결정인자에 동시에 결합 할 수 있다.

[0163] 본원에서 사용되는 용어 “~가” 또는 "원자가"는 항원 결합 분자에서 특정 수의 항원 결합부위의 존재를 나타낸다. 이와 같이, 용어 "항원에 대한 1가 결합"은 항원 결합 분자에서 항원에 특이적인 하나(및 하나 이하)의 항원 결합 부위의 존재를 나타낸다.

[0164] "항원 결합 부위"는 항원과의 상호작용을 제공하는 항원 결합 분자의 부위, 즉 하나 이상의 아미노산 잔기를 지칭한다. 예를 들어, 항체의 항원 결합 부위는 상보성 결정 영역(CDR)의 아미노산 잔기를 포함한다. 천연 면역글로불린 분자는 전형적으로 2개의 항원 결합 부위를 갖고, Fab 분자는 전형적으로 단일 항원 결합 부위를 갖는다.

[0165] 본원에 사용된 "활성화 T 세포 항원"은 T 림프구, 특히 세포독성 T 림프구에 의해 발현되는 항원 결정인자를 지칭하며, 이는 항원 결합 분자와 상호작용시 T 세포 활성화를 유도하거나 향상시킬 수 있다. 구체적으로, 항원 결합 분자와 활성화 T 세포 항원의 상호작용은 T 세포 수용체 복합체의 신호전달 캐스케이드를 촉발시킴으로써 T 세포 활성화를 유도할 수 있다. 예시적인 활성화 T 세포 항원은 CD3이다. 특정 실시형태에서 활성화 T 세포 항원은 CD3, 특히, CD3의 엡실론 서브유닛이다(인간 서열의 경우 UniProt 번호 P07766(버전 130), NCBI RefSeq

번호 NP_000724.1 참조; 사이노몰구스[Macaca fascicularis] 서열의 경우 UniProt 번호 Q95LI5(버전 49), NCBI GenBank 번호 BAB71849.1 참조).

[0166] 본원에 사용된 "T 세포 활성화"는 증식, 분화, 사이토카인 분비, 세포독성 효과기 분자 방출, 세포독성 활성 및 활성화 마커의 발현으로부터 선택되는 T 림프구, 특히, 세포독성 T 림프구의 하나 이상의 세포 반응을 지칭한다. 본 발명에서 사용되는 T 세포 활성화 치료제는 T 세포 활성화를 유도할 수 있다. T 세포 활성화를 측정하기 위한 적절한 검정법은 본원에 설명된 기술분야에 공지되어 있다.

[0167] 본원에 사용된 "표적 세포 항원"은 표적 세포, 예를 들어 암 세포 또는 종양 기질의 세포와 같은 종양 내의 세포의 표면에 제시된 항원 결정인자를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 표적 세포 항원은 CD20, 특히 인간 CD20이다(UniProt 번호 P11836 참조).

[0168] 본원에서 사용되는 "B 세포 항원"은 B 림프구, 특히, 악성 B 림프구의 표면에 존재하는 항원 결정인자를 지칭한다(이 경우 항원은 "악성 B 세포 항원"으로도 지칭된다).

[0169] 본원에 사용된 "T 세포 항원"은 T 림프구, 특히, 세포독성 T 림프구의 표면상에 제시되는 항원 결정인자를 지칭한다.

[0170] "Fab 분자"는 면역글로불린의 중쇄의 VH 및 CH1 도메인("Fab 중쇄") 및 경쇄의 VL 및 CL 도메인("Fab 경쇄")으로 구성된 단백질을 지칭한다.

[0171] "융합된"은 구성요소들(예를 들어, Fab 분자 및 Fc 도메인 서브유닛)이 직접적으로 또는 하나 이상의 펩티드 링커를 통해 펩티드 결합에 의해 연결됨을 의미한다.

[0172] 제제의 "유효량"은 투여되는 세포 또는 조직에서 생리학적 변화를 일으키는데 필요한 양을 지칭한다.

[0173] 제제, 예를 들어, 약학 조성물의 "치료적 유효량"은 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량으로 그리고 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 제제의 치료적 유효량은, 예를 들어, 질환의 유해효과를 제거, 감소, 지연, 최소화 또는 방지한다.

[0174] "치료제"란 예를 들어, 약학 조성물의 활성 성분을 의미하며, 이는 치료를 받는 대상체에서 해당 질환의 자연스러운 경과를 변경하려는 시도에서 대상체에게 투여되며, 예방을 위해 또는 임상 병리 과정 동안 수행될 수 있다. "면역 치료제"란, 예를 들어, 종양에 대한, 대상체의 면역 반응을 복원 또는 강화하기 위해 대상체에게 투여되는 치료제를 지칭한다.

[0175] 용어 “약학 조성물”은 내부에 포함된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과가 있도록 하기 위한 형태의 제재를 지칭하며, 조성물이 투여되는 대상체에게 허용불가능한 독성을 주는 추가 성분들은 포함하지 않는다.

[0176] "약학적으로 허용되는 담체"는 약학 조성물 안에 있는, 활성 성분 이외의 성분을 말하며, 대상체에게 비독성이다. 약학적으로 허용되는 담체는 완충액, 부형제, 안정화제, 또는 방부제를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0177] "약품 설명서" 또는 "사용 지침서"라는 용어는 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 사용법, 투여량, 투여, 병용 요법, 금기 및/또는 경고에 대한 정보를 포함하는 치료 제품의 상용 패키지에 관례적으로 포함된 지침을 지칭하는 데 사용된다.

[0178] 본원에 언급된 용어 "조합 치료"는 조합 투여(2가지 또는 그 이상의 요법제가 동일한 또는 별도 제제 안에 함유됨), 및 별도 투여를 포함하고, 이 경우, 상기 본원에 보고된 바와 같은 항체의 투여는 추가적인 요법제 및/또는 제제, 바람직하게는 항체 또는 항체들의 투여 이전, 투여와 동시 및/또는 투여 이후에 일어난다.

[0179] "교차" Fab 분자("Crossfab"라고도 함)는 Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환(즉, 서로 대체)되는 Fab 분자를 의미한다, 즉, 교차 Fab 분자는 경쇄 가변 도메인 VL과 중쇄 불변 도메인 1 CH1으로 구성된 펩티드 사슬(VL-CH1, N-에서 C-말단 방향), 및 중쇄 가변 도메인 VH와 경쇄 불변 도메인 CL로 구성된 펩티드 사슬 (VH-CL, N-에서 C-말단 방향)을 포함한다. 명확성을 위해, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인들이 교환되는 교차 Fab 분자에서, 중쇄 불변 도메인 1 CH1을 포함하는 펩티드 사슬이 본원에서 (교차) Fab 분자의 "중쇄"로 지칭된다. 역으로, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 불변 도메인이 교환되는 교차 Fab 분자에서, 중쇄 가변 도메인 VH를 포함하는 펩티드 사슬이 본원에서 (교차) Fab 분자의 "중쇄"로 지칭된다.

[0180] 이와 대조적으로, "통상적인" Fab 분자는 천연 형태의 Fab 분자, 즉, 중쇄 가변 및 불변 도메인(VH-CH1, N-에서

C-말단 방향)으로 구성된 중쇄 및 경쇄 가변 및 불변 도메인(VL-CL, N-에서 C-말단 방향)으로 구성된 경쇄를 포함하는 Fab 분자를 의미한다.

[0181] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단리된 핵산 분자 또는 구조체, 예를 들어, 전령 RNA(mRNA), 바이러스 유래 RNA, 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 통상적인 포스포디에스테르 결합 또는 통상적이지 않은 결합(예를 들어, 펩티드 핵산(PNA)에서 발견되는 것과 같은 아미드 결합)을 포함할 수 있다. 용어 "핵산 분자"는 폴리뉴클레오티드에 존재하는 임의의 하나 이상의 핵산 단편, 예를 들어, DNA 또는 RNA 단편을 지칭한다.

[0182] "단리된" 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오티드는 그 천연 환경으로부터 제거된 핵산 분자, DNA 또는 RNA를 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 목적을 위해 단리된, 벡터에 함유된 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오티드가 고려된다. 또 다른 단리된 폴리뉴클레오티드의 예는 이종 숙주 세포에서 유지되는 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 용액 중의 (부분적으로 또는 실질적으로) 정제된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드 분자를 보통 포함하는 세포 안에 있는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하지만, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 자연 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치에 존재하거나 또는 염색체 외부에 존재한다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사물, 뿐만 아니라 양성 및 음성 가닥 형태, 및 이중-가닥 형태를 포함한다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 합성적으로 생성된 상기와 같은 분자를 추가로 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 프로모터, 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결인자와 같은 조절 요소 일 수 있고 또는 이를 포함할 수 있다.

[0183] 본 발명의 참조 뉴클레오티드 서열에 적어도, 예를 들어 95% "동일한" 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 상기 참조 뉴클레오티드 서열의 각 100개 뉴클레오티드당 최대 5개의 점 돌연변이를 포함할 수 있음을 제외하고 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 상기 참조 서열과 동일함을 의미한다. 즉, 참조 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 95% 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위해서, 상기 참조 서열 중 뉴클레오티드의 5% 이하를 결실시키거나 또는 또 다른 뉴클레오티드로 치환하거나, 상기 참조 서열의 전체 뉴클레오티드의 최대 5%의 수의 뉴클레오티드를 상기 참조 서열에 삽입할 수 있다. 상기 참조 서열의 이러한 변경은 상기 참조 서열 내 잔기들 간에 개별적으로 또는 상기 참조 서열 내 하나 이상의 인접 그룹들 중에 산재된, 상기 참조 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치 또는 상기 말단 위치들 사이의 어디에서나 발생할 수 있다. 실제 문제로서, 임의의 특정한 폴리뉴클레오티드 서열이 본 발명의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한지 여부는 통상적으로 공지된 컴퓨터 프로그램, 예를 들어, 폴리펩티드에 대해 상기 논의된 것들(예를 들어 ALIGN-2)을 사용하여 측정할 수 있다.

[0184] 용어 "발현 카세트"는 표적 세포에서 특정 핵산의 전사를 허용하는 일련의 명시된 핵산 요소와 함께 재조합적으로 또는 합성적으로 생성되는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 이러한 재조합 발현 카세트를 플라스미드, 염색체, 미토콘드리아 DNA, 플라스미드 DNA, 바이러스 또는 핵산 단편에 통합시킬 수 있다. 전형적으로, 발현 벡터의 재조합 발현 카세트 부분은, 다른 서열들 중에서도, 전사되는 핵산 서열 및 프로모터를 포함한다. 특정 양상에서, 본 발명의 발현 카세트는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 분자 또는 이의 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0185] "벡터" 또는 "발현 벡터"란 용어는 "발현 구조체"와 동의어이며 표적 세포에서 작동 가능하게 연결된 특정 유전자의 발현을 도입하고 지시하는 데 사용되는 DNA 분자를 의미한다. 이 용어에는 자가-복제 핵산 구조체로서의 벡터 및 그것이 도입되는 숙주 세포의 게놈에 통합된 벡터가 포함된다. 본 발명의 발현 벡터는 발현 카세트를 포함한다. 발현 벡터는 다량의 안정한 mRNA의 전사를 가능하게 한다. 일단 이러한 발현 벡터가 표적 세포내에 있으면, 해당 유전자에 의해 인코딩되는 리보핵산 분자 또는 단백질이 세포 전사 및 /또는 번역 기작에 의해 생성된다. 한 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는 본 발명의 이중특이성 항원 결합 분자 또는 이의 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0186] 본원에서 사용되는 용어 "약"은 본 발명의 기술 분야의 당업자에게 널리 공지된 바와 같이, 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 지칭한다. 본원의 값 또는 매개변수에 대한 "약"의 지칭은 그 값 또는 매개변수 그 자체(per se)에 관한 실시형태들을 포함 (및 설명)한다.

[0187] "B 세포 증식성 장애"는 건강한 대상체의 B 세포 수와 비교하여 환자의 B 세포 수가 증가하는, 특히, B 세포 수의 증가가 원인 또는 질환의 특징인 질환을 의미한다. "CD20-양성 B 세포 증식성 장애"는 B 세포, 특히, (정상 B 세포에 더하여) 악성 B 세포가 CD20을 발현하는 B 세포 증식성 장애이다.

[0188] 예시적인 B 세포 증식성 장애에는 비호지킨 림프종(NHL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL, 예를 들어, 달리

언급이 없으면(NOS) 재발성 또는 불응성 DLBCL), 고등급 B 세포 림프종(HGBCL, 예를 들어, HGBCL NOS, 더블 히트 HGBCL 및 트리플 히트 HGBCL), 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종(PMBCL) 및 FL에서 발생하는 DLBCL(변형성 FL, trFL)); 1-3b 등급 FL을 포함하는 여포성 림프종(FL); 맨틀세포 림프종(MCL); 및 비장, 림프절 또는 림프절외 MZL을 포함하는 변연부 림프종(MZL)이 포함된다. 한 실시형태에서, CD20 양성 B 세포 증식성 장애는 재발성 또는 불응성 NHL(예를 들어, 재발성 또는 불응성 DLBCL, 재발성 또는 불응성 FL, 또는 재발성 또는 불응성 MCL)이다.

[0189] "불응성 질환"은 1차 요법에 대한 완전 관해가 없는 것으로 정의된다. 한 실시형태에서, 불응성 질환은 이전 요법에 대한 반응이 없거나 이전 요법의 6개월 이내에 재발되는 것으로 정의된다. 한 실시형태에서, 불응성 질환은 다음 중 하나 이상을 특징으로 한다: 1차 요법에 대한 최적의 반응을 진행성 질환(PD), 적어도 4주기의 1차 요법(예를 들어, 리툭시맙, 사이클로포스파미드, 독소루비신 하이드로클로라이드(하이드록시다우노루비신), 빈크리스틴 설페이트(Oncovin), 및 프레드니손, 또한 R-CHOP로 약칭) 후 최적의 반응을 안정적 질환(SD), 또는 적어도 6주기 후 최적의 반응을 부분 반응(PR), 그리고 부분 반응 후 생검으로 입증되는 잔류 질환 또는 질환 진행. "재발성 질환"은 1차 요법에 대한 완전 관해로 정의된다. 한 실시형태에서, 질환 재발은 생검에 의해 입증된다. 한 실시형태에서, 환자는 적어도 2가지의 선행 전신 치료 요법(안트라사이클린을 포함하는 적어도 하나의 선행 요법 및 항 CD20-지향 요법을 포함하는 적어도 하나를 포함) 이후에 재발했거나 이에 반응하지 않았다.

[0190] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물에는 가축(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 비인간 영장류, 예를 들어, 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 개체 또는 대상체는 인간이다. 일부 경우에, 대상체 집단 내의 각 대상체는 인간이다. 일부 경우에, 참조 대상체 집단 내의 각 대상체는 인간이다.

[0191] 본원에서 사용되는 "치료"(및 "치료하다" 또는 "치료하는 것"과 같은 이의 문법적 변형)는 치료를 받는 개체의 질환의 자연적 과정을 변경하려는 시도에 있어서의 임상적 개입을 의미하며, 예방을 위해 또는 임상 병리학 과정 중에 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과에는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 상기 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질환 진행 속도 감소, 상기 질환 상태의 개선 또는 경감, 그리고 차도 또는 개선된 예후가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태들에 있어서, 본 발명의 방법은 질환 또는 질환의 발달을 지연 또는 질환의 진행을 지연시키는데 이용된다.

[0192] 본원에서 사용된, 장애 또는 질환의 "진행 지연"은 질환 또는 장애(예를 들어, CD20-양성 B 세포 증식성 장애, 예를 들어, NHL, 예를 들어, DLBCL)의 진행을 보류, 방해, 지체, 저지, 안정화, 및/또는 연기하는 것을 지칭한다. 이러한 지연은 병력 및/또는 치료받는 개체에 따라 시간의 길이가 다양할 수 있다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 충분한 또는 유의미한 지연은, 사실상, 개체에서 질환이 발병하지 않는다는 점에서, 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 말기 암에서, 중추 신경계 (CNS) 전이의 발병이 지연될 수 있다.

[0193] "감소" 또는 "억제"는, 예를 들어, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 그 이상의 총 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 명확성을 위해, 이 용어는 0(또는 분석 방법의 검출 한계 미만)으로의 감소, 즉, 완전한 폐지 또는 제거를 포함한다. 특정 실시형태에서, 감소 또는 억제는, 표적 용량의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 일정한 예정된 용량에 비해 본 발명의 단계적 상향 투여 요법을 사용하여 이중특이성 항체로 치료 후 바람직하지 않은 사례, 예를 들어, 사이토카인 유도 독성(예를 들어, 사이토카인 방출 증후군(CRS)), 주입 관련 반응(IRR), 대식세포 활성화 증후군(MAS), 신경학적 독성, 중증 종양 용해 증후군(TLS), 호중구감소증, 혈소판 감소증, 상승된 간 효소 및/또는 중추신경계(CNS) 독성의 감소 또는 억제를 지칭할 수 있다. 다른 실시형태에서, 감소 또는 억제는 항체 Fc 영역에 의해 매개되는 항체의 효과기 기능, 예를 들어, 보체-의존성 세포 독성 (CDC), 항체-의존적 세포 독성 (ADCC) 및 항체-의존성 세포 식균작용 (ADCP)을 비롯한 효과기 기능을 지칭할 수 있다. 다른 실시형태에서, 감소 또는 억제는 치료 중인 CD20 양성 B 세포 증식성 장애의 증상(예를 들어, NHL(예를 들어, DLBCL), FL(예를 들어, 재발성 및/또는 불응성 FL 또는 변형성 FL), MCL, 고등급 B 세포 림프종 또는 PMLBCL), 전이의 존재 또는 크기, 또는 원발성 종양의 크기를 지칭할 수 있다.

[0194] 본원에서 사용되는 "투여"는 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 약학 조성물의 투여량을 대상체에게 제공하는 방법을 의미한다. 본원에 설명된 약학 조성물은 정맥내(예를 들어, 정맥내 주입에 의해) 투여될 수 있다.

[0195] 본원에서 사용된 바와 같이, "완충액"은 이의 산-염기 접합체 성분의 작용에 의해 pH에서 변화에 저항하는 완충된 용액을 지칭한다(본원에서 "완충제"라고도 함). 일부 실시형태에서, 본 발명의 완충제는 약 5 내지 약 6 범위의 pH를 갖는다. 본 발명에 사용하기 위한 예시적인 완충제에는 히스티딘(예를 들어, 히스티딘 HCl), 아세트산염, 인산염, 숙신산염 또는 이들의 조합이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 히스티딘은

히스티딘 염산염(히스티딘 HCl), 히스티딘 아세트산염, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼염기성 인산나트륨, 일염기성 인산칼륨, 이염기성 인산칼륨, 삼염기성 인산칼륨 또는 이들의 혼합물이다.

[0196] 본 발명에 따른 약학 조성물은 또한 하나 이상의 등장화제를 포함할 수 있다. "등장화제"라는 용어는 제형의 등장성을 조절하는 데 사용되는 약학적으로 허용되는 부형제를 의미한다. 제형은 보관성, 등장성 또는 고장성일 수 있다. 일반적으로 등장성은 용액의 삼투압과 관련이 있으며, 보통 인간 혈청의 삼투압(약 250-350 mOsmol/kg)과 관련이 있다. 본 발명에 따른 제형은 보관성, 등장성 또는 고장성일 수 있지만 바람직하게는 등장성일 것이다. 등장성 제형은 액체 또는 고체 형태(예를 들어, 동결 건조 형태)로부터 재구성된 액체이며, 비교되는 다른 용액, 예를 들어, 생리식염수 및 혈청과 동일한 등장성을 갖는 용액을 의미한다. 적합한 등장화제에는 염화나트륨 또는 염화칼륨과 같은 염, 글리세린 및 아미노산이나 당, 특히, 글루코스로 이루어진 군의 임의의 성분이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로 등장화제는 약 ≥200 mM의 양으로 사용된다.

[0197] 안정화제와 등장화제 내에는 2가지 역할을 모두 수행할 수 있는 화합물들의 군이 존재한다, 즉, 이들은 동시에 안정화제와 등장화제의 역할을 할 수 있다. 이에 대한 예는 당, 아미노산, 폴리올, 사이클로덱스트린, 폴리에틸렌글리콜 및 염의 군에서 찾을 수 있다. 동시에 안정화제 및 등장화제가 될 수 있는 당의 예로는 트레할로스가 있다.

[0198] 본원에서 사용되는 "계면활성제"는 표면 활성제, 바람직하게는, 비이온성 계면활성제를 지칭한다. 본원에 기재된 계면활성제의 예에는 폴리소르베이트(예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 85); 폴록사머(예를 들어, 폴록사머 188); TRITON®; 소듐 옥틸 글리코사이드; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일-, 또는 스테아릴-설포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일-, 또는 스테아릴-사르코신; 리놀레일-, 미리스틸-, 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코카미도프로필-, 리놀레아미도프로필-, 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아라미도프로필-베타인(예를 들어, 라우로아미도프로필); 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아라미도프로필-디메틸아민; 소듐 메틸 코코일-, 또는 디소듐 메틸 올레일-타우레이트; 및 MONAQUAT™ 계열(Mona Industries, Inc., Paterson, NJ); 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필 글리콜 및 에틸렌과 프로필렌 글리콜의 공중합체(예를 들어, PLURONIC® 유형 블록 공중합체, 예를 들어, PLURONIC® F-68); 등이 포함된다. 한 실시형태에서, 본원의 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS20)이다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 계면활성제는 폴록사머 188(P188)이다.

[0199] "방부제"는 제형에 선택적으로 포함되어 본질적으로 박테리아 작용을 감소시키고, 예를 들어, 다회 사용 제형의 생산을 용이하게 하기 위해 제형에 포함될 수 있는 화합물이다. 가능한 방부제의 예에는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤잘코늄 클로라이드(알킬기가 장쇄 화합물인 알킬벤질디메틸암모늄 클로라이드의 혼합물), 및 벤제토늄 클로라이드가 포함된다. 다른 유형의 방부제에는 페놀, 부틸, 벤질 알코올과 같은 방향족 알코올; 메틸이나 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜탄올 및 m-크레졸이 포함된다. 한 실시형태에서, 본 발명의 방부제는 벤질 알코올이다. 일부 실시형태에서, 제형에는 방부제가 포함되지 않는다.

[0200] "안정한" 약학 조성물이란 보관 시 내부의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)가 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 본질적으로 유지하는 약학 제형이다. 바람직하게는, 제형은 보관 시(예를 들어, 냉동 보관) 물리적, 화학적 안정성은 물론 생물학적 활성도 본질적으로 유지한다. 보관 기간은 일반적으로 제형의 예상 유통 기한에 따라 선택된다. 해당 기술 분야에서 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석 기술을 사용할 수 있으며, 예를 들어 Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, Pubs. (1991) 및 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)에 리뷰되어 있다. 안정성은 선택된 양의 빛 노출 및/또는 선택된 기간 동안의 온도에서 측정될 수 있다. 안정성은 응집체 형성 평가(예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피 사용, 탁도 측정 및/또는 육안 검사); ROS 형성의 평가(예를 들어, 광 스트레스 검정 또는 2,2'-아조비스(2-아미디노프로판) 디하이드로클로라이드(AAPH) 스트레스 검정); 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 특정 아미노산 잔기(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)의 Met 잔기)의 산화; 양이온 교환 크로마토그래피, 영상 모세관 등전점 초점(icIEF) 또는 모세관 구역 전기영동을 사용하여 전하 이질성 평가; 아미노 말단 또는 카르복시 말단 서열 분석; 질량 분광법 분석; 환원된 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체와 온전한 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체를 비교하기 위한 SDS-PAGE 분석; 펩티드 맵(예를 들어, 트립신 또는 LYS-C) 분석; 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 생물학적 활성 또는 표적 결합 기능(예를 들어, T 세포 및/또는 B 세포와의 결합) 평가;등을 포함하는 수많은 다른 방식으로 정성적 및/또는 정량적으

로 평가될 수 있다. 불안정성은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 응집, 탈아미드화(예를 들어, Asn 탈아미드화), 산화(예를 들어, Met 산화 및/또는 Trp 산화), 이성질화(예를 들어, Asp 이성질화), 클리핑/가수분해/단편화(예를 들어, 힌지 영역 단편화), 숙신이미드 형성, 짝지어지지 않은 시스테인, N-말단 연장, C-말단 가공, 글리코실화 차이 등.

[0201] 본 발명에 따른 제형과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "액체"는 대기압 하에서 적어도 약 2 내지 약 8℃의 온도에서 액체인 제형을 의미한다.

[0202] 본 출원에서, 달리 명시되지 않는 한, 사용된 기술은 다음과 같은 여러 잘 알려진 참조 자료에서 찾을 수 있다: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, 외, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, 외, 1990. Academic Press, San Diego, CA), 및 Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0203] 적절한 경우, 상업적으로 판매되는 키트와 시약을 사용하는 절차는 달리 언급되지 않는 한 일반적으로 제조업체가 정의한 프로토콜 및/또는 매개변수에 따라 수행된다. 따라서 본 방법 및 용도를 설명하기에 앞서, 본 발명이 설명된 특정 방법론, 프로토콜, 세포주, 동물 종 또는 속, 구조물 및 시약에 제한되지 않는다는 점을 이해해야 하며, 물론, 이들은 다양할 수 있다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 특정한 실시형태를 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한된다.

[0204] **III. 약학 조성물**

[0205] 본 발명은 낮은 농도의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)를 포함하는 약학 조성물 및, 예를 들어, B 세포 증식성 장애(예를 들어, 비호지킨 림프종, NHL)의 치료를 위한 이의 용도를 제공한다. 본 발명의 약학 조성물은 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)의 낮은 농도를 유지하도록 제형화될 수 있으며, 보관 및 임상 투여 중에 흡착으로 인한 단백질 손실에 대해 안정적이다. 흡착은 항체 농도가 낮은 경우 심각한 문제가 될 수 있으며, 임상 투여 전에 추가 희석 및 취급이 필요하고 역가 값이 낮아질 수 있다. 글로피타맙은 2.5 mg, 10 mg(단계적 분할 용량) 및 30 mg 유지 용량(목표 용량, 고정 용량)으로 투여된다. 글로피타맙은 0.9% 또는 0.45% 염화나트륨으로 희석한 후 IV 백 주입을 통한 IV 투여를 목적으로 한다. IV 백에서 용량은 0.05 mg/ml 내지 0.6 mg/ml의 투여 용액 농도로 가능하다.

[0206] 한 실시형태에서, 다음을 포함하는 액상 약학 조성물이 제공되며:

[0207] 약 1 내지 25 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0208] 약 10 내지 50 mM의 완충제;

[0209] 약 ≥200 mM의 등장화제;

[0210] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0211] 약 ≥ 0.2 mg/ml의 계면활성제;

[0212] pH가 약 5.0 내지 약 6.0 범위이다.

[0213] 한 실시형태에서, 다음을 포함하는 액상 약학 조성물이 제공되며:

[0214] 약 5 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0215] 약 10 내지 50 mM의 완충제;

[0216] 약 ≥200 mM의 등장화제;

[0217] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0218] 약 ≥ 0.2 mg/ml의 계면활성제;

[0219] pH가 약 5.0 내지 약 6.0 범위이다.

[0220] 한 실시형태에서, 다음을 포함하는 액상 약학 조성물이 제공되며:

[0221] 약 0.9 내지 1.1 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0222] 약 10 내지 50 mM의 완충제;

[0223] 약 ≥200 mM의 등장화제;

[0224] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0225] 약 ≥ 0.2 mg/ml의 계면활성제;

[0226] pH가 약 5.0 내지 약 6.0 범위이다.

[0227] 한 실시형태에서, 다음을 포함하는 액상 약학 조성물이 제공되며:

[0228] 약 1 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0229] 약 10 내지 50 mM의 완충제;

[0230] 약 ≥200 mM의 등장화제;

[0231] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0232] 약 ≥ 0.2 mg/ml의 계면활성제;

[0233] pH가 약 5.0 내지 약 6.0 범위이다.

[0234] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 농도는 약 1 내지 5 mg/ml 범위이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 농도는 약 0.5, 약 0.6, 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9, 약 1 mg/ml, 약 1.1 mg/ml, 약 1.5 mg/ml, 약 2 mg/ml, 약 3 mg/ml, 약 4 mg/ml 또는 약 5 mg/ml이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 농도는 약 6 mg/ml, 약 7 mg/ml, 약 8 mg/ml, 약 9 mg/ml, 약 10 mg/ml, 약 11 mg/ml, 약 12 mg/ml, 약 13 mg/ml, 약 14 mg/ml, 약 15 mg/ml, 약 16 mg/ml, 약 17 mg/ml, 약 18 mg/ml, 약 19 mg/ml, 약 20 mg/ml, 약 21 mg/ml, 약 22 mg/ml, 약 23 mg/ml, 약 24 mg/ml, 약 25 mg/ml, 약 26 mg/ml, 약 27 mg/ml, 약 28 mg/ml, 약 29 mg/ml, 또는 약 30 mg/ml이다.

[0235] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 농도는 약 0.9-1.1 mg/ml 범위이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 농도는 약 1 mg/ml이다.

[0236] 한 실시형태에서 액체 약학 조성물은 CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함하는 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)를 포함하며, 이는 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0237] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0238] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0239] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0240] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0241] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0242] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0243] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0244] 한 실시형태에서, 상기 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 서열 번호 7에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 추가 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)은, CD20에 특이적으로 결합하고 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적

어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0245] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 CD3에 특이적으로 결합하고 다음을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다:

[0246] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0247] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0248] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0249] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0250] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0251] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0252] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0253] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0254] 한 실시형태에서, 상기 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 서열 번호 15에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 추가 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)은, CD3에 특이적으로 결합하고 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0255] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 다음을 포함하고:

[0256] a) 다음을 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0257] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0258] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0259] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0260] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0261] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0262] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0263] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0264] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0265] b) 다음을 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0266] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0267] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0268] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0269] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

[0270] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0271] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0272] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0273] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0274] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 다음을 포함하고:

[0275] (i) CD20에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및

[0276] (ii) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인.

[0277] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)의 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 항체 단편, 특히, Fab 분자 또는 scFv 분자, 더욱 특히 Fab 분자이다. 한 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)의 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환된(즉, 서로 대체된) 교차 Fab 분자이다.

[0278] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)의 CD20에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 항체 단편, 특히, Fab 분자 또는 scFv 분자, 더욱 특히 Fab 분자이다. 한 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)의 CD20에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 통상적인 Fab 분자이다.

[0279] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및 CD3에 특이적으로 결합하는 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 CD20에 특이적으로 결합하는 제2 및 제3 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서, 제1 항원 결합 도메인은 교차 Fab 분자이고, 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 각각 통상적인 Fab 분자이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 Fc 도메인을 추가로 포함한다. 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 본원에서 설명하는 바와 같은 Fc 영역 및/또는 항원 결합 도메인에 변형을 포함할 수 있다. 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 Fc 수용체 및/또는 효과기 기능에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(EU 넘버링)를 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

[0280] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 다음을 포함한다:

[0281] (i) Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합된, CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인;

[0282] (ii) Fab 중쇄의 C-말단에서 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합된, CD20에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인; 및

[0283] (iii) Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된, CD20에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인.

[0284] 한 특정 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 다음을 포함한다:

[0285] a) CD3, 특히 CD3 엡실론에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 분자로서; Fab 경쇄와 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되는 제1 Fab 분자;

[0286] b) CD20에 특이적으로 결합하는 제2 및 제3 Fab 분자로서, 제2 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서 위치 124의 아미노산이 리신(K)(Kabat에 따른 넘버링)으로 치환되고 위치 123의 아미노산이 리신(K) 또는 아르기닌(R), 특히 아르기닌(R)(Kabat에 따른 넘버링)으로 치환되고, 제2 Fab 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산이 글루탐산(E)(EU 넘버링)으로 치환되고 위치 213의 아미노산이 글루탐산(E)(EU 넘버링)으로 치

환된 제2 Fab 및 제3 Fab 분자; 및

[0287] c) 안정적으로 결합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인.

[0288] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 CD20에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 도메인, 및 CD3에 특이적으로 결합하는 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0289] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 CD20에 대해 2가이고 CD3에 대해 1가이다.

[0290] 한 실시형태에서 a)의 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 c)의 Fc 도메인의 서브유닛 중 하나의 N-말단에 융합되고, b)의 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 a)의 제1 Fab 분자의 중쇄의 N-말단에 융합되고, b)의 제3 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 c)의 Fc 도메인의 다른 하나의 서브유닛의 N-말단에 융합된다. 한 실시형태에서, a)의 제1 Fab 분자는 서열 번호 15의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 16의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0291] 또한 추가 실시형태에서, a)의 제1 Fab 분자는 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열과 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0292] 한 실시형태에서, b)의 제2 Fab 분자 및 제3 Fab 분자는 각각 서열 번호 7의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 8의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0293] 한 실시형태에서, b)의 제2 Fab 분자 및 제3 Fab 분자는 각각 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0294] 한 특정 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 서열 번호 17의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열 번호 18의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열 번호 19의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 및 서열 번호 20의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함한다. 한 추가의 특정 실시형태에서, 이중특이성 항체는 서열 번호 17의 폴리펩티드 서열, 서열 번호 18의 폴리펩티드 서열, 서열 번호 19의 폴리펩티드 서열 및 서열 번호 20의 폴리펩티드 서열을 포함한다. 한 추가의 특정 실시형태에서, 이중특이성 항체는 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 하나의 폴리펩티드 사슬, 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 하나의 폴리펩티드 사슬, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 하나의 폴리펩티드 사슬, 및 각각이 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함한다.

[0295] 특정 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 PCT 공개공보 WO 2016/020309 및 유럽 특허 출원 제 EP15188093 및 EP16169160 (각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨))에 기술되어 있다.

[0296] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 CD3ε에 특이적으로 결합한다.

[0297] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 결합을 위해 항체 H2C (PCT 공개공보 WO2008/119567), 항체 V9 (Rodrigues 외, *Int J Cancer Suppl.* 7, 45-50 (1992) 및 US 특허 제6,054,297), 항체 FN18 (Nooij 외, *Eur J Immunol.* 19, 981-984 (1986)), 항체 SP34 (Pessano 외, *EMBO J.* 4, 337-340 (1985)), 항체 OKT3 (Kung 외, Science 206, 347-349 (1979)), 항체 WT31 (Spits 외, *J Immunol.* 135, 1922 (1985)), 항체 UCHT1 (Burns 외, *J Immunol.* 129, 1451-1457 (1982)), 항체 7D6 (Coulie 외, *Eur J Immunol.* 21, 1703-1709 (1991)) 또는 항체 Leu-4와 경쟁할 수 있다. 일부 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 또한 WO 2005/040220, WO 2005/118635, WO 2007/042261, WO 2008/119567, WO 2008/119565, WO 2012/162067, WO 2013/158856, WO 2013/188693, WO 2013/186613, WO 2014/110601, WO 2014/145806, WO 2014/191113, WO 2014/047231, WO 2015/095392, WO 2015/181098, WO 2015/001085, WO 2015/104346, WO 2015/172800, WO 2016/020444, 또는 WO 2016/014974에 기재된 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 모이어티를 포함할 수 있다.

[0298] 일부 실시형태에서, 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 리툭시맙, 오비누투주맙, 오크렐리주맙, 오파투무맙, 오카라투주맙, 벨투주맙 및 우블리툭시맙 유래의 항체 또는 항원 결합 모이어티를 포함할 수

있다.

[0299] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 글로피타맙이다.

[0300] 일부 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 본원에서 명명된 항체의 제네릭, 바이오시밀러 또는 비교불가능한 생물학적 버전을 포함할 수 있다.

[0301] 한 실시형태에서 본원에 제공된 액상 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 글로피타맙이다. 글로피타맙(WHO 약물 정보(국제 일반의약품명), 권장 INN: 목록 83, 2020, 제34권, 제1호, 39페이지, CD20-TCB, RO7082859 또는 RG6026으로도 알려짐; CAS #: 2229047-91-8)은 B 세포 상의 CD20에 2가로 결합하고 T 세포 상의 CD3, 특히, CD3 엡실론 사슬(CD3e)에 1가로 결합하는 2:1 분자 구성을 갖는 새로운 T 세포 관여 이중특이성(TCB) 전장 항체이다. CD3 결합 영역은 가요성 링커를 통해 CD20 결합 영역 중 하나와 머리부터 꼬리까지의 방식으로 융합된다. 이 구조는 1:1 구성의 다른 CD20-CD3 이중특이성 항체 대비 글로피타맙이 더 우수한 시험관내 역가를 가지게 하며 전임상 DLBCL 모델에서 뛰어난 항암 효능을 나타내게 한다. CD20 2원자가는 경쟁하는 항-CD20 항체들이 존재하더라도 그 역가를 유지하므로 이들 제제로의 사전 치료 또는 이들 제제와의 병용 치료의 기회를 제공한다. 글로피타맙은 FcgR과 C1q에 대한 결합을 완전히 없앤, 조작된 이종이량체 Fc 영역을 포함한다. 이는 인간의 CD20을 발현하는 종양 세포와 T 세포 상의 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 CD3e에 동시에 결합함으로써, T 세포 활성화, 증식 및 사이토카인 방출과 더불어 종양 세포 용해를 유도한다. 글로피타맙을 매개로 한 B 세포 용해는 CD20 특이적이며 CD20 발현이 없는 경우 또는 T 세포가 CD20 발현 세포에 동시에 결합(가교)하지 않는 경우에는 발생하지 않는다. T 세포는 살해 이외에도 CD3 가교 결합으로 인해 활성화되는데, 이는 T 세포 활성화 마커(CD25 및 CD69), 사이토카인 방출(IFNγ, TNFα, IL-2, IL-6, IL-10), 세포독성 과립 방출(그랜자임 B) 및 T 세포 증식의 증가를 통해 검출된다. 글로피타맙의 분자 구조의 개략도가 도 2에 도시되어 있다. 글로피타맙의 서열은 표 2에 요약되어 있다.

[0302] **표 2. 글로피타맙에 대한 서열 번호**

글로피타맙에 대한 서열 번호			
CD3 중쇄		CD3 경쇄	
서열 번호	설명	서열 번호	설명
9	HVR-H1 (Kabat)	12	HVR-L1 (Kabat)
10	HVR-H2 (Kabat)	13	HVR-L2 (Kabat)
11	HVR-H3 (Kabat)	14	HVR-L3 (Kabat)
15	VH	16	VL
CD20 중쇄		CD20 경쇄	
1	HVR-H1 (Kabat)	4	HVR-L1 (Kabat)
2	HVR-H2 (Kabat)	5	HVR-L2 (Kabat)
3	HVR-H3 (Kabat)	6	HVR-L3 (Kabat)
7	VH	8	VH
전장 항체			
17	HC-놉	18	HC-홀
19	LC-CD3	20	LC-CD20

[0303]

[0304] 일부 실시형태에서, 완충제는 히스티딘, 아세트산염, 인산염, 숙신산염, 시트르산염 또는 이들의 조합이다. 일

부 실시형태에서, 히스티딘은 히스티딘 아세트산염이다. 대안적인 완충제에는 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼염기성 인산나트륨, 일염기성 인산칼륨, 이염기성 인산칼륨, 삼염기성 인산칼륨 또는 이들의 혼합물이 포함된다. 한 특정 실시형태에서 액상 약학 조성물은 히스티딘 완충액, 즉, 히스티딘, 일반적으로 L-히스티딘을 완충제로서 함유하는 완충액을 포함한다. 한 특정 실시형태에서 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다, 즉, 완충액은 L-히스티딘 또는 L-히스티딘과 L-히스티딘 HCl의 혼합물을 포함하고 염산으로 pH가 조정된다. L-히스티딘 HCl 완충액은 적당량의 L-히스티딘과 L-히스티딘 염산염을 물에 용해시키거나, 적당량의 L-히스티딘을 물에 용해시킨 후 염산을 첨가하여 pH를 원하는 값으로 조정하여 제조할 수 있다.

[0305] 특정한 경우에, 완충제(예를 들어, 히스티딘, 예를 들어, L-히스티딘 HCl)의 농도는 10 mM 내지 50 mM이다. 예를 들어, 완충제는 10 mM 내지 15 mM, 또는 15 mM 내지 20 mM, 예를 들어, 6 mM 내지 18 mM, 7 mM 내지 16 mM, 8 mM 내지 15 mM, 또는 9 mM 내지 12 mM, 예를 들어, 약 10 mM, 약 11 mM, 약 12 mM, 약 13 mM, 약 14 mM, 약 15 mM, 약 16 mM, 약 17 mM, 약 18 mM, 약 19 mM, 또는 약 20 mM 일 수 있다. 특정한 경우에, 완충제(예를 들어, 히스티딘, 예를 들어, L-히스티딘 HCl)의 농도는 약 15 내지 25 mM이다. 한 실시형태에서, 완충제(예를 들어, 히스티딘, 예를 들어, L-히스티딘 HCl)는 약 20 mM의 농도이다.

[0306] 사용된 완충액에 상관없이 pH는 당업계에 알려진 산 또는 염기, 예를 들어, 염산, 아세트산, 인산, 황산 및 시트르산, 수산화나트륨 및 수산화칼륨을 사용하여 약 5.0 내지 약 6.0 사이의 범위, 특히, 약 5.2 내지 약 5.8 사이의 값으로 조정될 수 있다.

[0307] 본 발명의 발명자들은 다음을 포함하는 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)가 pH가 약 5.2 내지 약 5.8인 조성물에서 특히 안정함을 발견했다:

[0308] a) 다음을 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0309] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0310] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0311] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0312] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0313] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0314] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0315] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0316] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0317] b) 다음을 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0318] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0319] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0320] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0321] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

[0322] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0323] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0324] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0325] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0326] 한 실시형태에서 완충제는 약 5.2 내지 약 5.8의 pH, 특히 약 5.5의 pH를 제공한다.

[0327] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 당, 아미노산 또는 염과 같은 등장화제를 포함한다. 등장화제가 당인 실시형태에서, 당은 예를 들어, 수크로스, 글루코스, 글리세롤 또는 트레할로스일 수 있다. 특정 실시형태에서, 당은 수크로스, 선택적으로 D-수크로스이다. 일부 실시형태에서 등장화제는 수크로스 또는 염화나트륨이다. 등장화제(예를 들어, 당, 예를 들어, 수크로스)는 적어도 약 ≥200 mM의 농도일 수 있다. 예를 들어, 등장화제(예를 들

어, 당, 예를 들어, 수크로스)는, 예를 들어, 200 mM 내지 220 mM, 220 mM 내지 240 mM, 240 mM 내지 260 mM, 260 mM 내지 280 mM, 280 mM 내지 300 mM, 300 mM 내지 320 mM, 320 mM 내지 340 mM, 340 mM 내지 360 mM, 360 mM 내지 380 mM, 380 mM 내지 400 mM, 400 mM 내지 420 mM, 420 mM 내지 440 mM, 440 mM 내지 460 mM, 460 mM 내지 480 mM, 또는 480 mM 내지 500 mM, 예를 들어, 200 mM 내지 300 mM, 예를 들어, ,약 200 mM, 약 210 mM, 약 220 mM, 약 230 mM, 약 240 mM, 약 250 mM, 약 260 mM, 약 270 mM, 약 280 mM, 약 290 mM, 약 300 mM, 약 350 mM, 약 400 mM, 약 450 mM, 또는 약 500 mM의 농도일 수 있다. 일부 실시형태에서, 등장화제의 농도는 약 200 mM 내지 280 mM이다. 일부 실시형태에서, 등장화제의 농도는 약 240 mM이다. 특정 실시형태에서, 등장화제는 수크로스이며 적어도 약 200 mM의 농도, 즉, 약 ≥200 mM의 농도로 존재한다. 다른 특정 실시형태에서, 등장화제는 수크로스 (예를 들어, D-수크로스)이고 약 200 mM – 280 mM의 농도로 존재한다. 한 특정 실시형태에서, 등장화제는 수크로스 (예를 들어, D-수크로스)이고 약 240 mM의 농도로 존재한다.

[0328] 일부 실시형태에서 액상 약학 조성물은 안정화제로서 메티오닌을 포함한다.

[0329] 안정화제 메티오닌은 적합한 농도로 사용할 수 있다. 예를 들어, 전술한 약학 조성물의 일부 실시형태에서, 안정화제(예를 들어, 메티오닌)의 농도는 약 0.01 mM 내지 약 15 mM, 예를 들어, 약 0.01 mM, 약 0.05 mM, 약 0.1 mM, 약 0.2 mM, 약 0.3 mM, 약 0.4 mM, 약 0.5 mM, 약 0.6 mM, 약 0.7 mM, 약 0.8 mM, 약 0.9 mM, 약 1 mM, 약 2 mM, 약 3 mM, 약 4 mM, 약 5 mM, 약 6 mM, 약 7 mM, 약 8 mM, 약 9 mM, 약 10 mM, 약 11 mM, 약 12 mM, 약 13 mM, 약 14 mM, 또는 약 15 mM이다.

[0330] 특정 실시형태에서, 메티오닌의 농도는 약 5 mM 내지 15 mM이다. 특정 실시형태에서, 메티오닌의 농도는 약 10 mM이다.

[0331] 본원에 설명된 모든 약학 조성물은 계면활성제를 포함할 수 있다. 임의의 적합한 계면활성제가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 계면활성제는 비이온성 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트(폴리옥시에틸렌(n) 소르비탄 모노라우레이트), 폴록사머, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 알킬 페닐 폴리옥시에틸렌 에테르 또는 이들의 조합)이다. 일부 실시형태에서, 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트(예를 들어, 폴리소르베이트 20(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우레이트(PS20), TWEEN 20®; 예를 들어, 초정제 PS20(더 높은 순도를 위해 전용 플래시 크로마토그래피 공정을 거친 PS20으로 Avantor Performance Materials, LLC(Center Valley, PA, US)에서 구입 가능)) 또는 폴리소르베이트 80(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레에이트(PS80), 예를 들어, TWEEN 80®; 예를 들어, 초정제 PS80(Avantor)))이다. 특정 실시형태에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20이다. 다른 실시형태에서, 비이온성 계면활성제는 폴록사머(예를 들어, 폴록사머 188, 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜))이다.

[0332] 약학적 계면활성제는 적어도 약 ≥ 0.2 mg/ml의 농도, 즉, 적어도 약 ≥ 0.02 % (w/v)의 농도일 수 있다.

[0333] 본원에 기재된 약학 조성물에 관한 일부 실시형태에서, 계면활성제(예를 들어, PS20 또는 P188)의 농도는 약 0.01% (w/v) 내지 약 2% (w/v), 예를 들어, 약 0.01%, 약 0.02%, 약 0.03%, 약 0.04%, 약 0.05%, 약 0.06%, 약 0.07%, 약 0.08%, 약 0.09%, 약 0.1%, 약 0.15%, 약 0.2%, 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 약 1%, 약 1.1%, 약 1.2%, 약 1.3%, 약 1.4%, 약 1.5%, 약 1.6%, 약 1.7%, 약 1.8%, 약 1.9%, 또는 약 2%(w/v)이다.

[0334] 일부 실시형태에서, 계면활성제(예를 들어, PS20 또는 P188)의 농도는 약 0.1-1 mg/ml, 즉, 0.01 % (w/v) 내지 약 0.1% (w/v)이다. 일부 실시형태에서, 계면활성제(예를 들어, PS20 또는 P188)의 농도는 약 0.2-1 mg/ml, 즉, 0.02 % (w/v) 내지 약 0.1% (w/v)이다. 일부 실시형태에서, 계면활성제(예를 들어, PS20 또는 P188)의 농도는 약 0.2-0.8 mg/ml, 즉, 0.02 % (w/v) 내지 약 0.08% (w/v)이다. 일부 실시형태에서, 계면활성제(예를 들어, PS20 또는 P188)의 농도는 약 0.5 mg/ml, 즉, 0.05 % (w/v)이다.

[0335] 특정 실시형태에서, 계면활성제는 P188이고, P188의 농도는 약 0.05% (w/v), 0.07% (w/v) 또는 0.1% (w/v)이다.

[0336] 특정 실시형태에서, 계면활성제는 PS20이고, PS20의 농도는 적어도 약 ≥ 0.2 mg/ml, 즉, 적어도 약 ≥ 0.02 % (w/v) 농도의 PS20이다.

[0337] 특정 실시형태에서, 계면활성제는 PS20이고, PS20의 농도는 약 0.2-0.8 mg/ml, 즉, 약 0.02 % (w/v) 내지 약 0.08% (w/v)이다. 특정 실시형태에서, 계면활성제는 PS20이고, PS20의 농도는 약 0.5 mg/ml, 즉, 0.05% (w/v)이다. 특정 실시형태에서, 계면활성제는 PS20이고, PS20의 농도는 적어도 약 ≥ 0.02 % (w/v)의 PS20이다. 특정 실시형태에서, 계면활성제는 PS20이고, PS20의 농도는 약 0.02 % (w/v) 내지 약 0.08% (w/v)이다. 특정 실시형

태에서, 계면활성제는 PS20이고, PS20의 농도는 약 0.05% (w/v)이다.

[0338] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0339] 다음을 포함하는 약 1 내지 5 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0340] a) 다음을 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0341] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0342] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0343] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0344] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0345] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0346] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0347] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0348] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0349] b) 다음을 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0350] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0351] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0352] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0353] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

[0354] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0355] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0356] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0357] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3;

[0358] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0359] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0360] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0361] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0362] pH는 약 5 내지 약 6이다.

[0363] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0364] 다음을 포함하는 약 1 내지 5 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0365] a) 다음을 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0366] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0367] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0368] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0369] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0370] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0371] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0372] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0373] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0374] b) 다음을 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0375] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0376] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0377] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0378] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

[0379] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0380] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0381] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0382] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3;

[0383] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0384] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0385] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0386] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0387] pH는 약 5.2 내지 약 5.8이다.

[0388] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0389] 다음을 포함하는 약 0.9 내지 1.1 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙):

[0390] a) 다음을 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0391] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0392] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0393] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0394] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0395] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0396] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0397] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0398] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0399] b) 다음을 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0400] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0401] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0402] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0403] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

[0404] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0405] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0406] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0407] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3;

[0408] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0409] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0410] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0411] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0412] pH는 약 5.2 내지 약 5.8이다.

[0413] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0414] 다음을 포함하는, 약 1 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0415] a) 다음을 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0416] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0417] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0418] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0419] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0420] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0421] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0422] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0423] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0424] b) 다음을 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0425] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0426] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0427] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0428] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

[0429] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0430] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0431] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0432] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3;

[0433] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0434] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0435] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0436] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0437] pH는 약 5.2 내지 약 5.8이다.

[0438] 한 실시형태에서, 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0439] 다음을 포함하는, 약 1 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0440] a) 다음을 포함하는, CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0441] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0442] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0443] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0444] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0445] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0446] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0447] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0448] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0449] b) 다음을 포함하는, CD3에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0450] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0451] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0452] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0453] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

[0454] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0455] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0456] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0457] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3;

[0458] 약 20 mM의 히스티딘 완충액;

[0459] 약 240 mM의 수크로스;

[0460] 약 10 mM의 메티오닌; 및

[0461] 약 0.5 mg/ml의 PS20,

[0462] pH는 약 5.5이다.

[0463] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0464] 다음을 포함하는 약 1 내지 5 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0465] (i) CD20에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및

[0466] (ii) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인;

[0467] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0468] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0469] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0470] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0471] pH는 약 5.2 내지 약 5.8이다.

[0472] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0473] 다음을 포함하는, 약 0.9 내지 약 1.1 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체;

[0474] (i) CD20에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및

[0475] (ii) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인;

[0476] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0477] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0478] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0479] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0480] pH는 약 5.2 내지 약 5.8이다.

[0481] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0482] 다음을 포함하는, 약 1 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0483] (i) CD20에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및

[0484] (ii) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인;

[0485] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0486] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0487] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0488] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0489] pH는 약 5.2 내지 약 5.8이다.

[0490] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0491] 다음을 포함하는, 약 1 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙);

[0492] (i) CD20에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및

[0493] (ii) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인;

[0494] 약 20 mM의 히스티딘 완충액;

[0495] 약 240 mM의 수크로스;

[0496] 약 10 mM의 메티오닌; 및

[0497] 약 0.5 mg/ml의 PS20,

[0498] pH는 약 5.5이다.

[0499] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0500] 약 1 내지 5 mg/ml의 글로피타맙,

[0501] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0502] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0503] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0504] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0505] pH는 약 5.2 내지 약 5.8이다.

[0506] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0507] 약 0.9 내지 약 1.1 mg/ml의 글로피타맙,

[0508] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0509] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0510] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0511] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0512] pH는 약 5.2 내지 약 5.8이다.

[0513] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0514] 약 1 mg/ml의 글로피타맙;

[0515] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0516] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0517] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0518] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0519] pH는 약 5.2 내지 약 5.8이다.

[0520] 한 실시형태에서, 본 발명에 따른 액상 약학 조성물은 다음을 포함하고:

[0521] 약 1 mg/ml의 글로피타맙;

[0522] 약 20 mM의 히스티딘 완충액;

[0523] 약 240 mM의 수크로스;

[0524] 약 10 mM의 메티오닌; 및

[0525] 약 0.5 mg/ml의 PS20,

[0526] pH는 약 5.5이다.

[0527] 이러한 제형에는 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제가 포함될 수도 있다. 미생물의 존재를 방지하려면 살균 절차를 거치거나 다양한 항균 및 항진균제(예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산 등)를 첨가해야 한다. 방부제는 일반적으로 약 0.001 내지 약 2%(w/v)의 양으로 사용된다. 방부제에는 에탄올, 벤질 알코올, 페놀, m-크레졸, p-클로르-m-크레졸, 메틸 또는 프로필 파라벤, 및 벤잘코늄 클로라이드 등이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0528] **IV. 본 발명의 약학 조성물에 사용하기 위한 치료제**

[0529] *A. 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체*

[0530] 본 발명은 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 T 세포-관여 이중특이성 항체(TCBs), 예를 들어, 글로피타맙)의 새로운 약학 조성물을 제공한다. 한 실시형태에서, 항체는 단일클론 항체이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 다중클론 항체이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 인간 항체이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 인간화 항체이다. 한 실시형태에서 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 키메라 항체이다. 한 실시형태에서 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 전장 항체이다. 한 실시형태에서 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 IgG-분류 항체, 특히 IgG1 하위분류 항체이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어,

글로피타맙)는 재조합 항체이다.

[0531] 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 항체 단편을 포함한다. 항체 단편은, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')$_2$, Fv, 및 scFv 단편, 및 하기 기재된 기타 단편들을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 항체 단편들에 대한 검토는 Hudson 외, *Nat. Med.* 9:129-134(2003)을 참조한다. scFv 단편들의 검토는, 예를 들어, Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); WO 93/16185; 그리고 미국 특허 제5,571,894 및 5,587,458을 또한 참고한다. 구조 수용체(salvage receptor) 결합 에피토프 잔기를 포함하고 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')$_2$ 단편에 대한 논의는 미국 특허 제5,869,046을 참조하라. 한 실시형태에서, 항체 단편은 Fab 단편 또는 scFv 단편이다.

[0532] 디아바디는 2가 또는 이중특이성일 수 있는 2개의 항원 결합 부위가 있는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson 외, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 및 Hollinger 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)를 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디 또한 Hudson 외, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)에 기재되어 있다.

[0533] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시형태들에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다(Domantis, Inc., Waltham, MA; *예를 들어,* 미국 특허 제6,248,516 B1 참조).

[0534] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같이, 온전한 항체의 단백질분해 소화, 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포(예를 들어, 대장균 또는 파지)에 의한 생산을 포함한(그러나 이에 제한되지 않음) 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0535] 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는, *예를 들어,* 미국 특허 제4,816,567; 및 Morrison 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))에 기재되어 있다. 한 예에서, 키메라 항체는 비인간 가변 영역(예를 들어, 마우스, 랫트, 햄스터, 토끼 또는 비인간 영장류, 예를 들어, 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 한 추가 예에서, 키메라 항체는 분류 또는 하위분류가 모 항체의 분류로부터 변화되어 있는 "분류 전환된" 항체이다. 키메라 항체는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0536] 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 비-인간 모 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서 인간에 대한 면역원성을 감소시키기 위해 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 또는 그 이상의 가변적 도메인을 포함하는데, HVR들, 예를 들어, CDR들(또는 이의 부분들)는 비-인간 항체로부터 유도되고, FRs (또는 이의 부분들)은 인간 항체 서열로부터 유도된다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 불변 영역의 최소한 일부분을 또한 포함할 것이다. 일부 실시형태에서, 인간화 항체에서 일부 FR 잔기는 비-인간 항체(예를 들어, HVR 잔기가 유도된 항체)의 대응 잔기로 대체되어, 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화도가 복원 또는 개선된다.

[0537] 인간화 항체 및 이의 제조 방법은, *예를 들어,* Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633(2008)에 논의되어 있으며, *예를 들어,* Riechmann 외, *Nature* 332:323-329(1988); Queen 외, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033(1989); 미국 특허 제5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; Kashmiri *외, Methods* 36:25-34(2005)(특이성 결정 영역(SDR) 이식을 기재); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498(1991)("표면노출잔기변형(resurfacing)"을 기재); Dall'Acqua 외, *Methods* 36:43-60(2005)("FR 셔플링"을 기재); 및 Osbourn 외, *Methods* 36:61-68(2005) 및 Klimka 외, *Br. J. Cancer*, 83:252-260(2000)(FR 셔플링으로의 "유도된 선별" 접근법을 기재)에 상세히 기재되어 있다.

[0538] 인간화에 이용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 다음을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: "최적-적합 (best-fit)" 방법을 이용하여 선별된 프레임워크 영역 (예를 들어, Sims 외, *J. Immunol.* 151:2296 (1993) 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변적 영역의 특정 하위 집단의 인간항체의 공통 서열로부터 유도된 프레임워크영역 (예를 들어, Carter 외, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 그리고 Presta 외, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993) 참조); 인간 성숙 (체세포 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역 (예를 들어, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 참조); 그리고 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유도된 프레임워크 영역(예를 들어, Baca 외, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok 외, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996) 참조).

[0539] 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 해당 분야에 공지된 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74(2001) 및 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459(2008)에 기재되어 있다.

[0540] 인간 항체는 항원 공격에 반응하여 온전한 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 온전한 항체를 생산하도록 변형된 유전자삽입 동물에 면역원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 이러한 동물은 일반적으로 내인성 면역글로불린 병소를 대체하는, 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체에 무작위로 통합된, 인간 면역글로불린 병소의 전체 또는 일부를 포함한다. 이러한 유전자삽입 마우스에서 상기 내인성 면역글로불린 좌위는 일반적으로 비활성화 되어 있다. 유전자삽입 동물로부터 인간 항체를 획득하는 방법은 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125(2005)을 참고한다. 또한, 예를 들어, XENOMOUSE™ 기술을 기재하는 미국 특허 제6,075,181 및 6,150,584; HuMab® 기술을 기재하는 미국 특허 제5,770,429; K-M MOUSE® 기술을 기재하는 미국 특허 제7,041,870, 그리고 VelociMouse® 기술을 기재하는 미국 특허출원 공개공보 US 2007/0061900)를 참고한다. 이러한 동물에 의해 생성된 손상되지 않은 항체로부터 얻은 인간 가변 영역은 예를 들어, 상이한 인간 불변 영역과 결합시킴으로써 추가로 변형될 수 있다.

[0541] 인간 항체는 하이브리도마 기반 방법으로도 만들 수 있다. 인간 단일클론 항체를 만들기 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 설명된 바 있다. (예를 들어, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001(1984); Brodeur 외, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner 외, *J. Immunol.*, 147: 86(1991) 참고) 인간 B 세포 하이브리도마 기술을 통하여 생성된 인간 항체가 Li 외, *roc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)에서 설명된다. 추가 방법들은 예를 들면, 미국 특허 제7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터 단일클론 인간 IgM 항체의 생산을 설명) 및 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (인간-인간 하이브리도마를 설명)에서 설명된 것들을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술(Trioma 기술)은 또한 Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937(2005) 및 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91(2005)에 기재되어 있다.

[0542] 인간 항체는 또한 인간 유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선별된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리함으로써 생성될 수 있다. 그런 다음 이러한 가변 도메인 서열은 원하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선별하기 위한 기술은 아래에서 설명된다.

[0543] 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)에 포함된 결합 도메인들은 원하는 활성 또는 활성들을 갖는 결합 모이어티들에 관한 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리들을 생성하고 이러한 라이브러리들을 원하는 결합 특성을 갖는 항체에 대해 스크리닝하기 위한 다양한 방법이 해당 분야에 공지되어 있다. 이러한 방법들은 예를 들어, Hoogenboom 외, in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 외, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)에서 설명되며, 그리고 예를 들어, McCafferty 외, *Nature* 348:552-554; Clackson 외, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks 외, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 외, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee 외, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 그리고 Lee 외, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)에서 상세히 설명된다.

[0544] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리들은, Winter 외, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)에 기재된 바와 같이 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 개별적으로 클로닝되고 파지 라이브러리들에서 무작위로 재조합된 후, 항원-결합 파지에 대해 스크리닝 될 수 있다. 파지는 일반적으로 항체 단편들을 단일 사슬 Fv(scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 표시한다. 면역화된 출처로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 제작할 필요없이 면역원에 대한 고친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 레퍼토리는 Griffiths 외, *EMBO J,* 12: 725-734 (1993)에 기재된 바와 같이 (예를 들어, 인간으로부터) 복제되어, 면역화 없이 광범위한 자가 항원 및 자가 항원들에 대한 하나의 항체 출처를 제공할 수 있다. 마지막으로, 나이브 라이브러리는 Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)에 기재된 바와 같이 줄기 세포로부터 재배열되지 않은 V-유전자 절편들을 복제하고 무작위 서열을 포함하는 PCR 프라이머를 사용하여 고도로 가변적인 CDR3 영역을 인코딩하고 시험관내 재배열을 수행함으로써 합성적으로 제조될 수도 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 설명하는 특허 간행물은 예를 들면: 미국 특허 제5,750,373, 및 미국 특허 출원 공개공보 제 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 및 2009/0002360를 포함한다.

[0545] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체들 또는 항체 단편들은 본원의 인간 항체 또는 인간 항체 단편들로 간주된다.

[0546] 이중특이성 항체를 만드는 기술은 상이한 특이성을 보유한 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공동-발현(Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537(1983)), WO 93/08829, 및 Traunecker 외, *EMBO J.* 10: 3655(1991) 참조), 및 "놉-인-홀(knob-in-hole)" 조작기술(예를 들어, 미국 특허 제. 5,731,168 참조)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다중특이성 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 만들기 위해 정전기 조정 효과를 조작하여(WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편을 가교결합하여(*예를 들어,* 미국 특허 제4,676,980, 및 Brennan 외, *Science*, 229: 81(1985) 참조); 류신 지퍼를 사용하여 이중특이성 항체를 생산하여(*예를 들어,* Kostelny 외, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553(1992) 참조); "디아바디" 기술을 사용하여 이중특이성 항체 단편들을 제조하여(*예를 들어,* Hollinger 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993) 참조); 그리고 단일-사슬 Fv(scFv) 이량체들을 사용하여(*예를 들어,* Gruber 외, *J. Immunol.*, 152:5368(1994) 참조); 그리고 *예를 들어,* Tutt 외, *J. Immunol.* 147: 60(1991)에 기재된 바와 같이 삼중특이성 항체를 제조하여 제조될 수 있다.

[0547] "옥토퍼스 항체"를 포함하여 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체도 본 발명에 포함된다(예를 들어, US 2006/0025576A1 참조).

[0548] 본원의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 또는 단편은 또한 2개의 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다(예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0549] "크로스맙" 항체도 본 발명에 포함된다(예를 들어, WO2009080251, WO2009080252, WO2009080253, WO2009080254 참조).

[0550] 이중특이성 항체 단편을 만드는 또 다른 기술은 "이중특이성 T 세포 관여자" 또는 BiTE® 접근 방식이다(예를 들어, WO2004/106381, WO2005/061547, WO2007/042261 및 WO2008/119567 참조). 이 접근 방식은 단일 폴리펩티드 상에 배열된 2개의 항체 가변 도메인을 활용한다. 예를 들어, 단일 폴리펩티드 사슬은 2개의 단일 사슬 Fv(scFv) 단편을 포함하는데, 각각은 2개 도메인 사이에 분자 내 결합을 허용할 만큼 충분한 길이의 폴리펩티드 링커에 의해 분리된 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 도메인을 갖는다. 이러한 단일 폴리펩티드는 2개의 scFv 단편 사이에 폴리펩티드 스페이서 서열을 추가로 포함한다. 각각의 scFv는 다른 에피토프를 인식하고, 이러한 에피토프는 서로 다른 세포 유형에 특이적일 수 있으므로, 각 scFv가 그의 동족 에피토프와 결합하면 서로 다른 2가지 세포 유형의 세포들이 근접해지거나 연결되게 된다. 이 접근법의 특정 실시형태에는 면역 세포에 의해 발현되는 세포 표면 항원(예를 들어, T 세포의 CD3 폴리펩티드)을 인식하는 scFv가 악성 또는 종양 세포와 같은 표적 세포에 의해 발현되는 세포 표면 항원을 인식하는 다른 scFv에 연결되는 것이 포함된다.

[0551] 이는 단일 폴리펩티드이므로, 이중특이성 T 세포 관여자는 당업계에 알려진 원핵생물 또는 진핵생물 세포 발현 시스템(예를 들어, CHO 세포주)을 사용하여 발현될 수 있다. 그러나 원하는 단량체의 활성 외에 다른 생물학적 활성을 가질 수 있는 다른 다량체 종으로부터 단량체 이중특이성 T 세포 관여자를 분리하기 위해서는 특수한 정제 기술(예를 들어, EP1691833 참조)이 필요할 수 있다. 한 가지 예시적인 정제 도식에서는, 분비된 폴리펩티드를 함유한 용액을 먼저 금속 친화도 크로마토그래피 처리하고, 폴리펩티드를 이미다졸 농도 구배에 따라 용리시킨다. 이 용리액은 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제되고, 폴리펩티드는 염화나트륨 농도 구배를 사용하여 용리된다. 마지막으로, 이 용리액을 크기 배제 크로마토그래피 처리하여 다량체 종으로부터 단량체를 분리한다.

[0552] 일정한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 해당 분야에서 공지되고 쉽게 이용가능한 추가 비단백질성 모이어티를 내포하도록 더욱 변형될 수 있다. 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)의 유도체화에 적합한 모이어티들에는 수용성 중합체들이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 수용성 중합체들의 비-제한적 예들에는, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1, 3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(동종중합체 또는 무작위 공중합체), 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 동종중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이의 혼합물이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 물에서의 안정성으로 인하여 제조에 있어 장점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지형 또는 비-분지형일 수 있다. 상기 항체에 부착된 중합체의 수는 가변적일 수 있으며, 하나 이상의 중합체가 부착된 경우, 이들은 동일하거나 또는 상이한

분자들일 수 있다. 일반적으로 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선할 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 정의된 조건에서 치료에 사용될지 여부 등을 포함한(이에 제한되지 않음) 고려 사항에 따라 결정될 수 있다.

[0553] 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 또한 화학 치료제 또는 약물, 성장 억제제, 독소(예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 유래의 효소적으로 활성인 독소 또는 그 단편) 또는 방사성 동위 원소와 같은 하나 이상의 세포독성제와 접합될 수 있다.

[0554] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 항체가 하나 이상의 약물과 접합된 항체-약물 접합체(ADC)를 포함하며, 하나 이상의 약물에는 메이탄시노이드(미국 특허 제5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0425235 B1 참조); 아우리스타틴, 예를 들어, 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF(MMAE 및 MMAF)(미국 특허 제5,635,483 및 5,780,588 및 7,498,298 참조); 돌라스타틴; 칼리케아미신 또는 이의 유도체(미국 특허 제5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 및 5,877,296; Hinman 외, *Cancer Res.* 53:3336-3342(1993); 및 Lode 외, *Cancer Res.* 58:2925-2928(1998) 참조); 안트라사이클린, 예를 들어, 다우노마이신 또는 독소루비신(Kratz 외, *Current Med. Chem.* 13:477-523(2006); Jeffrey 외, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362(2006); Torgov 외, *Bioconj. Chem.* 16:717-721(2005); Nagy 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834(2000); Dubowchik 외, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532(2002); King 외, *J. Med. Chem.* 45:4336-4343(2002); 및 미국 특허 제6,630,579 참조); 메토트렉세이트; 빈데신; 탁산, 예를 들어, 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0555] 다른 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬(녹농균 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 유동(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, *피토라카 아메리카나(Phytolaca americana)* 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 여주(Momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, *사포나리아 오피시날리스(Saponaria officinalis)* 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 비롯한(그러나 이에 제한되지 않음) 효소적으로 활성인 독소 또는 그 단편과 접합된다.

[0556] 또 다른 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 방사성 원자와 접합되어 방사성 접합체를 형성한다. 다양한 방사성 동위 원소를 사용하여 방사성 접합체를 생산할 수 있다. 예에는 At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} 및 Lu의 방사성 동위 원소가 포함된다. 방사성 접합체가 검출에 사용되는 경우, 예를 들어, Tc^{99m} 또는 I^{123}과 같은 신티그래피 연구를 위한 방사성 원자나 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철과 같은 핵자기 공명(NMR) 영상(자기 공명 영상이라고도 함)을 위한 스핀 라벨을 포함할 수 있다.

[0557] 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 접합체는 다양한 이중기능성 단백질 커플링제, 예를 들어, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이중기능성 유도체들(예를 들어, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르(예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예를 들어, 글루타알데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들어, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체들(예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플로린 화합물(예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 이용하여 만들어질 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 Vitetta 외, *Science* 238:1098(1987)에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성뉴클레오타이드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트제이다. WO94/11026 참조. 상기 링커는 세포 안에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단성 링커"일 수 있다. 예를 들면, 산-불안정 링커, 펩티다아제-민감성 링커, 광 불안정 링커, 다이메틸 링커 또는 이황화물-함유 링커(Chari 외, *Cancer Res.* 52:127-131(1992); 미국 특허 제5,208,020)가 이용될 수 있다.

[0558] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 세포 증식성 장애(예를 들어, 암)의 치료에 관한 적응증이 있다. 한 실시형태에서, 세포 증식성 장애는 암이다. 한 실시형태에서, 암은 B 세포 증식성 장애이다. 한 실시형태에서, 암은 CD20-양성 B 세포 증식성 장애이다. 한 실시형태에서, 암은 비호지킨 림프종(NHL)이다. 한 실시형태에서 NHL은 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 고등급 B 세포 림프종(HGBCL), 소포 림프종(FL)에서 발생하는 DLBCL[변형된 FL; trFL], 원발성 종격동 거대 B 세

포 림프종(PMBCL) 또는 변연부 림프종(MZL)이다. MZL은 비장, 림프절, 림프절외 MZL로 분류할 수 있다. 한 실시형태에서, NHL은 외투 세포 림프종 (MCL)이다. 한 실시형태에서, NHL은 1-3a 등급 소포 림프종(FL)이다. 한 실시형태에서, CD20-양성 B 세포 증식성 장애는 재발성 또는 불응성 B 세포 증식성 장애이다. 한 실시형태에서, 재발성 또는 불응성 B 세포 증식성 장애는 재발성 또는 불응성 NHL(예를 들어, 재발성 또는 불응성 DLBCL, 재발성 또는 불응성 FL, 또는 재발성 또는 불응성 MCL)이다.

[0559] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 CD3ε에 특이적으로 결합한다.

[0560] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 결합을 위해 항체 H2C (PCT 공개공보 WO 2008/119567), 항체 V9 (Rodrigues 외, *Int J Cancer Suppl.* 7, 45-50 (1992) 및 US 특허 제6,054,297), 항체 FN18 (Nooij 외, *Eur J Immunol.* 19, 981-984 (1986)), 항체 SP34 (Pessano 외, *EMBO J.* 4, 337-340 (1985)), 항체 OKT3 (Kung 외, Science 206, 347-349 (1979)), 항체 WT31 (Spits 외, *J Immunol.* 135, 1922 (1985)), 항체 UCHT1 (Burns 외, *J Immunol.* 129, 1451-1457 (1982)), 항체 7D6 (Coulie 외, *Eur J Immunol.* 21, 1703-1709 (1991)) 또는 항체 Leu-4와 경쟁할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 또한 WO 2005/040220, WO 2005/118635, WO 2007/042261, WO 2008/119567, WO 2008/119565, WO 2012/162067, WO 2013/158856, WO 2013/188693, WO 2013/186613, WO 2014/110601, WO 2014/145806, WO 2014/191113, WO 2014/047231, WO 2015/095392, WO 2015/181098, WO 2015/001085, WO 2015/104346, WO 2015/172800, WO 2016/020444, 또는 WO 2016/014974에 기재된 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 모이어티를 포함할 수 있다.

[0561] 일부 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 리툭시맙, 오비누투주맙, 오크렐리주맙, 오파투무맙, 오카라투주맙, 벨투주맙 및 우블리툭시맙 유래의 항체 또는 항원 결합 모이어티를 포함할 수 있다.

[0562] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 글로피타맙이다.

[0563] 일부 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 본원에서 명명된 항체의 제네릭, 바이오시밀러 또는 비등하지 않은 생물학적 버전을 포함할 수 있다.

[0564] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는, CD20에 특이적으로 결합하고 다음을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다:

[0565] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0566] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0567] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0568] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0569] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0570] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0571] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0572] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0573] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는, CD20에 특이적으로 결합하고 서열 번호 7에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 추가 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)은, CD20에 특이적으로 결합하고 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0574] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는, CD3에 특이적으로 결합하고 다음을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다:

[0575] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0576] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0577] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0578] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0579] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0580] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0581] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0582] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0583] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는, CD3에 특이적으로 결합하고 서열 번호 15에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 추가 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)은, CD3에 특이적으로 결합하고 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0584] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 (예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 다음을 포함한다:

[0585] a) CD20에 특이적으로 결합하는, 다음을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인: 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0586] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0587] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0588] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0589] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0590] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0591] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0592] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0593] b) CD3에 특이적으로 결합하는, 다음을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인: 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0594] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0595] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0596] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0597] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0598] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0599] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0600] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0601] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 (예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 다음을 포함한다:

[0602] (i) CD20에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및

[0603] (ii) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인.

[0604] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 항체 단편, 특히, Fab 분자 또는 scFv 분자, 더욱 특히 Fab 분자이다. 한 특정 실시형태에서, CD3에 특이적으로 결합하는, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)의 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환된(즉, 서로 대체된) 교차 Fab 분자이다.

[0605] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 CD20에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및 CD3에 특이적으로 결합하는 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 CD20에 특이적으로 결합하는 제2 및 제3 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서, 제1 항원 결합 도메인은 교차 Fab 분자이고, 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 각각 통상적인 Fab 분자이다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 Fc 도메인을 추가로 포함한다. 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 본원에서 설명하는 바와 같은 Fc 영역 및/또는 항원 결합 도메인에 변형을 포함할 수 있다. 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 Fc 수용체 및/또는 효과기 기능에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 한 실시형태에서 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(EU 넘버링)를 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

[0606] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 다음을 포함한다:

[0607] (i) Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합된, CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인;

[0608] (ii) Fab 중쇄의 C-말단에서 CD3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합된, CD20에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인; 및

[0609] (iii) Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된, CD20에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인.

[0610] 한 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 다음을 포함한다:

[0611] a) CD3, 특히 CD3 엡실론에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 분자로서; Fab 경쇄와 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되는 제1 Fab 분자;

[0612] b)CD20에 특이적으로 결합하는 제2 Fab 및 제3 Fab 분자로서, 여기서 제2 Fab 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서 위치 124의 아미노산이 리신(K)(Kabat에 따른 넘버링)으로 치환되고 위치 123의 아미노산이 리신(K) 또는 아르기닌(R), 특히 아르기닌(R)(Kabat에 따른 넘버링)으로 치환되고, 제2 Fab 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산이 글루탐산(E)(EU 넘버링)으로 치환되고 위치 213의 아미노산이 글루탐산(E)(EU 넘버링)으로 치환된 제2 Fab 및 제3 Fab 분자; 및

[0613] c) 안정적으로 결합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인.

[0614] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 CD20에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 도메인, 및 CD3에 특이적으로 결합하는 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0615] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 CD20에 대해 2가이고 CD3에 대해 1가이다.

[0616] 한 실시형태에서 a)의 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 c)의 Fc 도메인의 서브유닛 중 하나의 N-말단에 융합되고, b)의 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 a)의 제1 Fab 분자의 중쇄의 N-말단에 융합되고, b)의 제3 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 c)의 Fc 도메인의 다른 하나의 서브유닛의 N-말단에 융합된다.한 실시형태에서, a)의 제1 Fab 분자는 서열 번호 15의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 16의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0617] 또한 추가 실시형태에서, a)의 제1 Fab 분자는 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열과 서열 번호 16의 경쇄 가

변 영역 서열을 포함한다.

[0618] 한 실시형태에서, b)의 제2 Fab 분자 및 제3 Fab 분자는 각각 서열 번호 7의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 8의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0619] 한 실시형태에서, b)의 제2 Fab 분자 및 제3 Fab 분자는 각각 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0620] 한 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 서열 번호 17의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열 번호 18의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열 번호 19의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 및 서열 번호 20의 서열에 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함한다. 한 추가의 특정 실시형태에서, 이중특이성 항체는 서열 번호 17의 폴리펩티드 서열, 서열 번호 18의 폴리펩티드 서열, 서열 번호 19의 폴리펩티드 서열 및 서열 번호 20의 폴리펩티드 서열을 포함한다. 한 추가의 특정 실시형태에서, 이중특이성 항체는 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 하나의 폴리펩티드 사슬, 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 하나의 폴리펩티드 사슬, 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 하나의 폴리펩티드 사슬, 및 각각이 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함한다.

[0621] 특정 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 PCT 공개공보 WO 2016/020309 및 유럽 특허 출원 제 EP15188093 및 EP16169160 (각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨))에 기술되어 있다. 한 실시형태에서 본 발명의 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 글로피타맙이다.

[0622] *B. 항체 형식*

[0623] *1. 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 구성*

[0624] 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 구성 요소들은 서로에 대해 다양한 구성으로 융합될 수 있다. 도 1에는 예시적인 구성이 도시되어 있다.

[0625] 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체에 포함된 항원 결합 모이어티는 Fab 분자이다. 이러한 실시형태에서, 제1, 제2, 제3 등의 항원 결합 모이어티는 본원에서 각각 제1, 제2, 제3 등의 Fab 분자로 지칭될 수 있다. 더욱이, 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 안정한 결합이 가능한 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함한다.

[0626] 일부 실시형태에서, 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 또는 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다.

[0627] 이러한 한 실시형태에서, 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합된다. 이러한 구체적인 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 본질적으로 제1 및 제2 Fab 분자, 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인, 및 선택적으로 하나 이상의 펩티드 링커로 구성되고, 여기서 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 또는 제2 서브유닛의 N-말단에 융합되고, 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합된다. 이러한 구성은 도 1G 및 1K에 개략적으로 도시되어 있다. 선택적으로, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄와 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄는 또한 서로 융합될 수 있다.

[0628] 또 다른 실시형태에서, 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 또는 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다. 이러한 구체적인 실시형태에서, 항체는 본질적으로 제1 및 제2 Fab 분자, 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인, 및 선택적으로 하나 이상의 펩티드 링커로 구성되고, 여기서 제1 및 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 서브유닛들 중 하나의 N-말단에 융합된다. 이러한 구성은 도 1A 및 1D에 개략적으로 도시되어 있다. 제1 및 제2 Fab 분자는 Fc 도메인에 직접 또는 펩티드 링커를 통해 융합될 수 있다. 한 특정 실시형태에서 제1 및 제2 Fab 분자는 각각 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fc 도메인에 융합된다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 힌지 영역은 인간 IgG1 힌지 영역이며 특히 Fc 도메인은 IgG_1 Fc 도메인이다.

[0629] 다른 실시형태에서, 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 또는 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다. 이러한 한 실시형태에서, 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합된다. 이러한 구체적인 실시형태에서, 항체는 본질적으로 제1 및 제2 Fab 분자, 제1 및 제2 서브유닛으로

구성된 Fc 도메인, 및 선택적으로 하나 이상의 펩티드 링커로 구성되고, 여기서 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 또는 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다. 이러한 구성은 도 1H 및 1L에 개략적으로 도시되어 있다. 선택적으로, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄와 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄는 또한 서로 융합될 수 있다.

[0630] Fab 분자는 하나 이상의 아미노산, 전형적으로 약 2 내지 20개의 아미노산을 포함하는 펩티드 링커를 통해 또는 직접적으로 서로에 또는 Fc 도메인에 융합될 수 있다. 펩티드 링커는 해당 분야에 공지이고 본원에 설명된 바와 같다. 적합한 비면역원성 펩티드 링커는, 예를 들어, $(G_4S)_n$ (서열 번호 21), $(SG_4)_n$ (서열 번호 22), 또는 $G_4(SG_4)_n$ (서열 번호 23) 펩티드 링커를 포함한다. "n"은 일반적으로 1 내지 10, 일반적으로 2 내지 4의 정수이다. 한 실시형태에서, 상기 펩티드 링커는 적어도 5개 아미노산 길이, 한 실시형태에서 5 내지 100개 길이, 추가 실시형태에서 10 내지 50개 아미노산 길이를 갖는다. 한 실시형태에서 상기 펩티드 링커는 $(GxS)_n$ 또는 $(GxS)_nG_m$ 이고 이 때 G=글리신, S=세린, 및 (x=3, n= 3, 4, 5 또는 6이고, 그리고 m=0, 1, 2 또는 3임) 또는 (x=4, n=2, 3, 4 또는 5이고 m= 0, 1, 2 또는 3임)(서열 번호 27-58), 한 실시형태에서 x=4이고 n=2 또는 3이고, 또 다른 실시형태에서 x=4이고 n=2이다. 한 실시형태에서 상기 펩티드 링커는 $(G_4S)_2$ (서열 번호 24)이다. 제1 및 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄를 서로 융합시키기에 특히 적합한 펩티드 링커는 $(G_4S)_2$ (서열 번호 24)이다. 제1 및 제2 Fab 단편의 Fab 중쇄를 연결하는데 적합한 예시적인 펩티드 링커는 서열 (D)-$(G_4S)_2$(서열 번호 24 및 25)를 포함한다. 또 다른 이러한 링커는 서열 $(G_4S)_4$(서열번호 26)를 포함한다. 추가로, 링커는 면역글로불린 힌지 영역(의 일부)을 포함할 수 있다. 특히 Fab 분자가 Fc 도메인 서브유닛의 N-말단에 융합되는 경우, 추가 펩티드 링커에 의해 또는 없이 면역글로불린 힌지 영역 또는 이의 일부를 통해 융합될 수 있다.

[0631] 특정 표적 세포 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단일 항원 결합 모이어티를 갖는 항체(예를 들어, 도 1A, 1D, 1G, 1H, 1K, 또는 1L에 도시된 바와 같음)는, 특히 높은 친화도의 항원 결합 모이어티의 결합 이후 표적 세포 항원의 내재화가 예상되는 경우에 유용하다. 이러한 경우, 표적 세포 항원에 특이적인 항원 결합 모이어티가 2개 이상 존재하면 표적 세포 항원의 내재화가 향상되어, 항원의 가용성이 감소할 수 있다.

[0632] 그러나 많은 다른 경우에는, 예를 들어, 표적 부위에 대한 표적화를 최적화하거나 표적 세포 항원의 가교를 허용하기 위해, 표적 세포 항원에 특이적인 2개 이상의 항원 결합 모이어티(예를 들어, Fab 분자)를 포함하는 항체를 갖는 것이 유리할 것이다(도 1B, 1C, 1E, 1F, 1I, 1J, 1M, 또는 1N에 도시된 실시예 참조).

[0633] 따라서, 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 2개의 항-CD20 결합 모이어티, 예를 들어, CD20을 표적으로 하는 2개의 Fab 분자를 포함한다. 한 실시형태에서 CD20을 표적으로 하는 2개의 Fab 분자는 통상적인 Fab 분자이다. 한 실시형태에서, CD20을 표적으로 하는 2개의 Fab 분자는 동일한 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 포함하며 동일한 도메인 배열(즉, 기존 또는 교차)을 갖는다.

[0634] 대안적인 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 2개의 항-CD3 결합 모이어티, 예를 들어, CD3을 표적으로 하는 2개의 Fab 분자를 포함한다. 이러한 한 실시형태에서, CD3를 표적으로 하는 2개의 Fab 분자는 모두 교차 Fab 분자(Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 VH 및 VL 또는 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 교환/대체된 Fab 분자)이다. 이러한 한 실시형태에서, CD3을 표적으로 하는 2개의 Fab 분자는 동일한 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 포함하며 동일한 도메인 배열(즉, 기존 또는 교차)을 갖는다.

[0635] 한 실시형태에서, 제3 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 또는 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다.

[0636] 한 특정 실시형태에서, 제2 및 제3 Fab 분자는 각각 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 서브유닛 중 하나의 N-말단에 융합되고, 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합된다. 이러한 구체적인 실시형태에서, 항체는 본질적으로 제1, 제2 및 제3 Fab 분자, 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인, 및 선택적으로 하나 이상의 펩티드 링커로 구성되고, 여기서 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고, 제3 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다. 이러한 구성은 도 1B 및 도 1E(실시형태, 여기서 제3 Fab 분자는 기존 Fab 분자이고 제2 Fab 분자와 동일함), 및 도 1I 및 도 1M(실시형태, 여기서 제3 Fab 분자는 교차 Fab 분자이고 바람직하게는 제1 Fab 분자와 동일함)에 개략적으로 도시되어 있다. 제2 및 제3 Fab 분자는 Fc 도메인에 직접 또는 펩티드 링커를 통해 융합될 수 있다. 한 특정 실시형태에서 제2 및 제3 Fab 분자는 각각 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fc 도메인에 융합된다.

특정 실시형태에서, 면역글로불린 힌지 영역은 인간 IgG1 힌지 영역이며 특히 Fc 도메인은 IgG_1 Fc 도메인이다. 선택적으로, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄와 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄는 또한 서로 융합될 수 있다.

[0637] 또 다른 실시형태에서, 제2 및 제3 Fab 분자는 각각 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 서브유닛 중 하나의 N-말단에 융합되고, 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합된다. 이러한 구체적인 실시형태에서, 항체는 본질적으로 제1, 제2 및 제3 Fab 분자, 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인, 및 선택적으로 하나 이상의 펩티드 링커로 구성되고, 여기서 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 N-말단에 융합되고, 제3 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 N-말단에 융합된다. 이러한 구성은 도 1C 및 도 1F(실시형태, 여기서 제3 Fab 분자는 기존 Fab 분자이고 제2 Fab 분자와 동일함), 및 도 1J 및 도 1N(실시형태, 여기서 제3 Fab 분자는 교차 Fab 분자이고 제1 Fab 분자와 동일함)에 개략적으로 도시되어 있다. 제1 및 제3 Fab 분자는 Fc 도메인에 직접 또는 펩티드 링커를 통해 융합될 수 있다. 한 특정 실시형태에서 제2 및 제3 Fab 분자는 각각 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fc 도메인에 융합된다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 힌지 영역은 인간 IgG1 힌지 영역이며 특히 Fc 도메인은 IgG_1 Fc 도메인이다. 선택적으로, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄와 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄는 또한 서로 융합될 수 있다.

[0638] Fab 분자가 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 각 서브유닛의 N-말단에 융합된 항체 구성에서, 두 Fab 분자, 힌지 영역 및 Fc 도메인은 본질적으로 면역글로불린 분자를 형성한다. 한 특정 실시형태에서 면역글로불린 분자는 IgG 분류 면역글로불린이다. 더 더욱 특정한 실시형태에서 면역글로불린은 IgG_1 하위분류 면역글로불린이다. 또 다른 실시형태에서 면역글로불린은 IgG_4 하위분류 면역글로불린이다. 추가적인 특정 실시형태에서 면역글로불린은 인간 면역글로불린이다. 다른 실시형태에서 면역글로불린은 키메라 면역글로불린 또는 인간화 면역글로불린이다.

[0639] 일부 항체들에서, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄와 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄는, 선택적으로 펩티드 링커를 통해, 서로 융합될 수 있다. 제1 및 제2 Fab 분자의 구성에 따라, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄는 C-말단에서 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄의 N-말단에 융합될 수 있거나, 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄는 C-말단에서 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄의 N-말단에 융합될 수 있다. 제1 및 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄를 융합시키면 일치하지 않는 Fab 중쇄 및 경쇄의 잘못된 페어링이 더욱 줄어들고, 이러한 항체들의 일부의 발현에 필요한 플라스미드 수도 감소한다.

[0640] 특정 실시형태에서, 항체는, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제1 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 Fc 도메인 서브유닛과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4)), 및 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄가 Fc 도메인 서브유닛과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 및 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서 폴리펩티드는, 예를 들어, 이황화물 결합에 의해 공유 연결된다.

[0641] 특정 실시형태에서, 항체는, 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제1 Fab 분자는 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 Fc 도메인 서브유닛과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4)), 및 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄가 Fc 도메인 서브유닛과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$) 및 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서 폴리펩티드는, 예를 들어, 이황화물 결합에 의해 공유 연결된다.

[0642] 일부 실시형태에서, 항체는, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제1 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하며, 이는 다시 Fc

도메인 서브유닛과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다. 다른 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄가 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하며(즉, 제1 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 Fc 도메인 서브유닛과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다.

[0643] 이들 실시형태들 중 일부에서, 항체는, 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$)과 그리고 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$)와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는, 제1 Fab 분자의 교차 Fab 경쇄 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 이들 실시형태들 중 나머지에서, 항체는 적절한 경우, 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-$VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$), 또는 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드가 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$)를 추가로 포함한다.

[0644] 이들 실시형태에 따른 항체는 또한 (i) Fc 도메인 서브유닛 폴리펩티드(CH2-CH3(-CH4)), 또는 (ii) 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄가 Fc 도메인 서브유닛과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-CH2-CH3(-CH4)) 및 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서 폴리펩티드는, 예를 들어, 이황화물 결합에 의해 공유 연결된다.

[0645] 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제1 Fab 분자는 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하며, 이는 다시 Fc 도메인 서브유닛과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다. 다른 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄가 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하며(즉, 제1 Fab 분자는 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 Fc 도메인 서브유닛과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4))를 포함한다.

[0646] 이들 실시형태들 중 일부에서, 항체는, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 그리고 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 공유하는, 제1 Fab 분자의 교차 Fab 경쇄 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 이들 실시형태들 중 나머지에서, 항체는 적절한 경우, 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$), 또는 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드가 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$)를 추가로 포함한다.

[0647] 이들 실시형태에 따른 항체는 또한 (i) Fc 도메인 서브유닛 폴리펩티드(CH2-CH3(-CH4)), 또는 (ii) 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄가 Fc 도메인 서브유닛과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-CH2-CH3(-CH4)) 및 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서 폴리펩티드는, 예를 들어, 이황화물 결합에 의해 공유 연결된다.

[0648] 특정 실시형태에서, 항체는, 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄가 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함) 폴리펩티드($VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과($VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩

티드와($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다.

[0649] 특정 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄가 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과($VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다.

[0650] 특정 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄가 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과($VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와 ($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다.

[0651] 특정 실시형태에서, 항체는, 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄가 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함) 폴리펩티드($VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-$VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과($VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 또한 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 추가로 포함한다.

[0652] 특정 실시형태에서, 항체는, 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄가 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함) 폴리펩티드($VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-$VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과($VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 또한 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 추가로 포함한다.

[0653] 특정 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄가 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 이는 다시 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과($VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 또한 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 추가로 포함한다.

[0654] 특정 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄가 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고 이는 다시 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자

의 Fab 중쇄 불변 영역과($VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 또한 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 추가로 포함한다.

[0655] 특정 실시형태에서, 항체는, 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄가 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 이는 다시 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는(즉, 제3 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함) 폴리펩티드($VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VL_{(3)}$-$CH1_{(3)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과($VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 공유하는 폴리펩티드($VH_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 추가로 포함한다.

[0656] 특정 실시형태에서, 항체는, 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄가 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 이는 다시 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는(즉, 제3 Fab 분자는 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함) 폴리펩티드($VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과($VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 공유하는 폴리펩티드($VL_{(3)}$-$CH1_{(3)}$)를 추가로 포함한다.

[0657] 특정 실시형태에서, 항체는, 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제3 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 가변 영역이 경쇄 가변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VL_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-$VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과($VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 공유하는 폴리펩티드($VH_{(3)}$-$CL_{(3)}$)를 추가로 포함한다.

[0658] 특정 실시형태에서, 항체는, 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역이 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제3 Fab 분자는 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 가변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고, 이는 다시 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 불변 영역과 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하고(즉, 제2 Fab 분자는 중쇄 불변 영역이 경쇄 불변 영역으로 대체된 교차 Fab 중쇄를 포함함), 이는 다시 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄와 카르복시 말단 펩티드 결합을 공유하는 폴리펩티드($VH_{(3)}$-$CL_{(3)}$-$VH_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CH1_{(1)}$)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과($VL_{(2)}$-$CH1_{(2)}$) 및 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 폴리펩티드와($VL_{(1)}$-$CL_{(1)}$) 공유하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는, 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄 가변 영역이 카르복시 말단 펩티드 결합을 제3 Fab 분자의 Fab 중쇄 불변 영역과 공유하는 폴리펩티드($VL_{(3)}$-$CH1_{(3)}$)를 추가로 포함한다.

[0659] 상기 실시형태에 따르면, 항체의 구성 성분들(예를 들어, Fab 분자, Fc 도메인)은 직접적으로 또는 다양한 링커, 특히 본원에 기술되어 있거나 당해 기술 분야에 공지된 하나 이상의 아미노산, 일반적으로 약 2-20개의

아미노산을 포함하는 펩티드 링커를 통해 융합될 수 있다. 적합한 비면역원성 펩티드 링커는, 예를 들어, $(G_4S)_n$ (서열 번호 21), $(SG_4)_n$ (서열 번호 22), 또는 $G_4(SG_4)_n$ (서열 번호 23) 펩티드 링커를 포함한다. "n"은 일반적으로 1 내지 10, 일반적으로 2 내지 4의 정수이다.

[0660] *2. Fc 도메인*

[0661] 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 항체 분자의 중쇄 도메인을 포함하는 한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성된 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 G(IgG) 분자의 Fc 도메인은 이량체이며, 이의 각 서브유닛은 CH2 및 CH3 IgG 중쇄 불변 도메인을 포함한다. Fc 도메인의 2개의 서브유닛은 서로 안정적으로 결합 가능하다.

[0662] 한 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG Fc 도메인이다. 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG_1 Fc 도메인이다. 또 다른 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG_4 Fc 도메인이다. 더욱 구체적인 실시형태에서, Fc 도메인은 S228 위치에 아미노산 치환(Kabat 넘버링), 특히 아미노산 치환 S228P를 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 이 아미노산 치환은 IgG_4 항체의 생체내 Fab 팔 교환을 감소시킨다(Stubenrauch 외, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010) 참조). 추가적인 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 인간이다.

[0663] *(i) 이종이량체화를 촉진하는 Fc 도메인 변형*

[0664] 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 중 하나 또는 다른 하나에 융합된 서로 다른 구성 성분들(예를 들어, 항원 결합 도메인)을 포함하므로, Fc 도메인의 2개의 서브유닛은 일반적으로 2개의 동일하지 않은 폴리펩티드 사슬에 포함된다. 이들 폴리펩티드의 재조합 공동발현 및 후속된 이량체화는 이들 2개 폴리펩티드의 몇 가지 가능한 조합을 유도한다. 따라서 재조합 생산에서 이러한 항체들의 수율 및 순도를 개선하기 위해, 항체의 Fc 도메인에 원하는 폴리펩티드들의 결합을 촉진하는 변형을 도입하는 것이 유리할 것이다.

[0665] 따라서, 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 연합을 촉진하는 변형을 포함한다. 인간 IgG Fc 도메인의 두 서브유닛들 사이의 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용 부위는 Fc 도메인의 CH3 도메인에 있다. 따라서, 한 실시형태에서, 상기 변형은 Fc 도메인의 CH3 도메인에 있다.

[0666] 이종이량체화를 실시하기 위한 Fc 도메인의 CH3 도메인에서 변형을 위한 여러 접근법이 존재하는데, 이들은, 예를 들어, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291에서 충분히 설명된다. 전형적으로, 이와 같은 모든 접근법에서 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인 및 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인은 각 CH3 도메인(또는 이것을 포함하는 중쇄)이 그 자체로는 더 이상 동종이량체를 형성할 수 없지만, 상보적으로 조작된 다른 CH3 도메인과의 이종이량체 형성을 강제하도록(제1 및 제2 CH3 도메인이 이종이량체를 형성하고, 그리고 2개의 제1 또는 2개의 제2 CH3 도메인 사이에 어떤 동종이량체도 형성되지 않도록), 둘 모두 상보성 방식으로 조작된다. 개선된 중쇄 이종이량체화를 위한 이러한 상이한 접근법은 경쇄 미스페어링 및 벤스 존스형 부산물을 감소시키는 중쇄-경쇄 변형(예를 들어, Fab 아암에서 가변 및 불변 영역 교환/대체, 또는 CH1/CL 경계면에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산들의 치환의 도입)과 조합하여 상이한 대안으로서 고려된다.

[0667] 특정한 실시형태에서 Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 결합을 촉진하는 상기 변형은 Fc 도메인의 2개 서브유닛 중 하나에서 "놉" 변형 및 Fc 도메인의 2개 서브유닛 중 다른 하나에서 "홀" 변형을 포함하는, 이른바 "놉-인투-홀" 변형이다.

[0668] 놉-인투-홀 기술은 예를 들어 US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway 외, Prot Eng 9, 617-621 (1996) 및 Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)에 기재되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 제1 폴리펩티드의 경계면에 돌기 ("놉") 그리고 제2 폴리펩티드의 경계면에 이에 상응하는 구멍 ("홀")을 도입시켜 상기 돌기가 상기 구멍 안에 위치되게 함으로써 이종이량체 형성을 촉진시키고, 동형이량체 형성을 방해한다. 돌기(Protuberances)는 제1 폴리펩티드의 경계면의 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄 (가령, 티로신 또는 트립토판)로 대체함으로써 제작된다. 상기 돌기와 동일 또는 유사한 크기의 상보적 공동(cavities)은, 제2 폴리펩티드의 경계면에서 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄 (가령, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 생성된다.

[0669] 따라서, 특정 실시형태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기는 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해 제1 서브유닛의 CH3 도메인 내부에, 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내

부의 공동에 위치할 수 있는 돌기를 생성하고, Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기는 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내부에, 제1 서브유닛의 CH3 도메인 내부의 돌기가 위치할 수 있는 공동을 생성한다.

[0670] 바람직하게는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 티로신(Y) 및 트립토판(W)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0671] 바람직하게는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T) 및 발린(V)으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0672] 상기 돌기 및 공동은 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을, 예를 들어, 부위-특이적 돌연변이유발에 의해, 또는 펩티드 합성에 의해 변경함으로써 생성될 수 있다.

[0673] 특정 실시형태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛("놉" 서브유닛)(의 CH3 도메인)에서 366번 위치의 트레오닌 잔기는 트립토판 잔기로 대체되고(T366W), Fc 도메인의 제2 서브유닛("홀" 서브유닛)(의 CH3 도메인)에서 407번 위치의 티로신 잔기는 발린 잔기로 대체된다(Y407V). 한 실시형태에서, Fc 도메인의 제2 서브유닛에서, 추가로 366번 위치의 트레오닌 잔기는 세린 잔기로 대체되고(T366S), 368번 위치의 류신 잔기는 알라닌 잔기로 대체된다(L368A)(EU 넘버링).

[0674] 또한 한 추가 실시형태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛에서 추가로 위치 354의 세린 잔기가 시스테인 잔기로 대체되거나(S354C) 위치 356의 글루탐산 잔기가 시스테인 잔기로 대체되며(E356C), Fc 도메인의 제2 서브유닛에서 추가로 위치 349의 티로신 잔기가 시스테인 잔기로 대체된다(Y349C)(EU 넘버링). 이들 2개 시스테인 잔기들의 도입은 Fc 도메인의 상기 2개 서브유닛들 사이에 이황화물 가교를 형성시켜, 이러한 이량체를 더욱 안정화시킨다(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

[0675] 특정 실시형태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛은 아미노산 치환 S354C 및 T366W를 포함하고 Fc 도메인의 제2 서브유닛은 아미노산 치환 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V(EU 넘버링)를 포함한다.

[0676] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 CD3 항원 결합 모이어티는 Fc 도메인의 제1 서브유닛("놉" 변형 포함)에 융합된다. 이론에 한정됨 없이, Fc 도메인의 놉-포함 서브유닛에 대한 CD3 항원 결합 모이어티의 융합은 2개의 CD3 항원 결합 모이어티를 포함하는 이중특이성 항체의 생성(2개의 놉-포함 폴리펩티드의 입체 충돌)을 (더욱) 최소화 것이다.

[0677] 이종이량체화를 실시하기 위한 CH3-변형의 다른 기술이 대안으로서 고려되고, 예를 들어, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291에서 설명된다.

[0678] 한 실시형태에서, EP 1870459 A1에서 설명된 이종이량체화 접근법이 대안적으로 이용된다. 이러한 접근법은 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 사이에서 CH3/CH3 도메인 경계면 내에 특정한 아미노산 위치에서 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 도입에 기초된다. 한 바람직한 실시형태는 (Fc 도메인의) 2개의 CH3 도메인 중 하나에서 아미노산 돌연변이 R409D 및 K370E 및 Fc 도메인의 CH3 도메인 중 다른 하나에서 아미노산 돌연변이 D399K 및 E357K이다(EU 넘버링).

[0679] 또 다른 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 T366W 및 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 T366S, L368A, 및 Y407V, 그리고 부가적으로 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 R409D 및 K370E, 및 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 D399K 및 E357K를 포함한다(EU 넘버링).

[0680] 또 다른 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 S354C 및 T366W, 및 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, 및 Y407V를 포함하거나, 또는 상기 항체는 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 Y349C 및 T366W, 및 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 S354C, T366S, L368A, 및 Y407V, 그리고 부가적으로 Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 R409D 및 K370E 및 Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에서 아미노산 돌연변이 D399K 및 E357K를 포함한다(모두 EU 넘버링).

[0681] 한 실시형태에서, WO 2013/157953에서 설명된 이종이량체화 접근법이 대안적으로 이용된다. 한 실시형태에서, 제1 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366K를 포함하고, 그리고 제2 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 L351D를

포함한다. 추가 실시형태에서, 제1 CH3 도메인은 추가 아미노산 돌연변이 L351K를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 제2 CH3 도메인은 Y349E, Y349D 및 L368E에서 선택되는 아미노산 돌연변이(바람직하게는 L368E)를 더욱 포함한다(EU 넘버링).

[0682] 한 실시형태에서, WO 2012/058768에서 설명된 이종이량체화 접근법이 대안적으로 이용된다. 한 실시형태에서, 제1 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 L351Y, Y407A를 포함하고, 그리고 제2 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366A 및 K409F를 포함한다. 추가 실시형태에서 제2 CH3 도메인은 위치 T411, D399, S400, F405, N390 또는 K392에서, 예를 들면, (a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E 또는 T411W, (b) D399R, D399W, D399Y 또는 D399K, (c) S400E, S400D, S400R 또는 S400K, (d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V 또는 F405W, (e) N390R, N390K 또는 N390D, 또는 (f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F 또는 K392E에서 선택되는 추가 아미노산 돌연변이를 포함한다(EU 넘버링). 추가 실시형태에서 제1 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 L351Y 및 Y407A를 포함하고, 그리고 제2 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366V 및 K409F를 포함한다. 추가 실시형태에서 제1 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 Y407A를 포함하고, 그리고 제2 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366A 및 K409F를 포함한다. 추가 실시형태에서, 제2 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 K392E, T411E, D399R 및 S400R을 추가로 포함한다(EU 넘버링).

[0683] 한 실시형태에서, 대안적으로, 예를 들어, 368 및 409(EU 넘버링)로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 변형이 있는, WO 2011/143545에 설명된 이종이량체화 접근법이 사용된다.

[0684] 한 실시형태에서, 전술된 놉-인투-홀 기술을 또한 이용하는, WO 2011/090762에서 설명된 이종이량체화 접근법이 대안적으로 이용된다. 한 실시형태에서, 제1 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366W를 포함하고, 그리고 제2 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 Y407A를 포함한다. 한 실시형태에서, 제1 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 T366Y를 포함하고, 그리고 제2 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 Y407T를 포함한다(EU 넘버링).

[0685] 한 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 또는 이러한 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 Fc 도메인은 IgG_2 하위분류이고 WO 2010/129304에 설명된 이종이량체화 접근법이 사용된다.

[0686] 다른 실시형태에서, Fc 도메인의 제1 및 제2 서브유닛의 결합을 촉진하는 변형은, 예를 들어, PCT 공개 공보 WO 2009/089004에 설명된 정전기적 조향 효과를 매개하는 변형을 포함한다. 일반적으로, 이 방법은 2개의 Fc 도메인 서브유닛의 경계면에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 하전된 아미노산 잔기로의 대체를 포함하므로 동종이량체 형성은 정전기적으로 바람직하지 않지만 이종이량체화는 정전기적으로 유리하게 된다. 이와 같은 한 실시형태에서, 제1 CH3 도메인은 K392 또는 N392의 음으로 하전된 아미노산(예를 들면 글루탐산 (E) 또는 아스파르트산 (D))으로의 아미노산 치환, 바람직하게는 K392D 또는 N392D을 포함하고, 그리고 제2 CH3 도메인은 D399, E356, D356 또는 E357의 양으로 하전된 아미노산(예를 들면 리신 (K) 또는 아르기닌 (R))으로의 아미노산 치환, 바람직하게는 D399K, E356K, D356K 또는 E357K, 더욱 바람직하게는 D399K 및 E356K을 포함한다. 추가 실시형태에서, 제1 CH3 도메인은 K409 또는 R409의 음으로 하전된 아미노산(예를 들어 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D))으로의 아미노산 치환, 바람직하게는 K409D 또는 R409D를 추가로 포함한다. 추가 실시형태에서, 제1 CH3 도메인은 K439 및/또는 K370의 음으로 하전된 아미노산(예를 들면, 글루탐산 (E) 또는 아스파르트산 (D))으로의 아미노산 치환(EU 넘버링)을 추가로 또는 대안적으로 포함한다.

[0687] 다른 추가 실시형태에서, WO 2007/147901에서 설명된 이종이량체화 접근법이 대안적으로 이용된다. 한 실시형태에서, 제1 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 K253E, D282K 및 K322D를 포함하고, 제2 CH3 도메인은 아미노산 돌연변이 D239K, E240K 및 K292D(EU 넘버링)을 포함한다.

[0688] 또 다른 실시형태에서, WO 2007/110205에서 설명된 이종이량체화 접근법이 이용될 수 있다.

[0689] 한 실시형태에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛은 아미노산 치환 K392D 및 K409D를 포함하고 Fc 도메인의 제2 서브유닛은 아미노산 치환 D356K 및 D399K(EU 넘버링)를 포함한다.

[0690] *(ii) Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 Fc 도메인 변형*

[0691] Fc 도메인은 표적 조직에서의 양호한 축적 및 유리한 조직-혈액 분포 비율에 기여하는 긴 혈청 반감기를 포함하여 유리한 약동학적 특성을 항체, 예를 들어, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체에 부여한다. 그러나 동시에 이는 바람직한 항원 보유 세포보다는 Fc 수용체를 발현하는 세포에 대한 항체의 바람직하지 않은 표적화를 초래할 수 있다. 더욱이, Fc 수용체 신호전달 경로의 공동 활성화는 사이토카인 방출을 유도할 수 있으며, 이는 해당 항체가 가질 수 있는 다른 면역자극 성질 및 항체의 긴 반감기와 함께 사이토카인 수용체의 과도한 활성화 및 전신

투여 시 심각한 부작용을 초래한다.

[0692] 따라서, 특정 실시형태에서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 Fc 도메인은 천연 IgG_1 Fc 도메인과 비교하여 Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화도 및/또는 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 한 이러한 실시형태에서, Fc 도메인(또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 분자, 예를 들어, 항체)은 천연 IgG1 Fc 도메인(또는 천연 IgG_1 Fc 도메인을 포함하는 해당 분자)에 비해 Fc 수용체에 대한 결합 친화도의 50% 미만, 바람직하게는 20% 미만, 더욱 바람직하게는 10% 미만 그리고 가장 바람직하게는 5% 미만, 및/또는 천연 IgG_1 Fc 도메인(또는 천연 IgG_1 Fc 도메인을 포함하는 해당 분자)에 비해 효과기 기능의 50% 미만, 바람직하게는 20% 미만, 더욱 바람직하게는 10% 미만 그리고 가장 바람직하게는 5% 미만을 나타낸다. 한 실시형태에서, Fc 도메인(또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 분자, 예를 들어, 항체)은 Fc 수용체에 실질적으로 결합하지 않고/하거나 효과기 기능을 유도하지 않는다. 한 특정 실시형태에서, Fc 수용체는 Fcɣ 수용체이다. 한 실시형태에서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 한 실시형태에서, Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 한 구체적인 실시형태에서, Fc 수용체는 활성화 인간 Fcɣ 수용체, 더욱 구체적으로 인간 FcɣRIIIa, FcɣRI 또는 FcɣRIIa, 가장 구체적으로 인간 FcɣRIIIa이다. 한 실시형태에서 효과기 기능은 CDC, ADCC, ADCP 및 사이토카인 분비의 군에서 선택된 하나 이상이다. 특정 실시형태에서, 효과기 기능은 ADCC이다. 한 실시형태에서, Fc 도메인은 천연 IgG_1 Fc 도메인과 비교하여 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대해 실질적으로 유사한 결합 친화도를 나타낸다. FcRn에 대해 실질적으로 유사한 결합은, Fc 도메인(또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 분자, 예를 들어, 항체)이 FcRn에 대하여 천연 IgG1 Fc 도메인(또는 천연 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 해당 분자)의 결합 친화도의 약 70% 초과, 특히 약 80% 초과, 보다 특히 약 90% 초과를 나타낼 때 달성된다.

[0693] 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 조작되지 않은 Fc 도메인과 비교하여 Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화도 및/또는 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된다. 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 전형적으로, 동일한 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 상기 Fc 도메인의 2개의 서브유닛 각각에 존재한다. 한 실시형태에서, 아미노산 돌연변이는 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도를 감소시킨다. 한 실시형태에서, 아미노산 돌연변이는 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도를 2배 이상, 5배 이상, 또는 10배 이상 감소시킨다. Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 있는 실시형태에서, 이들 아미노산 돌연변이의 조합은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도를 적어도 10배, 적어도 20배, 심지어 적어도 50배만큼 감소시킬 수 있다. 한 실시형태에서, 조작된 Fc 도메인을 포함하는 분자, 예를 들어, 항체는 조작되지 않은 Fc 도메인을 포함하는 해당 분자와 비교하여 Fc 수용체에 대해 20% 미만, 특히 10% 미만, 더욱 특히 5% 미만의 결합 친화도를 나타낸다. 한 특정 실시형태에서, Fc 수용체는 Fcɣ 수용체이다. 일부 실시형태에서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 일부 실시형태에서, Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 한 구체적인 실시형태에서, Fc 수용체는 활성화 인간 Fcɣ 수용체, 더욱 구체적으로 인간 FcɣRIIIa, FcɣRI 또는 FcɣRIIa, 가장 구체적으로 인간 FcɣRIIIa이다. 바람직하게는, 이들 수용체 각각에 대한 결합이 감소된다. 일부 실시형태에서, 보체 성분에 대한 결합 친화도, 특히 C1q에 대한 결합 친화도도 감소된다. 한 실시형태에서, 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합 친화도는 감소되지 않는다. FcRn에 대한 실질적으로 유사한 결합, 즉 상기 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도의 보존은 Fc 도메인(또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 분자, 예를 들어, 항체)이 조작되지 않은 형태의 Fc 도메인(또는 상기 조작되지 않은 형태의 Fc 도메인을 포함하는 해당 분자)의 FcRn에 대한 결합 친화도의 약 70% 초과를 나타낼 때 달성된다. Fc 도메인, 또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 분자(예를 들어, 항체)는 이러한 친화도의 약 80% 초과 및 심지어 약 90% 초과를 나타낼 수 있다. 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 조작되지 않은 Fc 도메인과 비교하여 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된다. 이러한 효과기 기능의 감소는 비제한적으로 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 보체 의존성 세포독성(CDC) 감소, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 감소, 항체-의존성 세포 식균작용(ADCP) 감소, 사이토카인 분비 감소, 항원 제시 세포에 의한 면역 복합체-매개 항원 흡수 감소, NK 세포에 대한 결합 감소, 대식세포에 대한 결합 감소, 단핵세포에 대한 결합 감소, 다형핵세포에 대한 결합 감소, 직접적인 신호전달 유도 세포자멸사 감소, 표적-결합된 항체들의 가교결합 감소, 수지상세포 성숙화 감소, 또는 T 세포 프라이밍 감소. 한 실시형태에서 효과기 기능의 감소는 CDC 감소, ADCC 감소, ADCP 감소 및 사이토카인 분비 감소로부터 선택된 하나 이상이다. 특정 실시형태에서, 효과기 기능의 감소는 ADCC 감소이다. 한 실시형태에서, ADCC 감소는 조작되지 않은 Fc 도메인(또는 조작되지 않은 Fc 도메인을 포함하는 해당 분자)에 의해 유도된 ADCC의 20% 미만이다.

[0694] 한 실시형태에서, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 아미노산 돌연

변이는 아미노산 치환이다. 한 실시형태에서, Fc 도메인은 E233, L234, L235, N297, P331 및 P329의 군에서 선택되는 위치에서 아미노산 치환을 포함한다(EU 넘버링). 더욱 특정한 실시형태에서, Fc 도메인은 L234, L235 및 P329의 군에서 선택된 위치에서 아미노산 치환을 포함한다(EU 넘버링). 일부 실시형태에서, Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함한다(EU 넘버링). 이러한 한 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG_1 Fc 도메인, 특히 인간 IgG_1 Fc 도메인이다. 한 실시형태에서, 상기 Fc 도메인은 위치 P329에서 아미노산 치환을 포함한다. 더욱 구체적인 실시형태에서, 아미노산 치환은 P329A 또는 P329G, 특히 P329G이다(EU 넘버링). 한 실시형태에서 Fc 도메인은 위치 P329에서 아미노산 치환 및 E233, L234, L235, N297 및 P331로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 치환을 포함한다(EU 넘버링). 더욱 구체적인 실시형태에서 추가 아미노산 치환은 E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 또는 P331S이다. 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 위치 P329, L234 및 L235에서 아미노산 치환을 포함한다(EU 넘버링). 더욱 특정한 실시양태에서 Fc 도메인은 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G("P329G LALA")를 포함한다. 이러한 한 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG_1 Fc 도메인, 특히 인간 IgG_1 Fc 도메인이다. 아미노산 치환의 "P329G LALA" 조합은 PCT 공개공보 제 WO 2012/130831에 기재된 바와 같이 인간 IgG_1 Fc 도메인의 $Fc\gamma$ 수용체(뿐만 아니라 보체) 결합을 완전히 제거하며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. WO 2012/130831은 또한 이러한 돌연변이체 Fc 도메인을 제조하는 방법 및 이의 특성, 예를 들어, Fc 수용체 결합 또는 효과기 기능을 결정하는 방법을 기재하고 있다.

[0695] IgG_4 항체는 IgG_1 항체와 비교하여 Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화도 및 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 따라서, 일부 실시형태에서 Fc 도메인은 IgG_4 Fc 도메인, 특히, 인간 IgG_4 Fc 도메인이다. 한 실시형태에서, IgG_4 Fc 도메인은 위치 S228에 아미노산 치환, 구체적으로 S228P 아미노산 치환을 포함한다(EU 넘버링). Fc 수용체에 대한 결합 친화도 및/또는 이의 효과기 기능을 추가로 감소시키기 위해, 한 실시형태에서 IgG_4 Fc 도메인은 위치 L235에 아미노산 치환, 구체적으로 아미노산 치환 L235E를 포함한다(EU 넘버링). 또 다른 실시형태에서, IgG_4 Fc 도메인은 위치 P329에 아미노산 치환, 구체적으로 아미노산 치환 P329G를 포함한다(EU 넘버링). 특정 실시형태에서, IgG_4 Fc 도메인은 위치 S228, L235 및 P329에 아미노산 치환, 구체적으로 아미노산 치환 S228P, L235E 및 P329G를 포함한다(EU 넘버링). 이러한 IgG_4 Fc 도메인 돌연변이체 및 이들의 $Fc\gamma$ 수용체 결합 특성은 PCT 공개 공보 WO 2012/130831에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0696] 특정 실시형태에서, 천연 IgG_1 Fc 도메인과 비교하여, Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화도 및/또는 감소된 효과기 기능을 나타내는 Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A, L235A 및 선택적으로 P329G를 포함하는 인간 IgG_1 Fc 도메인, 또는 아미노산 치환 S228P, L235E 및 선택적으로 P329G를 포함하는 인간 IgG_4 Fc 도메인이다(EU 넘버링).

[0697] 특정 실시형태에서, Fc 도메인의 N-글리코실화가 제거되었다. 이러한 한 실시형태에서, Fc 도메인은 위치 N297에서 아미노산 돌연변이, 특히 아스파라긴을 알라닌(N297A) 또는 아스파르트산(N297D) 또는 글리신(N297G)으로 대체하는 아미노산 치환을 포함한다(EU 넘버링).

[0698] 본원에서 상기 및 PCT 공개 공보 WO 2012/130831에 기재된 Fc 도메인 이외에도, Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능이 감소된 Fc 도메인에는 Fc 도메인 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환이 있는 도메인도 포함된다(미국 특허 제6,737,056)(EU 넘버링). 이런 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는 이른바 “DANA” Fc 돌연변이체를 비롯하여, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 또는 그 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함한다(US 특허 제7,332,581).

[0699] 돌연변이 Fc 도메인은 당업계에 널리 공지된 유전적 또는 화학적 방법을 사용하여 아미노산 결실, 치환, 삽입 또는 변형에 의해 제조될 수 있다. 유전적 방법은 코딩 DNA 서열의 부위 특이적 돌연변이 유발, PCR, 유전자 합성 등을 포함할 수 있다. 올바른 뉴클레오티드 변화는, 예를 들어, 시퀀싱을 통해 확인할 수 있다.

[0700] Fc 수용체에 대한 결합은, 예를 들어, ELISA에 의해서 또는 BIACORE® 기기(GE Healthcare)와 같은 표준 기기를 사용하는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해서 쉽게 측정할 수 있으며 이러한 Fc 수용체는 재조합 발현에 의해 얻을 수 있다. 또는, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인 또는 Fc 도메인을 포함하는 분자의 결합 친화도를 특정 Fc 수용체, 예를 들어, 인간 NK 세포 발현 $Fc\gamma IIIa$ 수용체를 발현하는 것으로 공지된 세포주를 사용하여 평가할 수 있다.

[0701] Fc 도메인, 또는 Fc 도메인을 포함하는 분자(예를 들어, 항체)의 효과기 기능을 해당 분야에 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다. ADCC를 측정하기에 적합한 검정법이 본원에 기재되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정법의 다른 예들은 US 5,500,362; Hellstrom 외, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) 및 Hellstrom 등, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); US 5,821,337; Bruggemann 등, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)에 기재되어 있다. 대안으로, 비-방사능활성 검정 방법들이 이용될 수 있다(예를 들면, 유동 세포 분석을 위한 ACTI™ 비-방사능활성 세포독성 검정(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 그리고 CytoTox 96® 비-방사능활성 세포독성 검정(Promega, Madison, WI) 참고). 이러한 검정법에 유용한 효과기 세포들은 말초 혈액 단핵 세포들(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포들을 포함한다. 대안으로, 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은, 예를 들어, Clynes 외. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95, 652-656 (1998)에서 공개된 바와 같은 동물 모델에서 생체내에서 평가될 수 있다.

[0702] 일부 실시형태에서, 보체 성분, 특히 C1q에 대한 Fc 도메인의 결합이 감소된다. 따라서, Fc 도메인이 감소된 효과기 기능을 갖도록 조작된 일부 실시형태에서, 감소된 효과기 기능은 감소된 CDC를 포함한다. Fc 도메인 또는 Fc 도메인을 포함하는 분자(예를 들어, 항체)가 C1q에 결합할 수 있는지 그리고 이에 따라 CDC 활성을 갖는지 여부를 결정하기 위해 C1q 결합 검정이 수행될 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879와 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참고한다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, CDC 검정이 실행될 수 있다(예를 들면, Gazzano-Santoro 외. J Immunol Methods 202, 163(1996); Cragg 외, Blood 101, 1045-1052(2003); 및 Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743(2004)) 참조).

[0703] *3. 치환, 삽입, 및 결실*

[0704] 특정한 경우, 본원에서 제공된 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 변이체는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다. 치환 돌연변이유발에 대한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환들을 표 3에서 “바람직한 치환”이라는 제목으로 나타낸다. 더 많은 실질적인 변화가 표 3의 “예시적 치환"이라는 제목하에 제시되며, 이는 아미노산 측쇄 분류를 참조하여 이하에서 추가로 설명된다. 아미노산 치환들은 바람직한 활성, 예를 들면, 유지된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대하여 스크리닝된 관심대상 항체 및 산물 안으로 도입될 수 있다.

[0705] **표 3. 예시적 및 바람직한 아미노산 치환**

최초 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0706]

[0707] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 다음과 같이 그룹화될 수 있다:

[0708] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0709] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0710] (3) 산성: Asp, Glu;

[0711] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0712] (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기들: Gly, Pro;

[0713] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0714] 비-보존적 치환은 이들 분류들 중 하나의 구성원을 또 다른 분류로 바꾸게 될 것이다.

[0715] 치환성 변이체의 한 가지 유형은 모 항체의 하나 이상의 초가변 영역 잔기의 치환(예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)과 관련된다. 일반적으로, 추가 연구를 위하여 선택된 생성된 변이체(들)은 모 항체와 비교하였을 때, 특정 생물학적 성질들(예를 들어, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)의 변형(예를 들어, 개선)을 가지거나 및/또는 모 항체의 특정 생물학적 성질들을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화도 성숙 항체이며, 이는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이 기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있다. 간략하게 설명하자면, 하나 또는 그 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체는 파지 상에서 디스플레이되며, 그리고 특정 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화도)에 대하여 스크리닝된다.

[0716] 예를 들어, 항체 친화도를 개선하기 위해 HVR에서 변경(예를 들어, 치환)이 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR에서 "핫스팟(hotspot)", 즉, 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이 되는 코돈에 의해 인코드되는 잔

기 (즉, Chowdhury *Methods* Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), 및/또는 항원을 접촉하는 잔기들에서 생성될 수 있고, 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화도에 대하여 테스트된다. 제2 라이브러리를 구축하고, 재선별함에 의한 친화도 성숙은 *예를 들어,* Hoogenboom 외, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37(O'Brien 외, ed., Human Press, Totowa, NJ,(2001))에서 설명되어 있다. 친화도 성숙의 일부 경우에, 다양성은 성숙을 위해 선택된 가변 유전자 내부로 임의의 다양한 방법(예를 들어, 에러-프론 PCR, 사슬 셔플링, 또는 올리고뉴클레오티드-지향 돌연변이유발)에 의해 도입된다. 이어서 제2 라이브러리가 생성된다. 그런 다음 라이브러리를 스크리닝하여 원하는 친화도를 가진 항체 변이체를 식별한다. 다양성을 도입시키는 또 다른 방법은 HVR-지향된 접근법을 포함하는데, 이 때 몇 개의 HVR 잔기(예를 들어, 한 번에 4-6개 잔기)가 무작위 배정된다. 항원 결합에 관여하는 HVR 잔기는 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 식별될 수 있다. 특히 CDR-H3 및 CDR-L3이 표적이 되는 경우가 많다.

[0717] 특정 예에서, 치환, 삽입, 또는 결손은 이러한 변경으로 이 항체가 항원에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 HVR들에 발생될 수 있다. 예를 들면, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에서 설명된 보존적 치환)이 HVR들에 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 예를 들어, HVR들의 항원 접촉 잔기의 외부에 있을 수 있다. 상기 설명된 변이체 VH 및 VL의 특정 예에서, 각 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0718] 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 식별하는데 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 지칭되며, Cunningham and Wells(1989) *Science*, 244:1081-1085에 기재되어 있다. 이 방법에서, 표적 잔기 또는 표적 잔기들의 그룹(예를 들어, 하전된 잔기, 가령 Arg, Asp, His, Lys, 및 Glu)이 식별되고, 중성 또는 음 전하 아미노산(예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어, 항원과 항체의 상호작용이 영향을 받았는지를 판단한다. 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에 추가 치환이 도입될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 사용하여 항체와 항원 사이의 접촉점을 식별한다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 치환 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체들이 원하는 성질을 포함하는지 여부를 결정하기 위해 이들을 스크리닝할 수 있다.

[0719] 아미노산 서열 삽입은 1개 잔기에서 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 길이 범위의 아미노-및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 상기 항체 분자의 다른 삽입 변이체들은 효소에 항체의 N- 또는 C-말단을 융합(예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 상기 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 항체의 N- 또는 C-말단을 융합하는 것을 포함한다.

[0720] *4. 글리코실화*

[0721] 특정 예에서, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 이중특이성 항-CD20/항-CD3 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가 또는 감소시키도록 변경될 수 있다. 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 이루어질 수 있다.

[0722] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포들에 의해 만들어지는 천연 항체는 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-링키지에 의해 일반적으로 부착된 분지화된, 이촉각성 (biantennary) 올리고당을 전형적으로 포함한다. 예를 들어, Wright 외, *TIBTECH* 15:26-32 (1997)를 참고한다. 상기 올리고당은 다양한 탄수화물, 예를 들어, 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스, 및 시알산, 뿐만 아니라 상기 이촉각성 올리고당 구조의 "스템(stem)"에 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 특정한 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 항체의 올리고당의 변형이 이루어진다.

[0723] 한 예에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 없는 탄수화물 구조를 갖는 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%가 될 수 있다. 푸코스의 양은, 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분석기로 측정한, Asn297에 부착된 모든 당구조(예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 고 만노스 구조)의 총합과 비교하여 Asn297에서의 당 사슬 내부의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 결정된다. Asn297은 Fc 영역에서 대략 위치 297(Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 항체에서 소수의 서열 변이로 인하여 위치 297의 상류 또는 하류의 약 ± 3의 아미노산, 예를 들어, 위치 294와 300 사이에 또한 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화는 개선된 ADCC 기능을 보유할 수 있다. 예를 들어, 미국 공개 공보 제2003/0157108(Presta, L.); US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) 참조. “탈푸

코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체들과 관련된 문헌들의 예는 다음을 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki 외, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki 외, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예에는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (Ripka 외 *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); 미국 특허출원 US 2003/0157108 A1, Presta, L; 및 WO 2004/056312 A1, Adams *외,* 특히 실시예 11), 및 녹아웃 세포주, 예를 들어, 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, *FUT8,* 녹아웃 CHO 세포 (*예를 들어,* Yamane-Ohnuki 외 *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. 외, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); 및 WO 2003/085107)가 포함된다.

[0724] 상기의 관점에서, 일부 경우에, 본 발명의 약학 조성물은 비글리코실화 부위 돌연변이를 포함하는 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 변이체를 포함한다. 일부 경우에, 비글리코실화 부위 돌연변이는 항체의 효과기 기능을 감소시킨다. 일부 경우에, 비글리코실화 부위 돌연변이는 치환 돌연변이이다. 일부 경우에, 항체는 효과기 기능을 감소시키는, Fc 영역의 치환 돌연변이를 포함한다. 일부 경우에, 치환 돌연변이는 아미노산 잔기 N297, L234, L235, 및/또는 D265(EU 넘버링)에 존재한다. 일부 경우에, 치환 돌연변이는 N297G, N297A, L234A, L235A, D265A, 및 P329G로 구성된 그룹에서 선택된다. 일부 경우에, 치환 돌연변이는 아미노산 잔기 N297에 존재한다. 바람직한 예에서, 치환 돌연변이는 N297A이다.

[0725] 예를 들어, 항체의 Fc 영역의 이촉각성 올리고사카라이드가 GlcNAc에 의해 양분되어 있는, 양분된 올리고사카라이드를 가진 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체 변이체들을 포함할 수 있다. 이러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 변이체들의 예들은, 예를 들어, WO 2003/011878; 미국 특허 제6,602,684; 그리고 US 2005/0123546에서 설명된다. 다른 항체 변이체들은 Fc 영역에 부착된 올리고당에 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 포함한다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들면, WO 1997/30087; WO 1998/58964; 및 WO 1999/22764에 설명되어 있다.

[0726] *5. 항체 유도체*

[0727] 특정 예에서, 본원에서 제공된 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 해당 분야에서 공지되고 쉽게 이용가능한 추가 비단백질성 모이어티를 내포하도록 추가로 변형된다. 상기 항체의 유도체화에 적합한 모이어티들은 수용성 중합체들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 수용성 중합체들의 비-제한적 예들에는, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1, 3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(동종중합체 또는 무작위 공중합체), 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 동종중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이의 혼합물이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 물에서의 안정성으로 인하여 제조에 있어 장점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지형 또는 비-분지형일 수 있다. 상기 항체에 부착된 중합체의 수는 가변적일 수 있으며, 하나 이상의 중합체가 부착된 경우, 이들은 동일하거나 또는 상이한 분자들일 수 있다. 일반적으로 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선할 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 정의된 조건에서 치료에 사용될지 여부 등을 포함한(이에 제한되지 않음) 고려 사항에 따라 결정될 수 있다.

[0728] 또 다른 예에서, 항체와 비단백질성 모이어티의 접합체들은 방사선에 노출시켜 선별적으로 가열될 수 있다. 한 예에서, 상기 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브다(Kam 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605(2005)). 방사능은 임의의 파장일 수 있으며, 그리고 정상 세포들에게는 해를 주지 않으나 상기 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포들은 사멸되는 온도에서 비단백질성 모이어티에 열을 가하는 파장을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0729] *C. 재조합 생산 방법*

[0730] 본 발명의 약학 조성물의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCBs, 예를 들어, 글로피타맙)는, 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 바와 같은 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생산될 수 있으며, 상기 문헌은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0731] 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체의 재조합 생산을 위하여, 항체를 인코딩하는 핵산이 단리되고, 숙주 세포 안에

서 추가 클로닝 및/또는 발현을 위하여 하나 이상의 벡터 안으로 삽입된다. 이러한 핵산은 통상적인 과정에 의해(예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고, 시퀀싱된다.

[0732] 항체-인코딩 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 항체는 특히 글리코실화 및 Fc 효과기 기능이 필요하지 않은 경우 박테리아에서 생성될 수 있다. 박테리아에서 항체 단편들 및 폴리펩티드 발현과 관련하여 예를 들어, 미국 특허 제5,648,237, 5,789,199, 및 5,840,523호를 참조한다. (*대장균(E. coli)*에서 항체 단편들의 발현을 설명하는 Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248*(B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254 또한 참고). 발현 후, 항체는 가용성 분획 중의 박테리아 세포 페이스트로부터 단리될 수 있으며 추가로 정제될 수 있다.

[0733] 원핵세포 이외에도, 진핵 미생물, 이를 테면 섬유성 곰팡이 또는 효모는 항체-인코딩 벡터의 적절한 클로닝 또는 발현 숙주이며, 글리코실화 경로가 "인간화되고", 결과적으로 부분적으로 또는 온전하게 인간 글리코실화 패턴을 가진 항체가 생산되는 곰팡이 및 효모 균주가 포함된다. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414(2004), 및 Li 외, *Nat. Biotech.* 24:210-215(2006) 참조.

[0734] 글리코실화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포들은 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터 또한 유도된다. 무척추동물 세포들의 예로는 식물 및 곤충 세포들이 포함된다. *스포도프테라 푸르기페르다(Spodoptera frugiperda)* 세포들의 형질감염을 위하여 곤충 세포들과 조합될 수 있는 많은 베큘로바이러스 균주들이 확인되었다.

[0735] 식물 세포 배양물 또한 숙주로 이용될 수 있다. *예를 들어*, 미국 특허 제5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, 및 6,417,429호를 참고한다(유전자삽입 식물에서 항체를 생산하기 위한 PLANTIBODIES™ 을 설명).

[0736] 척추동물 세포들 또한 숙주로 이용될 수 있다. 예를 들면, 현탁액에서 성장하도록 개조시킨 포유동물 세포주들이 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7); 인간 배아 신장 세포주(예를 들면, Graham 외, J. Gen Virol. 36:59(1977)에 기재된 293 또는 293 세포); 아기 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(예를 들면, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980)에 기재된 TM4 세포); 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 경부암종 세포(HELA); 개 신장 세포(MDCK; 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep G2), 생쥐 유방 종양(MMT 060562); 예를 들면, Mather 외, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982)에 기재된 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR-CHO 세포를 포함하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(Urlaub 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216(1980)); 및 Y0, NS0 및 Sp2/0과 같은 골수종 세포주를 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토는, 예를 들어, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248*(B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268(2003)를 참조한다.

[0737] **V. 치료 방법 및 용도**

[0738] 본원에서 기재된 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체를 포함하는 약학 조성물은 다양한 질환 및 장애를 치료하기 위한 약물로 사용하도록 제형화될 수 있다. 따라서, 본 발명은 약학 조성물을 이를 필요로 하는 대상체, 예를 들어, 암과 같은 질환이나 장애에 걸린 대상체에게 정맥내 투여하는 것을 포함하는 방법을 특징으로 한다. 본 발명의 약학 조성물은 세포 증식성 장애를 치료 또는 이의 진행을 지연시키기 위해 또는 세포 증식성 장애(예를 들어, 암)에 걸린 대상체에서 면역 기능을 향상시키기 위해 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 이를 필요로 하는 인간 대상체)에서 사용될 수 있다.

[0739] 한 양상에서, 본 발명은 세포 증식성 장애를 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 데 사용하기 위한, 본원에 설명된 바와 같은 약학 조성물을 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 세포 증식성 장애를 치료하거나 이의 진행을 지연시키기 위한 약제의 제조에 있어서 본원에 설명된 바와 같은 약학 조성물의 용도를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 본원에 기재된 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료 또는 지연을 필요로 하는 대상체에서 세포 증식성 장애를 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법을 제공한다.

[0740] 일부 실시형태에서, 세포 증식성 장애는 비호지킨 림프종(NHL)인 암이다. 일부 실시형태에서, NHL은 비호지킨 림프종(NHL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 세포 림프종, 비장 미만성 적색 펄프 소형 B 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종과 버킷 림프종의 중간적 특징을 갖는 B 세포 림프종, 11q 변이가 있는 버킷 유사 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종과 고전적 호지킨 림프종의 중간적 특징을 갖는 B 세포 림프종, 생식 중심 B 세포 유

사(GCB) 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 유사(ABC) DLBCL, 원발성 피부 모낭 중심 림프종, T 세포/조직구가 풍부한 거대 B 세포 림프종, 중추 신경계의 원발성 DLBCL, 원발성 피부 DLBCL(다리 유형), 노인의 엡스타인-바 바이러스(EBV) 양성 DLBCL, 만성 염증과 관련된 DLBCL, 원발성 종격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, ALK 양성 거대 B 세포 림프종, HHV8 관련 다발성 캐슬만병에서 발생하는 거대 B 세포 림프종, B 세포 백혈병, 유방암, 대장암, 비소세포 폐암, 다발성 골수종, 신장암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 신경교종, 소포 림프종(FL), 인시츄 소포 신생물, 맨틀세포 림프종(MCL), 인시츄 맨틀세포 신생물, 급성 골수성 백혈병(AML), 변연부 림프종(MZL), 소림프구성 백혈병(SLL), 림프형질세포성 림프종(LL), 중추신경계 림프종(CNSL), 버킷 림프종(BL), B 세포 전림프구성 백혈병, 비장 변연부 림프종, 털세포 백혈병, 비장 림프종/백혈병, 털세포 백혈병 변이체, α 중쇄 질환, γ 중쇄 질환, μ 중쇄 질환, 형질세포 골수종, 뼈의 고립성 형질세포종, 골외 형질세포종, 점막 관련 림프 조직의 림프절외 변연부 림프종(MALT 림프종), 림프절 변연부 림프종, 소아 림프절 변연부 림프종, 소아 소포 림프종, 림프종양 과립종증, 형질모세포 림프종 및 원발성 삼출성 림프종으로 구성된 군에서 선택된다. 특정 실시형태에서, 암은 생식계열 중심 B 세포 유사(GCB) DLBCL, 활성화 B 세포 유사(ABC) DLBCL, 소포 림프종(FL), 맨틀세포 림프종(MCL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 변연부 림프종(MZL), 소림프구성 백혈병(SLL), 림프형질세포성 림프종(LL), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(WM), 중추 신경계 림프종(CNSL) 또는 버킷 림프종(BL)이다.

[0741] 일부 실시형태에서, 암은 유방암, 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 다발성 골수종, 신장암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종 및 신경교종으로 구성된 군에서 선택된다.

[0742] 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 대상체에게 0.5 mg, 2.5 mg, 10 mg 또는 30 mg의 투여량으로 투여되도록 제형화될 수 있다.

[0743] 본원에 기재된 모든 방법 및 약학 제형에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 모범 의료행위 지침과 일치하는 방식으로 제형화, 투약 및 투여된다. 이와 관련하여 고려해야 할 요소에는 치료 중인 특정 장애, 치료 중인 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 병태, 장애의 원인, 제제 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의료 종사자에게 공지된 기타 요소가 포함된다. 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 꼭 그럴 필요는 없지만, 문제의 장애를 예방하거나 치료하기 위해 현재 사용되는 하나 이상의 제제와 함께 선택적으로 제형화된다. 이러한 다른 물질들의 유효량은 제형에 존재하는 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)의 양, 장애 또는 치료의 유형, 그리고 상기에서 논의된 다른 요인들에 따라 달라진다. 상기 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)는 일련의 치료일정에 걸쳐 환자에게 적절하게 투여될 수 있다.

[0744] **VI. 제조 물품**

[0745] 본 발명의 또 다른 양상에서, 상기 설명된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질들을 내포하는 제조 물품이 제공된다. 상기 제조 물품은 용기 및 용기 위에 또는 용기에 결합된 라벨 또는 약품 설명서를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 주머니, 등등을 포함한다. 용기는 다양한 재료들, 가령, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 단독으로, 또는 질환을 치료하고, 예방하고 및/또는 진단하는 데 효과적인 다른 조성물과 조합으로 약학 조성물을 보유하고, 그리고 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들면, 용기는 정맥내 용액 백, 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통 가능한 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 조성물에서 적어도 하나의 활성제는 본원에 기재된 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)이다. 라벨 또는 약품 설명서는 조성물이 선택 병태(예를 들어, 암)를 치료하기 위해 사용되며 본원에 기재된 투여 요법들 적어도 중 하나에 관련된 정보를 추가로 포함한다.

[0746] 약학 조성물은 부피가 1 ml 내지 100 ml(예를 들어, 1 ml 내지 5 ml, 5 ml 내지 10 ml, 10 ml 내지 15 ml, 15 ml 내지 20 ml, 20 ml 내지 25 ml, 25 ml 내지 30 ml, 30 ml 내지 40 ml, 40 ml 내지 50 ml, 50 ml 내지 60 ml, 60 ml 내지 70 ml, 70 ml 내지 80 ml, 80 ml 내지 90 ml, or 90 ml 내지 100 ml, 예를 들어, 약 5 ml, 약 10 ml, 약 15 ml, 약 20 ml, 약 25 ml, 약 30 ml, 약 40 ml, 약 50 ml, 약 60 ml, 약 70 ml, 약 80 ml, 약 90 ml, 또는 약 100 ml)인 용기에 공급될 수 있다.

[0747] 일부 실시형태에서, 용기는 탱크, 미니 탱크, 캐니스터, 캔 등과 같은 스테인리스 스틸 용기 또는 니켈-스틸 합금 용기(예를 들어, HASTELLOY®)이다. 일부 경우에, 이러한 용기에 담긴 약학 조성물은 원료 의약품(DS)이며, 사용 전에 추가로 희석하여 완제 의약품(DP)(예를 들어, 최종 바이알 구성)으로 만들 수 있다. 대안적으로, 용기 내의 약학 조성물은 DP이다. 일부 실시형태에서, DP는 IV 백이나 주사기(예를 들어, 주사기 펌프를 통한 전

달용)와 같은 용기에 담겨 있다.

[0748] 일부 실시형태에서, 제조 물품은 부피가 약 1 ml 이상, 예를 들어, 약 1 ml, 약 2 ml, 약 3 ml, 약 4 ml, 약 5 ml, 약 6 ml, 약 7 ml, 약 8 ml, 약 9 ml, 약 10 ml, 약 11 ml, 약 12 ml, 약 13 ml, 약 14 ml, 약 15 ml, 약 16 ml, 약 17 ml, 약 18 ml, 약 19 ml, 약 20 ml, 약 25 ml, 약 30 ml, 약 35 ml, 약 40 ml, 약 50 ml 또는 그 이상인 바이알을 포함한다. 일부 실시형태에서, 용기는 부피가 약 10 ml인 바이알이다. 일부 실시형태에서, 바이알은 일회용이다. 일부 실시형태에서, 바이알은 약 1 mg, 약 2 mg, 약 3 mg, 약 4 mg, 약 5 mg, 약 6 mg, 약 7 mg, 약 8 mg, 약 9 mg, 약 10 mg, 약 11 mg, 약 12 mg, 약 13 mg, 약 14 mg, 약 15 mg, 약 16 mg, 약 17 mg, 약 18 mg, 약 19 mg, 약 20 mg, 또는 그 이상의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)를 함유한다. 일부 실시형태에서, 용기 폐쇄 시스템은 유리 바이알, 마개 및 캡 중 하나 이상, 또는 전부를 포함한다.

[0749] 더욱이, 상기 제조 물품은 (a) 약학 조성물이 포함된 제1 용기, 여기에서 상기 조성물은 본원에 기재된 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체(예를 들어, 항-CD20/항-CD3 TCB, 예를 들어, 글로피타맙)를 포함하고; 그리고 (b) 약학 조성물이 포함된 제2 용기, 여기에서 상기 약학 조성물은 또 다른 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 상기 제조 물품은 약학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어, 주사(BWFI)용 정균수, 포스페이트-완충된 염수, Ringer 용액 및 덱스트로즈 용액이 포함된 제2(또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기가 포함된 상업적 그리고 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질들을 더 포함할 수 있다.

[0750] 본 발명의 추가적인 양상은 전술한 발명과 관련이 있다.

[0751] **실시형태**

[0752] 본원에 기재된 기술들의 일부 실시형태들은 다음과 같은 번호의 실시형태들 중 어느 하나에 따라 정의될 수 있다:

[0753] I. 액상 약학 조성물로서 다음을 포함하고:

[0754] 약 1 내지 25 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체;

[0755] 약 10 내지 50 mM의 완충제;

[0756] 약 ≥200 mM의 등장화제;

[0757] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0758] 약 ≥ 0.2 mg/ml의 계면활성제;

[0759] pH가 약 5.0 내지 약 6.0 범위이며,

[0760] 여기서 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 다음을 포함하는, 액상 약학 조성물:

[0761] a) CD20에 특이적으로 결합하는, 다음을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0762] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0763] (i) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0764] (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0765] (iii) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0766] 및 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0767] (i) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0768] (ii) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0769] (iii) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및

[0770] b) CD3에 특이적으로 결합하는, 다음을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인:

[0771] 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0772] (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0773] (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및

[0774] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및

[0775] 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0776] (i) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0777] (ii) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0778] (iii) 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0779] II. 실시형태 I에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 농도가 약 1 내지 5 mg/ml 범위인, 액상 약학 조성물.

[0780] III. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 농도가 약 0.9-1.1 mg/ml 범위인, 액상 약학 조성물.

[0781] IV. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 농도가 약 1 mg/ml인, 액상 약학 조성물.

[0782] V. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 다음을 포함하는, 액상 약학 조성물:

[0783] a) CD20에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 7의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 8의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인, 및

[0784] b) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 15의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 16의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인.

[0785] VI. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 다음을 포함하는, 액상 약학 조성물:

[0786] a) CD3, 특히 CD3 엡실론에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 분자로서; Fab 경쇄와 Fab 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되는 제1 Fab 분자;

[0787] b) CD20에 특이적으로 결합하는 제2 Fab 및 제3 Fab 분자로서, 제2 Fab 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CL에서 위치 124의 아미노산이 리신(K)(Kabat에 따른 넘버링)으로 치환되고 위치 123의 아미노산이 리신(K) 또는 아르기닌(R), 특히 아르기닌(R)(Kabat에 따른 넘버링)으로 치환되고, 제2 Fab 및 제3 Fab 분자의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산이 글루탐산(E)(EU 넘버링)으로 치환되고 위치 213의 아미노산이 글루탐산(E)(EU 넘버링)으로 치환된 제2 Fab 및 제3 Fab 분자; 및

[0788] c) 안정적으로 결합할 수 있는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인.

[0789] VII. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체는 글로피타맙인, 액상 약학 조성물.

[0790] VIII. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 완충제는 히스티딘 완충액, 선택적으로 히스티딘 HCl 완충액인, 액상 약학 조성물.

[0791] IX. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 완충제는 농도가 약 15 내지 25 mM인, 액상 약학 조성물.

[0792] X. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 완충제는 농도가 약 20 mM인, 액상 약학 조성물.

[0793] XI. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 완충제는 약 5.2 내지 약 5.8의 pH를 제공하는, 액상 약학 조성물.

[0794] XII. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 등장화제는 염, 당 및 아미노산의 군에서 선택되는, 액상 약학 조성물.

[0795] XIII. 실시형태 XII에 있어서, 등장화제는 수크로스 또는 염화나트륨인, 액상 약학 조성물.

[0796] XIV. 실시형태 XIII에 있어서, 등장화제는 약 200 mM 이상의 농도의 수크로스인, 액상 약학 조성물.

[0797] XV. 실시형태 XIII 또는 XIV에 있어서, 등장화제는 약 200 mM - 280 mM 농도의 수크로스인, 액상 약학 조성물.

[0798] XVI. 실시형태 XIII 내지 XV 중 어느 하나에 있어서, 등장화제는 약 240 mM 농도의 수크로스인, 액상 약학 조성물.

[0799] XVII. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 메티오닌은 농도가 약 5-15 mM인, 액상 약학 조성물.

[0800] XVIII. 실시형태 XVII에 있어서, 메티오닌은 농도가 약 10 mM인, 액상 약학 조성물.

[0801] XIX. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 계면활성제는 농도가 약 0.2-0.8 mg/ml인, 액상 약학 조성물.

[0802] XX. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20 또는 폴록사머 188인, 액상 약학 조성물.

[0803] XXI. 실시형태 XX에 있어서, 계면활성제는 0.2-0.8 mg/ml 농도의 폴리소르베이트 20인, 액상 약학 조성물.

[0804] XXII. 실시형태 XXI에 있어서, 계면활성제는 약 0.5 mg/ml 농도의 폴리소르베이트 20인, 액상 약학 조성물.

[0805] XXIII. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 다음을 포함하고:

[0806] 약 1 내지 5 mg/ml의 항-CD20/항-CD3 이중특이성 항체;

[0807] 약 15-25 mM의 히스티딘 완충액;

[0808] 약 200-280 mM의 수크로스;

[0809] 약 0-15 mM의 메티오닌; 및

[0810] 약 0.2-0.8 mg/ml의 PS20,

[0811] pH는 약 5 내지 약 6인, 액상 약학 조성물.

[0812] XXIV. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 다음을 포함하고:

[0813] 약 1 mg/ml의 글로피타맙;

[0814] 약 20 mM의 히스티딘 완충액;

[0815] 약 240 mM의 수크로스;

[0816] 약 10 mM의 메티오닌; 및

[0817] 약 0.5 mg/ml의 PS20,

[0818] pH는 약 5.5인, 액상 약학 조성물.

[0819] XXV. 세포 증식성 장애를 치료하는 데 유용한 약제를 제조하기 위한, 전술한 실시형태 중 어느 하나에 따른 액상 약학 조성물의 용도.

[0820] XXVI. 필요로 하는 대상체에서 세포 증식성 장애를 치료하거나 이의 진행을 지연시키는데 사용하기 위한, 실시형태 I 내지 XXIV 중 어느 하나에 따른 약학 조성물.

[0821] XXVII. 필요로 하는 대상체에서 세포 증식성 장애를 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법으로서, 실시형태 I 내지 XXIV 중 어느 하나에 따른 약학 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0822] XXVIII. 실시형태 XXV 내지 XXVII 중 어느 하나에 있어서, 세포 증식성 장애는 암인, 용도, 이러한 용도를 위한 액상 약학 조성물 또는 방법.

[0823] XXIX. 전술한 발명.

[0824] **실시예**

[0825] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제공된 일반적인 설명을 감안하여, 다양한 다른 실시예가 실시될 수 있음을 이해하여야 한다.

[0826] **실시예 1: 글로피타맙 인실리코 분석**

[0827] RO7082859/글로피타맙은 종양세포 상의 인간 CD20과 T 세포 상의 T 세포 수용체 복합체(TCR)의 인간 CD3 엡실론 서브유닛(CD3ε)에 결합하는 T 세포 이중특이성 인간화 단일클론 항체(TCB)이다. 이것은 2개의 상이한 중쇄와 2개의 상이한 경쇄로 구성된다. CH3 도메인의 점 돌연변이("놉-인투-홀")는 2개의 상이한 중쇄의 조립을 촉진시킨다. CD3 결합 Fab에서 VH 및 VL 도메인의 교환(“CrossMab 접근법”) 및 CD20 결합 Fab에서 CH 및 CL 도메인의 점 돌연변이("하전된 변이체")는 2개의 서로 다른 경쇄와 이에 상응하는 중쇄의 정확한 조립을 촉진시킨다. "놉-인투-홀" 돌연변이는 중쇄 HC1에서의 아미노 교환 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V와 중쇄 HC2에서의 아미노 교환 S354C 및 T366W로 구성된다(Kabat EU 색인 넘버링). "하전된 변이체" 돌연변이는 경쇄 LC2에서의 아미노산 교환 E123R 및 Q124K(Kabat 넘버링)와 중쇄 HC1 및 HC2에서의 아미노산 교환 K147E 및 K213E(Kabat EU 색인 넘버링)로 구성된다.

[0828] 인간 CD20에 대한 결합은 높은 친화도와 2가 결합 방식으로 일어나는 반면, CD3ε에 대한 결합은 1가이고 친화도가 낮다. RO7082859는 Fc 영역에 변형("PG LALA" 돌연변이)이 있는 인간 IgG1로, 이 변형은 시험관 내에서 Fc 감마 수용체(FcγR)와의 결합을 제거하고 자연 살해 세포(NK 세포), 단핵구/대식세포 및 호중구를 포함한 선천 면역 효과기 세포의 FcγR 매개 공동 활성화를 방지하며 FcRn(신생아 Fc 수용체)과의 기능적 결합은 변화시키지 않는다. "PG LALA" 돌연변이는 중쇄 HC1과 중쇄 HC2에서 아미노산 교환 P329G, L234A 및 L235A로 구성된다("PG LALA", Kabat EU 색인 넘버링).

[0829] 재조합 항체는 CHO 세포에서 생산되며, 2개의 중쇄(각각 449개와 674개 아미노산 잔기)와 3개의 경쇄(각각 232개와 219개(2개의 사본) 아미노산 잔기)로 구성되며, 도 2에서 보는 바와 같이 비대칭 구조로 배열된다.

[0830] 요약 활성 핫스팟

[0831] 상기 분자의 CD3 결합 모이어티의 경우, 인실리코 예측은 중쇄의 CDR3에서 분해되기 쉬운 Asn 잔기 2개와 노출된 Trp 잔기 1개를 나타냈다. 14일간의 스트레스 실험에서, pH 6.0에서 인큐베이션한 후에는 표적 결합 활성에 큰 변화가 관찰되지 않았지만, 생리학적 pH(PBS pH 7.4, 데이터 미제시)에서 인큐베이션한 후에는 표적 결합 활성이 크게 손실되었다.

[0832] **실시예 2: 글로피타맙 제형 개발 GLP 독성 및 인체 연구로의 진입.**

[0833] 스크린은 표 4에 표시된 계획에 따라 수행되었다. 스크린 중에, 제형은 다음 조건에 노출되었다: 3주 및 6주 보관(5℃, 25℃ 및 40℃), 5℃ 및 25℃에서 1주일 동안 진탕, 동결/해동(F/T) 스트레스(5회 주기). 후보로 선정된 제형은 이후 최대 52주까지 추적관찰된다.

[0834] **표 4: 제형 코드에 따른 적응형 플랫폼 스크린 연구 설계**

[0835]

제형	글로피타맙 단백질 농도(mg/ml)	완충액	pH	부형제 1	부형제 2	계면활성제
F1	5	20 mM His/His-Cl	5.5	240 mM의 수크로스	10 mM의 메티오닌	0.05 (w/v)% PS20
F2	5	20 mM His/His-Cl	5.5	240 mM의 수크로스	-	0.05 (w/v)% PS20
F3	5	20 mM His/His-Cl	5.5	240 mM의 수크로스	10 mM의 메티오닌	0.05 (w/v)% Px188
F4	5	20 mM His/His-Cl	5.5	240 mM의 수크로스	-	0.05 (w/v)% Px188
F5	5	20 mM His/His-Cl	6.0	240 mM의 수크로스	10 mM의 메티오닌	0.05 (w/v)% PS20

[0836] 5℃, 25℃, 40℃에서 6주 동안 보관한 결과 모든 제형은 눈에 보이는 입자 및 보이지 않는 입자, 색상, 탁도, pH, 단백질 함량 등 대부분의 테스트된 물리적 특성에서 큰 변화 없이 유지되었다. CE-SDS(모세관 전기영동 소듐 도데실 황산염) 데이터는 후보 선정에 중요하지 않으므로 표시되지 않았다.

[0837] 세이데나이더 방법에 의한 눈에 보이는 입자 분석 결과, 모든 보관 조건에서 두 제형 모두 눈에 보이는 입자가 형성되지 않는 것으로 나타났다. 눈에 보이지 않는 입자 수는 적었다(표시되지 않음). 기계적 스트레스 조건에

서 F2-F5는 5 및 25℃ 모두에서 많은 입자를 보였다. F1은 두 조건 모두에서 입자가 없었다. EP와 Optima를 사용한 결과, 모든 조성물에서 입자가 거의 없었으며(입자 0개), F3과 F4(모두 P188 사용)는 입자가 보였지만 한계치 이하(표시되지 않음)였다. 5℃ 진탕에서 눈에 보이지 않는 입자들은 F4(P188)에서보다 F3(P188 + Met)에서 유의미하게 더 나빴으며, 다른 모든 제형은 각 조건에서 유사한 수를 나타냈다(표시되지 않음).

[0838] 6주 후 모든 조건하의 모든 제형에서 탁도와 색상은 유의미한 변화를 보이지 않았다. 계면활성제 함량은 5 및 25℃에서 안정적이었고, P188을 함유한 두 제형(F3, F4)도 40℃에서 안정적이었다. 활성 제형(F1, F2 및 F5)을 함유한 모든 PS20의 경우, 제형에 메티오닌이 포함되어 있든 없든 관계없이 40℃에서 계면활성제 함량의 감소가 관찰되었다.

[0839] 메티오닌의 유익한 효과는 PS20이 포함된 위약 제형에서만 볼 수 있었으며, 40℃에서 PS 함량이 떨어진 것은 P2뿐이었다(도 3). 생화학적 특성 분석 결과 40℃에서 보관한 후에만 제형에 차이가 나타났다.

[0840] 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에서 단량체 손실은 F2 및 F5에서 더 두드러졌으며, 이는 HMW(고분자량) 면적의 증가와 상관관계가 있다. 새로운 HMW 종이 출현하는 것을 볼 수 있었는데, F3와 F4에서는 미미했지만 F1에서는 더 강력했고, F2와 F5에서는 우세했다. LMW(저분자량) 종은 모든 제형에서 거의 동일한 비율로 증가하는 것으로 나타났다(도 4). 이온 교환 크로마토그래피(IEC)에서도 유사한 경향을 관찰할 수 있었으며, 염기성 피크 면적이 전반적으로 증가하고 F2 및 F5에서 산성 면적의 증가가 더 두드러졌다(도 5).

[0841] 요약하면, 데이터는 F2와 F5를 명확히 배제하였고, F1, F3, 및 F4가 동등하게 안정적이며, 셋 중 어느 하나에 대한 명확한 선호도가 없음을 보여주었다. F1 (5 mg/ml 글로피타맙, 20 mM 히스티딘 / 히스티딘 HCl, pH 5.5, 240 mM의 수크로스, 10 mM의 메티오닌, 0.05% (w/v) PS20)가 후보로 지정되었다. F1에 대한 모든 분석 결과의 요약을 도 6에 나타낸다.

[0842] **실시예 3: GLP 독성 / 인체 연구로의 진입**

[0843] BIACORE®에 의한 결합

[0844] 전술한 순도 결과는 F2 및 F5의 경우 40℃에서 CD20 결합의 손실에, 그리고 CD3 결합 손실은 나머지 제형에서 손실에 10 내지 20%인 것과 비교하여 해당 제형은 최대 50%에 달하는 강력한 손실에 반영된다(도 7A 및 도 7B).

[0845] **실시예 4: 3상 및 상업적 제형화를 위한 개발 연구.**

[0846] 본 실시예에서는 글로피타맙 제형의 제약 개발에 대한 개요를 제공한다. 이러한 개발의 결과로, 글로피타맙 약물 제품은 IV 주입용 용액의 멸균 액상 농축액으로 제공된다. 완제 의약품은 20 mM L-히스티딘 / L-히스티딘 염산염(HCl) 완충액 중 1 mg/ml 글로피타맙, 240 mM의 수크로스, 10 mM L-메티오닌, 0.5 mg/ml 폴리소르베이트 20, pH 5.5로 구성된다. 글로피타맙은 이러한 원료 의약품과 완제 의약품의 유일한 활성 성분이다. 제형 개발 연구를 통해 투약 형태와 제형이 의도한 용도에 적합하다는 것이 확인되었다. 이 제형은 제조, 보관, 운송 및 투여 중에도 완제 의약품이 안정성을 유지할 만큼 충분히 견고하다.

[0847] 단백질 농도가 더 높은(예를 들어, 5, 25, 또는 50 mg/ml 글로피타맙) 제형을 테스트했지만 PS20 분해로 인해 눈에 보이지 않는 입자와 보이는 입자가 형성되어 더 이상 진행되지 않았다. 단백질 농도와 함께 증가하는 수준의 유리 지방산(라우르산 및 미리스트산)의 방출은 눈에 보이지 않는 입자 형성의 근본 원인이 가수분해성 PS20 분해로 인한 것임을 확인시켜 주었다.

[0848] 제조 도중 및 완제 의약품 유통 기한 종료시까지 의약품 품질을 보장하는 동시에 취급 단계가 적은 액상 투약 형태가 선택되었다.

[0849] 글로피타맙 약물 제품은 2개의 바이알 구성으로 제공되는 2가지 농도로 상업적으로 이용가능하게 될 것이다. 6 ml 일회용 유리 바이알에 2.5 mg/바이알을 채우고, 15 ml 일회용 유리 바이알에 10 mg/바이알을 채워, 2.5, 10, 30 mg의 임상 필수 용량을 충족하는 동시에 제품 낭비를 최소화한다. 상업용 완제 의약품 제형의 경우, 부형제 조성을 변경하지 않고 글로피타맙의 농도를 1 mg/ml로 줄였다.

[0850] 제형 개발 연구는 완제 의약품에 대한 적절한 투약 형태, 단백질 농도, 계면 활성제 농도, 완충액 종류, 용액 pH, 안정화제, 등장화제 및 바이알 구성을 선택하는 것에 대한 근거를 알려준다. 원료 의약품의 제형은 시설 적합성, 희석 및 보관 고려 사항을 고려하여 최적화되었다.

[0851] 투약 형태 선택

[0852] 제조 과정에서 제품 품질을 보장하고 완제 의약품의 유통 기한 종료시까지 취급 단계가 거의 필요 없는 주입용 농축액을 제공하기 위해 액상 투여 형태가 선택되었다.

[0853] 단백질 농도 선택

[0854] 1상에서 5 mg/ml의 단백질 농도를 선택하였으며 3상까지 유지되었다. 이후 제형 개발 연구와 업데이트된 임상 투약 요건을 기반으로 1 mg/ml의 단백질 농도가 상업적 제형으로 선택되었다.

[0855] pH 5.5에서 20 mM L-히스티딘/L-히스티딘 염산염, 10 mM L-메티오닌, 240 mM D-수크로스 및 0.5 mg/ml 폴리소르베이트 20(PS20)을 함유한 제형의 안정성을 임상적 필요에 맞게 단백질 농도를 조절하여 제조하기 위해 1 mg/ml, 5 mg/ml 및 25 mg/ml의 글로피타맙 농도에서 테스트했다. 이러한 제형들은 초기 시점(T0), 여러 중간 시점, 및 104주간 2℃-8℃에서 보관한 후 연구 종료 시점에 SE-HPLC 및 IE-HPLC를 통한 글로피타맙 순도, PS20 함량, 눈이 보이는/눈에 보이지 않는 입자 형성을 평가하여 평가되었다.

[0856] 연구 전체에 걸쳐 1 mg/ml 및 5 mg/ml 제형 간에 SE-HPLC 및 IE-HPLC에 의한 순도는 비슷한 것으로 나타났다(도 8A 및 도 8B). 눈에 보이지 않는 입자의 수도 비슷했다. 또한 1 mg/ml 제형은 5 mg/ml 및 25 mg/ml 제형과 비교했을 때 방법 변동성을 넘어서는 PS20 분해가 나타나지 않았다(도 12, 아래 폴리소르베이트 20 분해 평가 참조). 이러한 결과와 업데이트된 2.5, 10, 30 mg의 임상 용량 요법에 기반하여 1 mg/ml 제형이 상업적 제형으로 선택되었다.

[0857] 0.9-1.1 mg/ml 단백질의 농도 범위는 이후 다변량 제형 견고성 연구에서 추가로 평가되었다(실시예 5, 제형 견고성 연구 참조). 본 연구에서는 이 농도 범위에 걸쳐 허용 가능한 안정성 거동이 확인되었다.

[0858] pH, 완충액, 안정화제 및 등장화제 선택

[0859] 제형 개발 연구에 기초하여, pH 5.5의 20 mM L-히스티딘/L-히스티딘 염산염 용액이 1상 시험의 완충액으로 선택되었고, 이와 함께 안정화제로 10 mM L-메티오닌 및 등장화제로 240 mM D-수크로스가 선택되었으며, 3상 시험과 상업적 제형에서 유지되었다.

[0860] 5 mg/ml의 글로피타맙에 대한 연구는 20 mM L-히스티딘/L-히스티딘 염산염 완충액의 pH 범위 5.5 내지 6.0과 L-메티오닌 수준 0 및 10 mM을 테스트하기 위해 설정되었다. 또한, 240 mM D-수크로스와 130 mM 염화나트륨 간의 비교도 수행되었다.

[0861] pH와 안정화제의 효과는 초기 시점(T0)과 40℃에서 6주간 보관한 후 SE-HPLC와 IE-HPLC를 통해 글로피타맙의 순도와 눈에 보이는/눈에 보이지 않는 입자 형성을 평가하여 평가했다. 등장화제의 선택은 초기 시점(T0)과 25℃에서 26주간 보관한 후 SE-HPLC, IE-HPLC를 측정하여 평가하고 눈에 보이는/눈에 보이지 않는 입자 형성을 확인했다. pH 5.5의 20 mM L-히스티딘/L-히스티딘 염산염 완충액과 10 mM L-메티오닌을 조합한 것은 안정화제를 첨가하지 않은 해당 제형이나 pH 6의 20 mM L-히스티딘/L-히스티딘 염산염 완충액/10 mM L-메티오닌 조합에 비해 고분자량 종(HMWS)의 형성(도 9A)과 전하 변이체의 변화(도 9B)가 가장 낮았다. 20 mM의 L-히스티딘/L-히스티딘 염산염 일수화물 농도는 완제 의약품 제조 도중뿐만 아니라 원료 의약품과 완제 의약품의 보관 중에도 제형 pH를 유지하기에 충분한 것으로 나타났다.

[0862] 240 mM D-수크로스는 240 mM D-수크로스와 130 mM 염화나트륨을 비교하여 선택되었다. 눈에 보이지 않는 입자 수는 제형 간에 비슷했다. D-수크로스를 함유한 제형의 경우 25℃에서 26주간 보관한 후 눈에 보이는 입자 형성이 관찰되지 않았지만, NaCl을 함유한 제형의 경우 눈에 보이는 입자가 관찰되었다(도 10).

[0863] 계면활성제 선택

[0864] 0.5 mg/ml 농도의 PS20이 1상 연구에 선택되었으며, 안정성 연구 결과에 따라 상업적 제형이 출시될 때까지 유지되었다. 폴록사머 188(P188)의 안정화 효과를 PS20과 대비하여 조사하기 위해 pH 5.5의 20 mM L-히스티딘/L-히스티딘 염산염 완충액, 10 mM L-메티오닌 및 240 mM D-수크로스를 혼합한 50 mg/ml 글로피타맙을 이용한 연구가 설정되었다. P188은 0.5, 0.7, 및 1.0 mg/ml 수준에서; PS20은 0.1, 0.3, 및 0.5 mg/ml 수준에서 테스트되었다.

[0865] 첨가된 계면활성제의 효과는 초기 시점(T0)과 25℃에서 7일간 진탕 후 SE-HPLC와 IE-HPLC를 사용한 글로피타맙의 순도 및 눈에 보이는/눈에 보이지 않는 입자 형성을 평가함으로써 평가되었다.

[0866] 모든 P188 농도에서 눈에 보이는 입자 형성이 관찰되었다. 따라서 이는 글로피타맙에 적합한 계면활성제로서 배제되었다(도 11). 25℃에서 7일간 진탕 후 PS20이 함유된 제형에서는 눈에 보이는 입자가 검출되지 않았다(도

11). 0.1 mg/ml PS20 함유 제형의 경우 HMWS와 전하 변이체가 상당히 증가한 반면, 0.3 mg/ml PS20 함유 제형의 경우 25℃에서 7일간 진탕 후 0.5 mg/ml PS20 함유 제형에 비해 HMWS와 전하 변이체 수준이 약간 증가한 것으로 관찰되었다(도 11). 눈에 보이지 않는 입자 수는 서로 다른 PS20 농도 전반에 걸쳐 서로 비슷했다. 0.1 mg/ml PS20 함유 제형의 경우 HMWS와 전하 변이체가 상당히 증가한 반면, 0.3 mg/ml PS20 함유 제형의 경우 25℃에서 7일간 진탕 후 0.5 mg/ml PS20 함유 제형에 비해 HMWS와 전하 변이체 수준이 약간 증가한 것으로 관찰되었다(도 11). 따라서 0.5 mg/ml PS20을 함유한 제형이 선택되었다. 0.5 mg/ml의 폴리소르베이트 20 수준은 글로피타맙을 가공(예를 들어, 교반, 동결 및 해동, 전단 응력), 취급, 보관 및 운송 중에 발생할 수 있는 스트레스로부터 보호하기에 충분한 것으로 나타났다. 0.2-0.8 mg/ml PS20 농도 범위는 이후 다변량 제형 견고성 연구에서 추가로 평가되었다(실시예 5, 제형 견고성 연구 참조). 본 연구에서는 이 농도 범위에 걸쳐 허용 가능한 안정성 거동이 확인되었다.

[0867] **실시예 5: 제형 견고성 연구**

[0868] 원료 의약품과 완제 의약품의 조성은 완충액 성분의 중량 허용 오차와 같은 제조 요인에 따라 일정한 범위 내에서 달라질 수 있다. 다변량 제형 견고성 연구가 수행되었으며, 이를 통해 글로피타맙의 관련 품질 속성(QA)이 이들 조성 범위의 경계에서 허용 가능한 수준인 것으로 나타났다. 의약품 보관 중 주요 품질 속성(CQA)에 잠재적인 영향을 미치는 것으로 확인된 세 가지 요인에 대해 2가지 수준에서 다변량 안정성 연구가 수행되었다. 다음 세 가지 제형 매개변수가 평가되었다:

[0869] 1. 단백질 농도

[0870] 2. pH

[0871] 3. PS20 농도

[0872] 또한, 단변량 안정성 연구에서 세 가지 제형 매개변수가 개별적으로 평가되었다.

[0873] 4. 완충액 강도

[0874] 5. L-메티오닌 농도

[0875] 6. D-수크로스 농도

[0876] 다변량 제형 견고성 연구는 글로피타맙의 관련 CQA가 청구범위에 기재된 제형 조성 범위 전반에 걸쳐 허용 가능한 것으로 나타났다.

[0877] 연구 설계

[0878] 위험성 평가는 유통 기한 동안 의약품 품질을 유지하는 데 중요한 원료 의약품 및 완제 의약품의 제형 매개변수를 식별하기 위해 수행되었다. 이에 따라 다변량 연구와 단변량 연구가 설정되었다.

[0879] *다변량 연구(F6 내지 F12)*

[0880] 단백질 농도, pH, 및 PS20 농도의 세 가지 제형 매개변수를 입력 요인으로 사용하여 2개 수준에서 부분 요인 설계(해상도 3) 안정성 연구를 수행했다.

[0881] *단변량 연구(F13 내지 F20)*

[0882] L-메티오닌과 D-수크로스 농도(낮은 및 높은 수준), 그리고 완충액 강도(낮은 및 높은 수준)가 테스트되었다.

[0883] 낮은 단백질 농도, 낮은 pH 및 낮은 PS20 농도의 한 가지 제형은 높은 pH, 높은 단백질 농도 및 높은 PS20 농도의 해당 제형과 직접 비교하여 평가되었다.

[0884] 허용 기준 설정을 뒷받침하기 위해 0.3 mg/ml PS20 농도의 한 가지 제형이 포함되었다.

[0885] 테스트된 제형 매개변수 범위는 표 5에 기재된 완제 의약품 사양 허용 기준 및/또는 제조 허용 범위를 포함하도록 정의된다. 표 6은 3개의 중심 포인트를 포함하는 15개의 실험을 포함하는 설계 계획을 보여주며, 3개의 중심 포인트는 목표로 하는 상업용 제형 조성에 해당한다.

[0886] **표 5: 제형 견고성 연구: 목표 제형 및 다변량 및 단변량 연구 범위**

		목표	하위 수준	상위 수준
글로피타맙 농도(mg/ml)	Mab	1	0.9	1.1
L-히스티딘 / L-히스티딘 염산염(mM)	His	20	15	25
pH	pH	5.5	5.0	6.0
PS20 농도(mg/ml)	PS20	0.5	0.2 (0.3)	0.8
D-수크로스 농도(mM)	Suc	240	200	280
L-메티오닌 농도(mM)	Met	10	5	15

[0887]

[0888] **표 6: 제형 견고성 연구 설계 계획: 평가된 글로피타맙 제형**

다변량 연구				단변량 연구에서 테스트됨		
제형	단백질 농도 (mg/ml)	pH	PS20 농도 (mg/ml)	완충액 강도(mM)	D-수크로스 농도 (mM)	L-메티오닌 농도 (mM)
F6	0.90	5.0	0.80			
F7	1.10	5.0	0.20			
F8	0.90	6.0	0.20			
F9	1.10	6.0	0.80	20	240	10
F10(목표)	1.00	5.5	0.50			
F11(목표)	1.00	5.5	0.50			
F12 (목표)	1.00	5.5	0.50			
단변량 연구						
F13	0.90	5.0	0.20	20	240	10
F14	1.00	5.5	0.50	20	200	10
F15	1.00	5.5	0.50	20	280	10
F16	1.00	5.5	0.50	20	240	5
F17	1.00	5.5	0.50	20	240	15
F18	1.00	5.5	0.50	15	240	10
F19	1.00	5.5	0.50	25	240	10
F20	1.00	5.5	0.30	20	240	10

[0889]

[0890] 표 6에 기재된 제형 조성에서 글로피타맙의 안정성은 다음과 같이 평가되었다:

[0891] ● 안정성 연구:

[0892] o 보관 조건 실시간(2℃-8℃) 및 가속(25℃)

[0893] o 테스트 빈도: 상기 보관조건에서 0, 4, 13, 26(25℃ 보관종료), 39, 52, 78 및 104주 보관

[0894] ● 스트레스 테스트:

[0895] o 5번의 동결-해동 주기,

[0896] o 2-8℃에서 1주일 동안 진탕 및 25℃에서 1주일 동안 진탕

[0897] ● DS를 지지하는 안정성: -40℃에서 0, 26, 52 및 104주 동안 보관

[0898] 평가된 QAs:

[0899] o HHMWS(고중량 분자종) 및 SE-HPLC에 의한 주요 피크

[0900] o LMWS(저중량 분자종) 및 비환원 CE-SDS에 의한 주요 피크,

[0901] o IE-HPLC에 의한 산성 피크 2 및 3, 산성 영역, 염기성 영역 및 주요 피크

[0902] o 자외선-가시광선 분광법에 의한 단백질 함량

[0903] o HPLC-ELSD에 의한 폴리소르베이트 20 함량

[0904] o RP-HPLC에 의한 L-메티오닌 및 L-히스티딘 농도

[0905] o 산화, 및 펩티드 맵핑(LC-MS)에 의한 이성질화

[0906] o 생물학적 검정에 의한 효능

[0907] o 눈에 보이는 입자

[0908] o 눈에 보이지 않는 입자

[0909] o 색상, 선명도/유광

[0910] o pH

[0911] o 삼투압

[0912] o 밀도

[0913] 전체 데이터 분석 절차

[0914] 모든 품질 속성에 대한 데이터는 각 제형에 대해 시간 경과에 따라 수집되었다. 시간 경과에 따른 각 QA의 상대적 변화를 평가했다.

[0915] *다변량 연구:*

[0916] 각 품질 속성과 각 제형에 대해 시간 경과에 따른 단순 선형 회귀 분석이 적용되었다. 그리하여 각 품질 속성과 각 제형에 대한 분해 속도(degradation rate)가 계산된다. 명확하게 언급되지 않은 경우, 분해 속도는 주간 분해 속도로 보고된다. 이러한 분해 속도는 실험 설계(DoE) 연구에서 반응으로 평가되며, 단백질 농도, pH, 및 PS20 농도의 세 가지 매개변수가 이러한 분해에 미치는 영향을 조사했다. 시간 경과에 따라 품질 속성이 목표 제형과 비교하여 의미 있는 변화를 보이지 않으면 회귀 분석 및 효과 추정은 수행되지 않았다. 시간 경과에 따라 유의미한 변화를 보이는 품질 속성의 경우, 선형 회귀 분석을 사용하여 세 가지 요인이 분해 속도에 미치는 주 효과를 추정했다. 또한, 이러한 효과를 그래픽으로 도시하기 위해 주 효과 도표가 표시된다.

[0917] *단변량 연구:*

[0918] 단변량 연구에서 테스트한 매개변수의 경우, 2℃-8℃에서 39주간 보관한 후의 결과를 T0와 비교하여 평가하여 잠재적 변화를 확인했다. 변화가 확인되면 분해 속도를 계산하고 조사된 제형 매개변수가 가장자리에서 미치는 영향을 추정하기 위해 목표 제형의 분해와 비교한다. 일부 경우, 주간 분해 속도는 여기에 104의 계수를 곱하여 104주 동안 관찰된 분해 속도로 변환되었다. 회귀 분석은 JMP® 소프트웨어(SAS Institute, Cary, NC, 버전 10.0 이상)를 사용하여 수행되었다.

[0919] *권장 보관 조건(2℃-8℃)에서 견고성 제형의 안정성:*

[0920] 2℃-8℃에서 39주간 보관 후 목표 제형과 비교한 상대 변화의 평가 개요가 표 7에 제공되어 있다. pH 6에서 제제화된 모든 제형(F8, F9, F20)에서 산성 변이체 수준(IE-HPLC에 의한 산성 영역 및 산성 피크 2)이 증가한 것이 관찰되었다. 관찰된 산성 변이체의 증가는 영향을 받은 제형에서 상응하는 IE-HPLC 주요 피크의 감소에 반영된다. 2℃-8℃에서 39주간 보관한 후에는 다른 모든 제형의 기타 CQA 모두에서 어떠한 변화도 관찰되지 않았다. 결론적으로, pH는 중요한 제형 매개변수로 확인되었다. 다른 모든 제형 매개변수, 단백질 함량, PS20, L-메티오닌 및 D-수크로스 농도, 그리고 완충액 강도는 조사된 범위에 걸쳐 테스트된 CQA에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0921] *가속 보관 조건(25℃)에서 견고성 제형의 안정성:*

[0922] 2℃-8℃ 데이터와 비교할 때, 탈아미드화로 인한 산성 변이체 수준(IE-HPLC에 의한 산성 영역 및 산성 피크 2)의 증가는 pH 6에서 제형화된 모든 제형(F8, F9, F20)에서 관찰되었으며, 이는 영향을 받은 제형에서 IE-HPLC 주요 피크의 감소에 반영된다. 또한, pH 5에서 제형화된 F1 및 F2의 경우 CE-SDS에 의한 LMWS의 증가로 인해 단편화 수준이 증가하는 것이 관찰되었다. 이러한 증가는 CE-SDS 주요 피크의 감소에 반영된다. 25℃에서 26주간 보관한 후에는 다른 모든 제형의 다른 CQA에 있어서 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.

[0923] 결론적으로, 25℃ 데이터는 pH가 중요한 제형 매개변수라는 것을 확인시켜 주었다. 다른 모든 제형 매개변수는 CQA에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0924] **표 7: 2℃-8℃에서 39주간 보관 후 관련 CQA의 상대적 변화**

	목표 제형과 비교한 상대적 변화	목표 제형과 비교한 설명
SE-HPLC 에 의한 순도		
HMW 의 합계	변화 없음	
주요 피크	변화 없음	
NR-CE-SDS 에 따른 순도		
LMWS 의 합계	변화 없음	
주요 피크	변화 없음	
IE-HPLC 에 의한 순도		
산성 피크 2	증가	pH 6 의 모든 제형(F8, F9, F20)에서 증가
산성 피크 3	변화 없음	
산성 영역	증가	pH 6 의 모든 제형(F8, F9, F20)에서 증가
주요 피크	감소	pH 6 의 모든 제형(F8, F9, F20)에서 감소
단백질 농도	변화 없음	
폴리소르베이트 20 농도	변화 없음	
RP-HPLC 에 의한 L-메티오닌 및 L-히스티딘 농도[a]	해당 없음	
트립토판 및 메티오닌 산화	변화 없음	
아스파르트산 이성질화[b]	변화 없음	
생물학적 검정에 의한 역가	변화 없음	
눈에 보이는 입자	변화 없음	
눈에 보이지 않는 입자	변화 없음	
색상, 선명도/유광	변화 없음	
용액 pH	변화 없음	
삼투압[a]	해당 없음	

[a] t=0 에서 및 104 주 후 연구 종료 시점에서의 측정값.

[0925] [b] t=0 및 2℃-8℃ 에서 52 주 및 104 주간 보관 후 측정.

[0926] *권장 원료 의약품 보관 조건(-40℃)에서 견고성 제형의 안정성:*

[0927] 청구범위에 기재된 전체 제형 조성 범위에 걸쳐 원료 의약품의 안정성을 뒷받침하기 위해, -40℃에서 보관한 완제 의약품 견고성 제형에 대한 안정성 연구가 수행되었다. 연구 결과에 따르면, 제형을 권장 원료 의약품 보관 조건인 -40℃에서 26주 동안 보관한 경우 테스트된 품질 속성에 유의미한 변화가 관찰되지 않았다.

[0928] *진탕 및 동결/해동 스트레스 후 견고성 제형의 안정성:*

[0929] 제형은 2℃-8℃ 또는 25℃에서 1주일 동안 진탕되었다. 또한, 제형은 -40℃와 5℃ 사이에서 5번의 동결/해동 주기를 거친 후 평가되었다. 모든 샘플은 진탕되거나 동결/해동 스트레스를 받을 때 눈에 보이는 입자가 거의 없었다.

[0930] 모든 제형에서 눈에 보이지 않는 입자는 진탕 및 동결/해동 스트레스 시 변화하지 않았다. PS20 함량이 낮은 제형(0.2 mg/ml, F7, F8, F13)은 0.3-0.8 mg/ml의 PS20 수준을 함유한 다른 모든 제형과 비교했을 때 진탕 및 동결/해동 스트레스 이후 의약품 품질에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0931] 이 결과는 ≥0.2 mg/ml 수준의 폴리소르베이트 20의 농도는 단백질을 진탕 및 동결/해동 스트레스로부터 보호하기에 충분하다는 것을 확인시켜 준다. 비교해 보면, D-수크로스 함량이 낮은 제형(200 mM, F19)은 240-280 mM 수준의 D-수크로스를 함유한 다른 모든 제형과 비교했을 때 진탕 및 동결/해동 스트레스 이후 어떠한 의약품 품질의 영향도 나타내지 않았다. 이 결과는 ≥200 mM 수준의 D-수크로스가 단백질을 동결/해동 스트레스로부터 보

호하기에 충분하다는 것을 확인시켜 준다. 대조 샘플과 비교했을 때 진탕하거나 동결/해동 스트레스를 받았을 때 어떠한 다른 품질 속성에도 실질적인 변화가 관찰되지 않았다.

[0932] *권장 보관 조건(2℃-8℃)의 데이터를 기반으로 확인된 CQA의 선형 회귀 분석:*

[0933] 영향을 받은 CQA(용액 pH, 단백질 농도 및 PS20 농도)에 대해 단순 선형 회귀 분석을 수행했다. pH가 주요 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 계산된 주당 분해 속도에 104주(=24개월)를 곱하여 유통 기한(EoS) 종료시까지 외삽되었다. 외삽된 결과가 표 8에 요약되어 있다.

[0934] 선형 회귀 분석 결과, 모든 CQA가 안정성 허용 기준 내에 있기 때문에, 테스트된 pH 범위는 확인된 CQA에 유의미한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 산성 영역의 증가를 제어하기 위하여 완제 의약품 출하 시 pH 허용 기준을 5.2-5.8로 강화하였다.

[0935] **표 8: 2℃-8℃ 데이터 기반 선형 회귀 분석 결과**

[0936]

CQA	pH 5[a] 104 주 후 외삽된 분해 속도	pH 5[a] EoS 에서 계산된 값[b]	pH 6[a] 104 주 후 외삽된 분해 속도	pH 6[a] EoS 에서 계산된 값[b]	목표 (pH 5.5) 104 주 후 외삽된 분해 속도	목표 (pH 5.5) EoS 에서 계산된 값[b]
산성 피크 2(면적%)	0.298	5.9	1.829	7.4	1.064	6.7
산성 피크 3(면적 %)	0.147	2.8	0.481	3.1	0.314	2.9
산성 영역(면적 %)	1.509	15.7	3.996	18.2	2.753	16.9
LMWS(면적 %)	0.574	2.4	0.134	2.0	0.354	2.2

[0937] [a] 다른 모든 매개변수는 선형 회귀 분석에 대해 목표로 설정된다.

[0938] [b] 104주 후 t=0 분해 속도로 계산(모든 제형에 대해 평균 t=0 사용).

[0939] *결론:*

[0940] 외삽된 데이터에 따르면 24개월(청구범위에 기재된 완제 의약품의 유통 기한) 후에 6.0의 높은 pH가 산성 변이체 수준에 영향을 미침을 시사한다. 따라서, 완제 의약품의 안정성을 유지하는 동안 산성 형태의 생성을 제한하기 위해 완제 의약품 출시 시 pH 허용 기준을 5.2-5.8로 강화했다.

[0941] 이 제형은 다음과 같은 이유로 유통 기한 종료시까지 견고한 것으로 간주된다:

[0942] CQA는 제형 범위의 가장자리에 있는 모든 제형에 대해 t=0에서 그리고 2℃-8℃에서 9개월 보관 후 출시 허용 기준을 충족한다

[0943] CQA는 제형 범위의 가장자리에 있는 모든 제형에 대해 분해 속도를 사용하여 EoS로 외삽할 때 안정성 허용 기준을 충족한다.

[0944] **실시예 6: 폴리소르베이트 20 분해의 평가**

[0945] 폴리소르베이트 20은 산화 또는 가수분해 메커니즘을 통해 분해될 수 있다. 폴리소르베이트 20의 가수분해로 인해 라우르산과 같은 유리지방산(FFA)이 형성된다. 특정 고농도에서 FFA는 눈에 보이지 않거나 눈에 보이는 입자를 형성할 수 있다. 또한, 교반 스트레스로부터 단백질을 보호하는 데 필요한 양보다 제형에 폴리소르베이트 20이 적게 함유되어 있는 경우에도 폴리소르베이트 20 분해가 우려된다.

[0946] 이러한 우려 사항으로 인해, 제형 개발 중에 폴리소르베이트 20 분해를 모니터링했다. 글로피타맙 제형 개발 과정에서 단백질 농도에 따라 PS20 분해가 관찰되었다. 25 mg/ml 제형의 경우 유의미한 PS20 분해가 관찰되었으며(도 12), 2℃-8℃에서 눈에 보이는 입자가 관찰되었다. 5 mg/ml 제형의 경우 PS20 분해가 덜 두드러졌으며, 20

개월 후에 눈에 보이는 입자가 관찰되었다. 눈에 보이지 않는 입자의 수는 영향을 받지 않았다. 눈에 보이는 입자를 단리하여 푸리에 변환 적외선(FTIR) 분석을 통해 특성화한 결과, FFA인 것으로 밝혀졌다. 1 mg/ml 제형은 24개월의 연구 기간 내내 눈에 보이는 입자 형성이 없었고, (방법 정밀도를 넘어서는) PS20 분해를 보이지 않았다. 눈에 보이지 않는 입자 수는 지속적으로 낮았다. 4가지 다른 원료 의약품(DS) 배치들에서 파생된 9가지 완제 의약품(DP) 배치들에 관한 장기 안정성 데이터는 눈에 보이는 입자가 없음을 확인시켜 주었다. 도 13은 예시 DP 배치들의 장기 안정성 데이터를 시각화한 것이다.

[0947] **실시예 7: 실제 사용시 물리화학적 안정성 연구**

[0948] 글로피타맙 완제 의약품은 IV 주입용 용액을 위한 멸균 액상 농축액으로 제공된다. 완제 의약품은 20 mM L-히스티딘 / L-히스티딘 염산염 완충액 중 1 mg/ml 글로피타맙, 240 mM의 수크로스, 10 mM L-메티오닌, 0.5 mg/ml 폴리소르베이트 20, pH 5.5로 구성된다. 글로피타맙은 방부제가 없는 완제 의약품이며 2.5 ml와 10 ml 단일 용량의 유리 바이알에 담겨 제공된다. 글로피타맙은 0.9% 또는 0.45% 염화나트륨으로 희석한 후 IV 백 주입을 통한 IV 투여를 목적으로 한다. 스텝업 투약 일정을 기반으로 제안된 등록 용량과 일정은 2.5/10/30 mg이다. IV 백에서 용량은 0.05 mg/ml 내지 0.6 mg/ml의 용량 용액 농도로 가능하다. 브래케팅 접근 방식에서, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml 및 0.6 mg/ml 용량 용액이 전체 용량 범위를 포괄하는 적합성을 위해 테스트되었다(표 9).

[0949] 권장되는 사용 조건에서 주입용 용액의 물리화학적 안정성을 확인하기 위해 안정성 및 적합성 연구가 수행되었다. 연구 결과, 글로피타맙 주입용 용액은 일반적인 준비 및 투여 과정에서 안정적이며, 2℃-8℃에서 72시간, 주위 실내 조명 조건에서 30℃에서 24시간 동안 보관한 후 25℃에서 주입해도 16시간 이상 걸리지 않는 것으로 나타났다. 주입용 용액이 안정적이라고 입증된 공칭 단백질 농도 범위는 0.05 내지 0.6 mg/ml이다.

[0950] 연구 재료 및 설정:

[0951] 글로피타맙의 물리화학적 안정성은 상업적 환경에서 사용되는 취급 절차를 모방하여 0.9% 염화나트륨 용액과 0.45% 염화나트륨 용액이 들어 있는 100 ml 또는 250 ml IV 백에 희석시킨 후 평가했다. 각 희석제에 대해, 글로피타맙의 의약품 품질은 약 0.05 mg/ml(저용량, 0.9% 염화나트륨에서만 테스트), 0.1 mg/ml(저용량) 및 0.6 mg/ml(고용량)의 희석 농도에서 평가되었으며 이는 표 9에 설명된 상기 의약품의 예상 농도 범위를 포함한다.

[0952] 0.9% 염화나트륨의 경우, 폴리염화비닐(PVC) 또는 폴리올레핀-폴리에틸렌-폴리프로필렌(PO-PE-PP)으로 만들어진 완제 의약품 접촉 표면을 갖는 2가지 서로 다른 유형의 백을 테스트했다. PVC로 된 완제 의약품 접촉 표면을 갖는 0.45% 염화나트륨 백을 대상으로 테스트했다. 이 안정성 평가를 위해 각 희석제에 대해 3개의 의약품 배치를 매트릭스 방식으로 설정했다. 완제 의약품 배치는 2℃-8℃에서 20개월 동안 또는 7개월 동안 보관되었다.

[0953] **표 9: 시뮬레이션된 사용 중 연구 설정(PVC 또는 PO-PE-PP IV 백에 0.9% 염화나트륨 용액 및 PVC IV 백에 0.45% 염화나트륨 용액)**

[0954]

	용량	희석 후 백 내 공칭 단백질 농도	백으로부터 제거된 0.9% NaCl/0.45% NaCl	백에 주입된 완제 의약품	체류 시간	주입 부피	주입 속도
저 용량	2.5 mg	0.05 mg/ml	12.5 ml*	12.5 ml	2°C-8°C: 72 h 30°C: 24 h	250 ml	0.3 mg/h 6 ml/h
저 용량	2.5 mg	0.1 mg/ml	10 ml	10 ml	2°C-8°C: 72 h 30°C: 24 h	100 ml	0.3 mg/h 3 ml/h
고 용량	30 mg	0.6 mg/ml	60 ml	60 ml	2°C-8°C: 72 h 30°C: 24 h	100 ml	0.72 mg/h 1.2 ml/h

[0955] * 0.9% NaCl에서만 테스트됨

[0956] 희석된 글로피타맙 용액을 다음 단계를 거치게 하여 투약 용액의 주입을 시뮬레이션하였다:

[0957] 1. 폴리설폰 또는 폴리에테르설폰(PES)으로 만든 0.2㎛ 인라인 필터가 있거나 없는, PVC, 폴리에틸렌

(PE), 폴리부타디엔(PBD), 폴리우레탄(PUR), 실리콘, 및 아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌(ABS)으로 된 의약품 접촉 표면을 갖는 주입 세트.

[0958] 2. 폴리카보네이트(PC)로 만든 3방향 스톱콕 주입 보조장치.

[0959] 3. 폴리에테르우레탄(PEU) 또는 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE)으로 만든 카테터

[0960] 시뮬레이션 주입은 의도했던 주입 시간인 4 내지 8시간보다 긴 16시간 동안 수행되었으며, 이는 주입 세트 및 보조기구의 구성 재료와 장시간 접촉하는 동안 투약 용액의 상용성을 보장하기 위한 것이다.

[0961] 각 IV 백으로부터 희석 후 그리고 누적 체류 시간 후, 시뮬레이션 주입이 끝날 때마다 분석을 위해 샘플을 수집했다.

[0962] 샘플은 순도를 나타내는 SE-HPLC, IE-HPLC 및 CE-SDS, UV에 의한 단백질 함량, 빛을 가림에 의해 눈에 보이지 않는 입자, 색상, 투명도/유광, pH, 및 생물학적 검정에 의한 역가를 비롯한 적절한 안정성 표시 방법을 사용하여 테스트되었다. CE-SDS를 이용한 LMW는 고용량(0.6 mg/ml)에 대해서만 측정되었는데, 이는 샘플 농도가 ≤0.1 mg/ml일 때 신호 강도가 너무 낮아 데이터를 의미 있게 해석할 수 없었기 때문이다. 그러나 제시된 역가 데이터를 통해 의약품 품질이 보장되었다.

[0963] 결과:

[0964] 실제 사용 연구에서는 글로피타맙을 0.9% 또는 0.45% 염화나트륨 용액으로 희석하고 2℃-8℃에서 72시간 동안 보류시키고, 주위 실내 조명 조건에서 30℃에서 추가로 24시간 동안 보류시킨 후 25℃에서 모의 주입한 결과 물리화학적으로 안정적이며 16시간 이상 걸리지 않는 것으로 나타났다. 0.5 mg/ml 용량 용액의 경우 인라인 필터를 사용하면 안 된다.

[0965] 이러한 호환성 연구에 사용된 완제 의약품 배치들은 이전에 권장 보관 온도(2℃-8℃)에서 7-20개월 동안 보관되었으며, 이는 완제 의약품이 실제 사용시 취급 및 투여 도중 안정성에 영향을 미치지 않음을 보여준다.

[0966] **실시예 8: 미생물학적 안정성**

[0967] 완제 의약품은 투여 전에 무균 기술을 사용하여 희석해야 한다. IV 투여용 글로피타맙 용액은 0.9% 염화나트륨 또는 0.45% 염화나트륨이 들어 있는 주입백에 완제 의약품을 희석하여 준비된다. 준비된 주입 용액은 즉시 사용해야 한다. 이 완제 의약품에는 항균 방부제가 함유되어 있지 않으므로 실제 사용 중 취급하는 동안 적절한 무균 조건을 유지하여 용액의 무균성을 보장해야 한다.

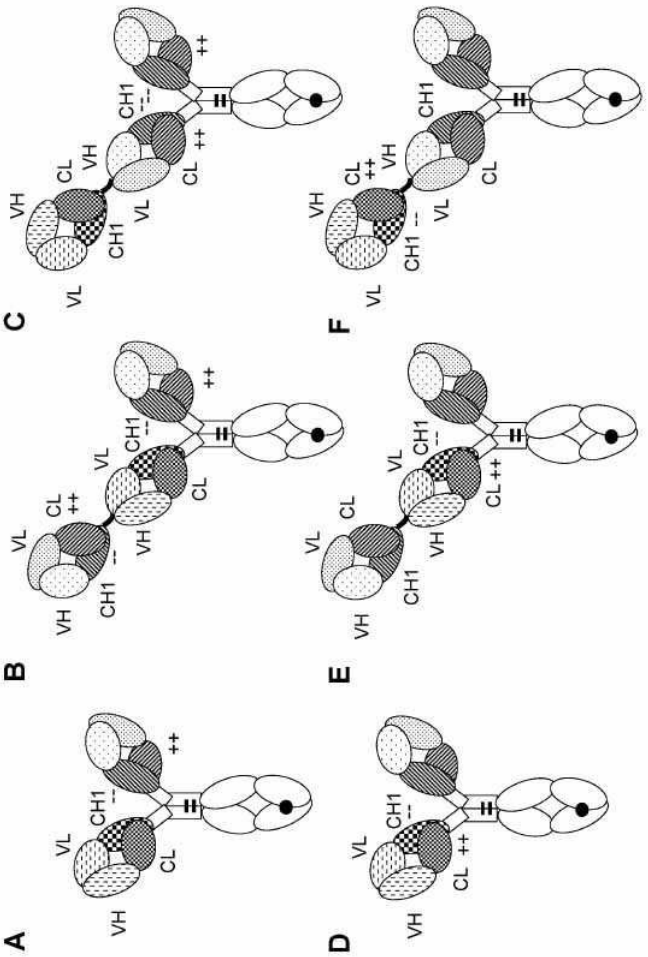
[0968] 우발적 오염이 발생할 경우, 용액이 미생물 증식을 촉진할 수 있는 경향을 평가하기 위해 미생물학적 시험 연구가 수행되었다. 7가지 다른 테스트 미생물(USP <51>에 나열됨)의 증식을 2℃-8℃에서 최대 96시간 동안, 20℃-25℃에서 최대 48시간 동안 평가했다. 결과는 초기 값보다 0.5 $\log_{10}$ 단위 이하의 차이가 측정된 경우 “성장 없음”의 허용 기준을 충족했다.

[0969] **기타 실시형태**

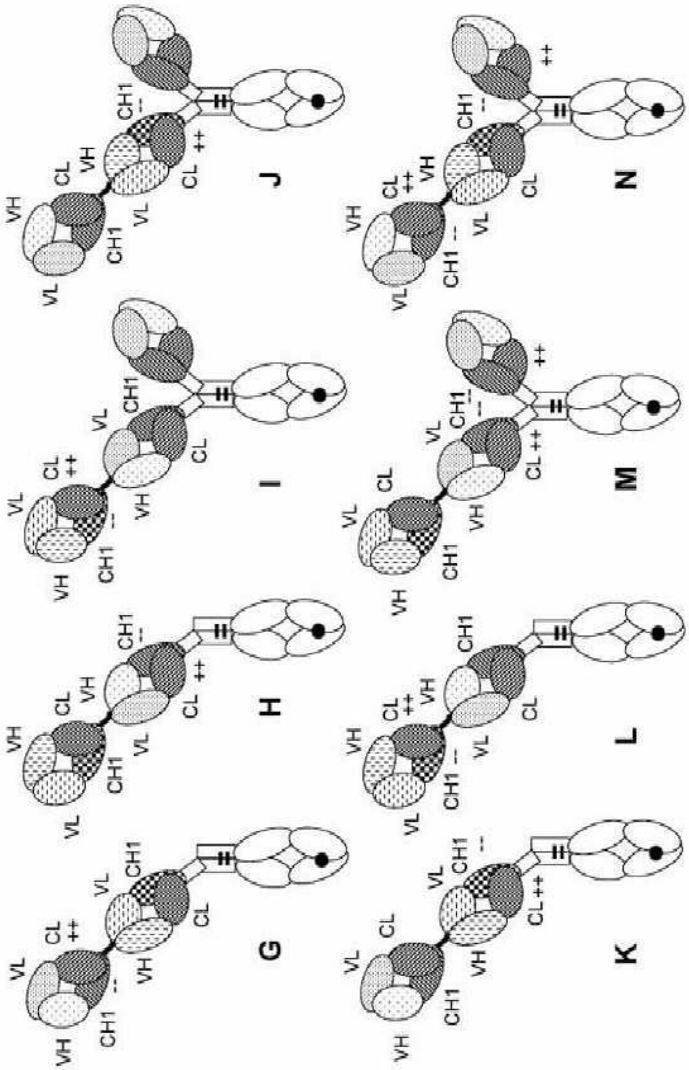
[0970] 전술한 발명을 이해를 명확히 하기 위해 예시 및 실시예를 예로 들어 상세히 설명하였으나, 이러한 예시 및 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 내용은 그 전문이 참조문헌으로 포함된다.

도면

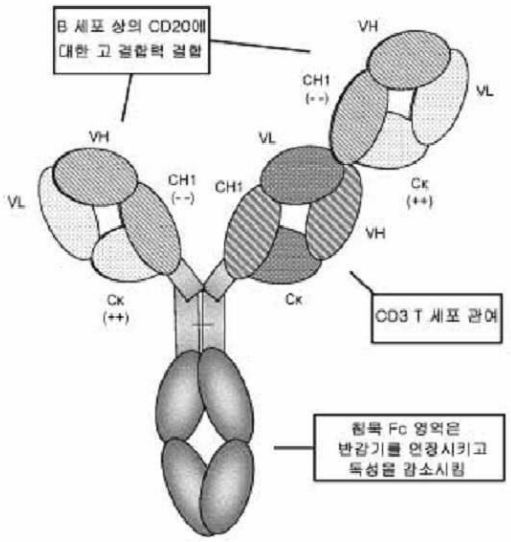
도면1aa



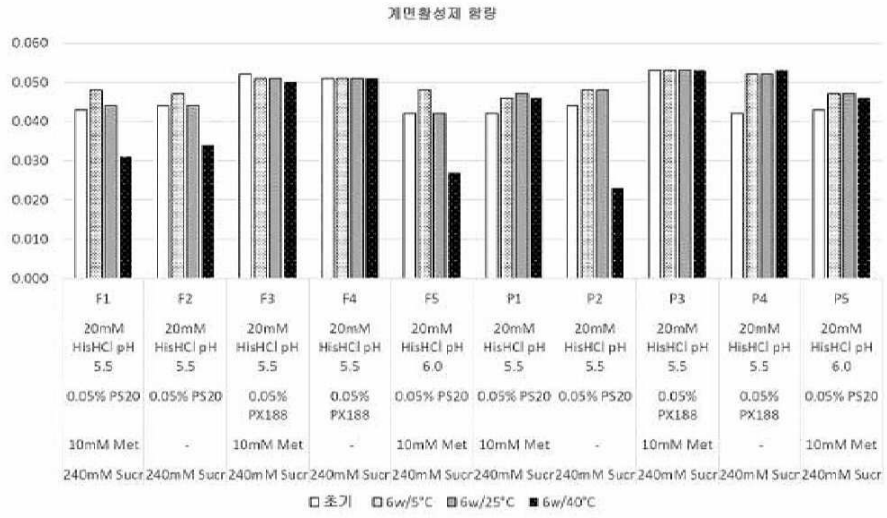
도면1bb



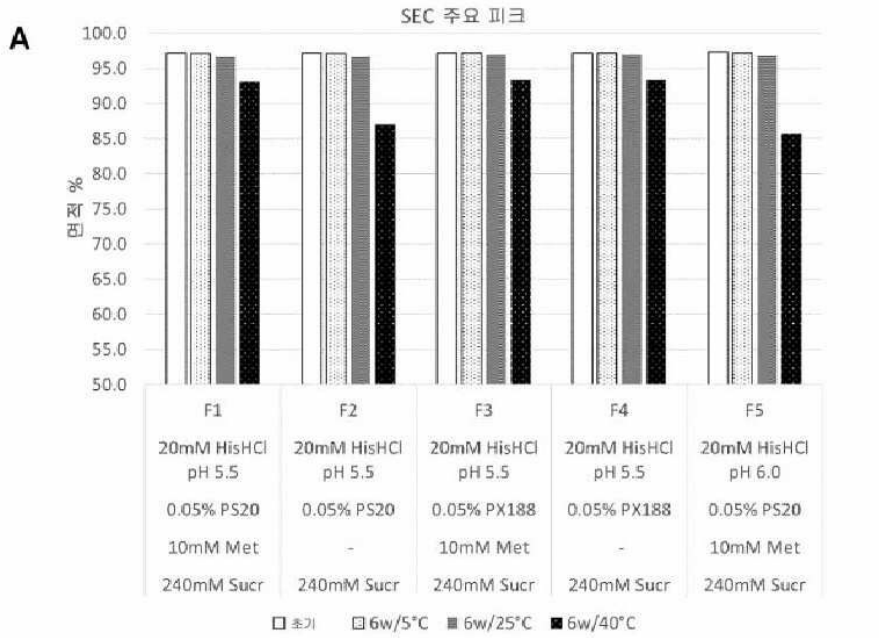
도면2


B 세포 상의 CD20에
대한 고 결합력 결합
VH
CH1
(- -)
VL
VH
VL
CH1
(- -)
CH1
Cκ
(++)
VL
VH
Cκ
(++)
Cκ
CD3 T 세포 관여
힌룩 Fc 영역은
반감기를 연장시키고
독성을 감소시킴

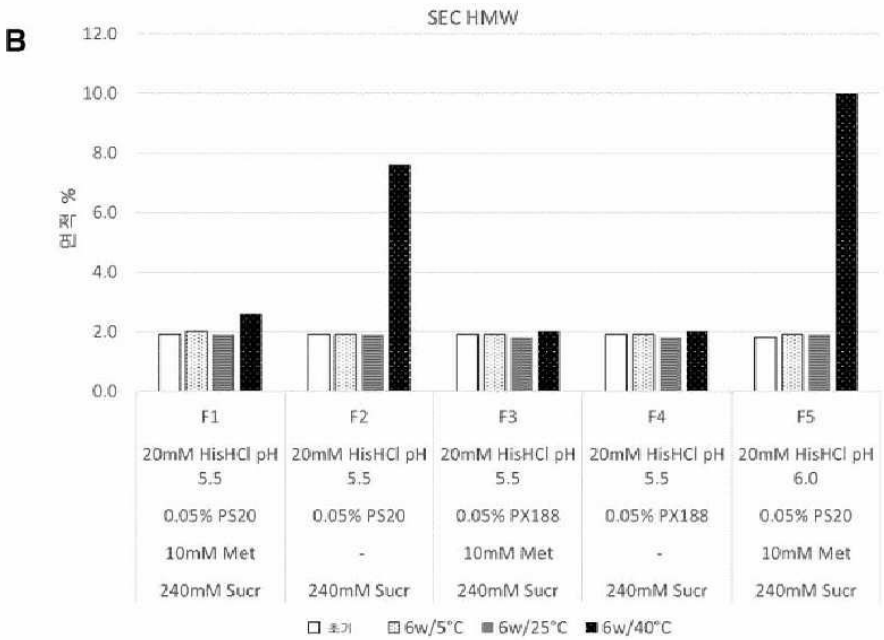
도면3


계면활성제 함량
0.060
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
P1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
P2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
P3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
P4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
P5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
초기
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C

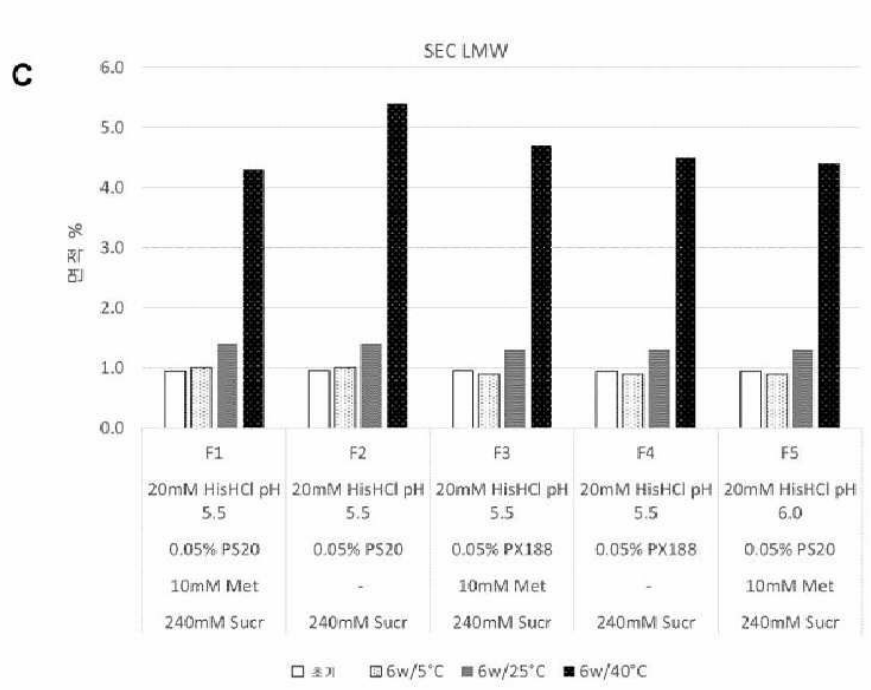
도면4a


A
SEC 주요 피크
면적 %
100.0
95.0
90.0
85.0
80.0
75.0
70.0
65.0
60.0
55.0
50.0
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
초기
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C

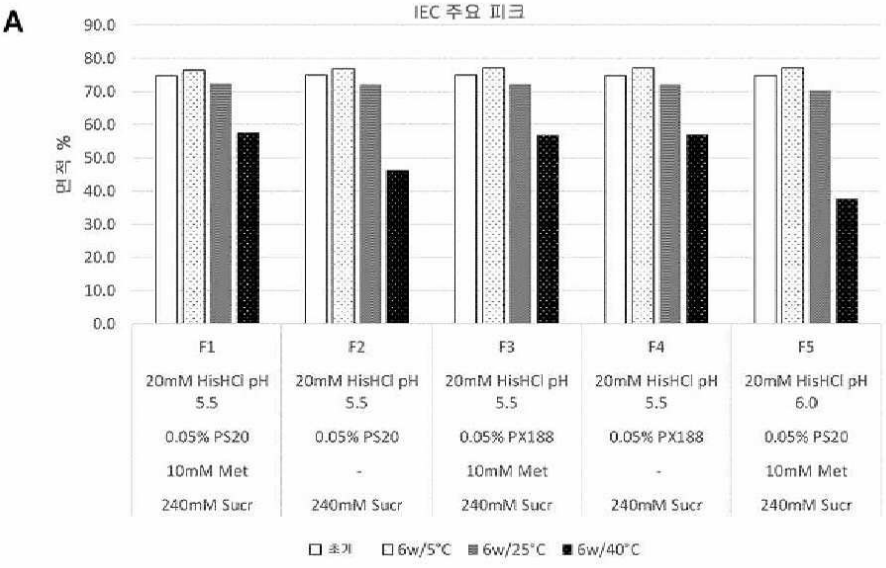
도면4b


B
SEC HMW
면적 %
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
초기
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C

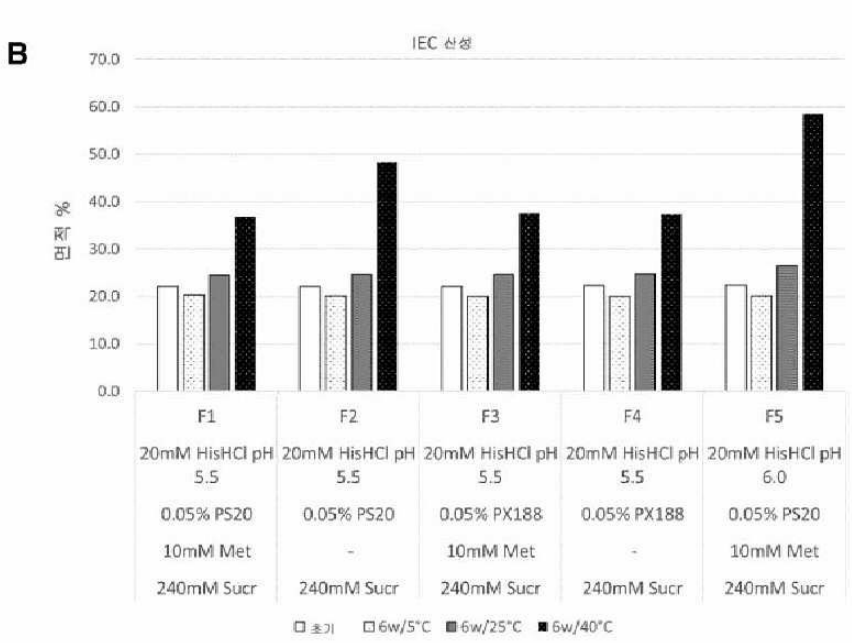
도면4c


C
SEC LMW
면적 %
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
초기
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C

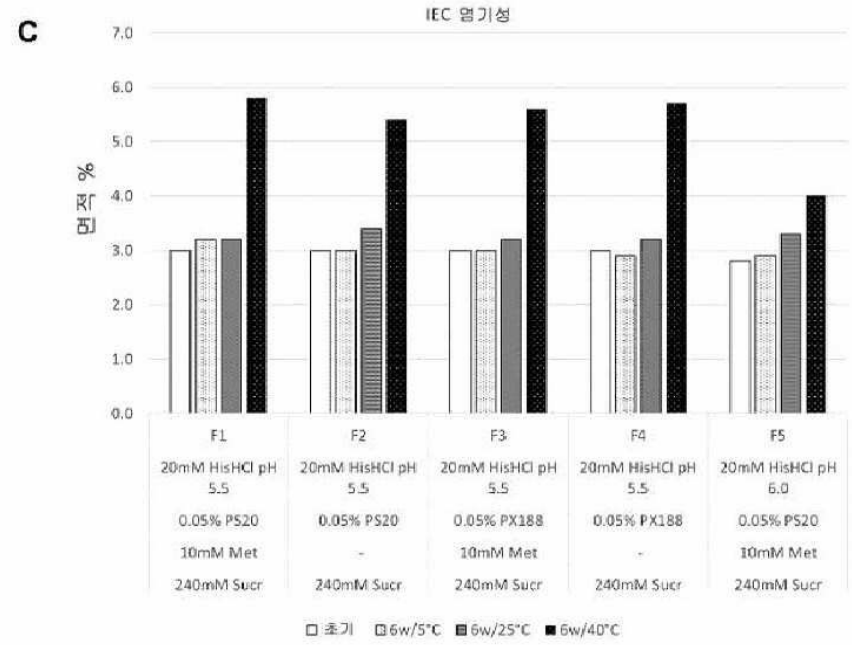
도면5a


A
IEC 주요 피크
면적 %
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
초기
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C

도면5b


B
IEC 산성
면적 %
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
초기
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C

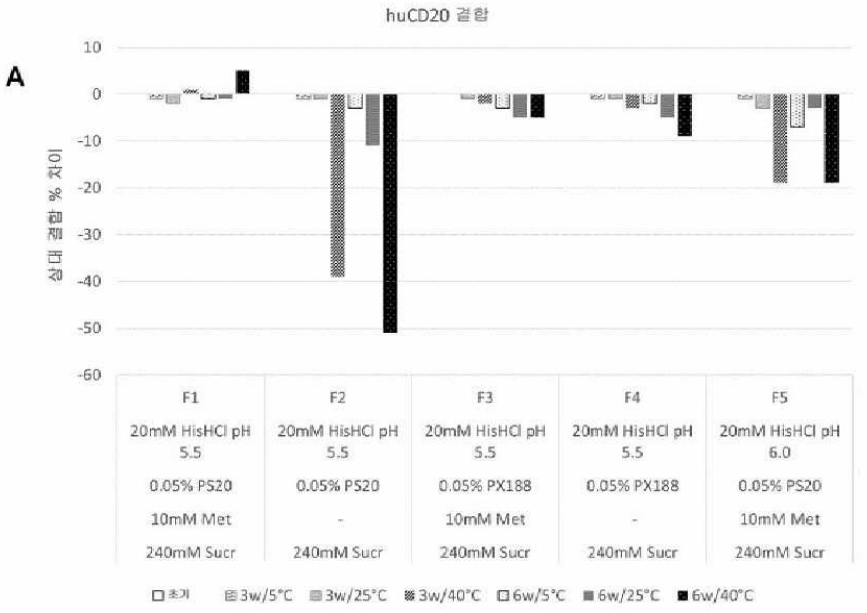
도면5c


C
IEC 염기성
면적 %
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
초기
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C

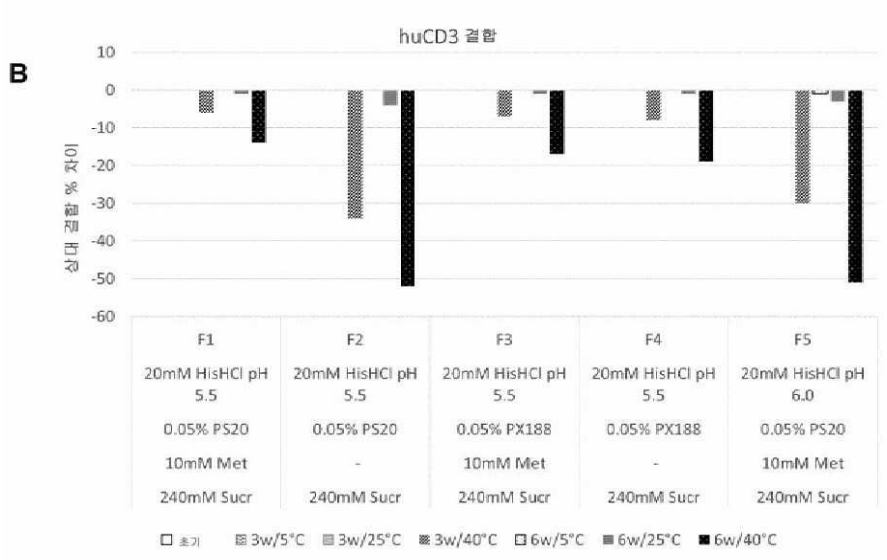
도면6

보관 조건	보관 시간 (주)	탁도 (FTU)	색상	pH	삼투압 (Osmol/kg)	눈에 보이는 입자 제이데나이더)	눈에 보이는 입자 (슬티마)	눈에 보이는 입자 (EP Box)	눈에 보이지 않는 입자 (>10μm/mL)	눈에 보이지 않는 입자 (>25μm/mL)	단백질 농도 (mg/mL)	SEC (%) 주요	SEC (%) HMW	SEC (%) LMW	IEC (%) 주요	IEC (%) 산성	IEC (%) 염기성
초기	-	2.7	B9	5.5	0.316	1	1	1	0	0	5.0	97.2	1.9	0.9	74.8	22.1	3.0
2-8°C	3	2.6	B9	5.4	0.317	0	0	0	0	0	5.1	97.0	2.0	1.0	76.6	20.2	3.2
	6	2.5	B9	5.5	0.320	0	0	0	0	0	5.0	97.1	2	1.0	76.5	20.39	3.2
	13	2.3	B9	5.5	0.318	0	0	0	0	0	5.1	97.2	1.9	0.9	74.8	22.7	2.5
	30	2.4	B9	5.5	0.319	0	0	0	0	0	5.1	96.3	1.9	1.8	74.1	23.4	2.5
	58	2.8	B9	5.5	0.318	>10	>7	>7	0	0	5.0	96.9	1.9	1.2	74.2	23.3	2.5
	84	3.2	B9	5.5	해당없음	>10/>10	5/>10	>7/>7	0	0	5.0	96.7	1.8	1.5	73.8	23.6	2.6
25°C	3	2.5	B9	5.5	0.317	0	0	0	0	0	5.0	96.8	2.0	1.2	76.6	20.1	3.3
	6	2.6	B9	5.5	0.321	0	0	0	0	0	5.0	96.7	1.9	1.4	72.3	24.50	3.2
	13	2.4	B9	5.5	0.319	5	1	0	0	0	5.1	96.6	1.8	1.6	72.1	24.9	3.0
	30	5.2	B8	5.4	0.320	>10	>7	>7	0	0	5.1	95.7	2	2.3	66.8	30.4	3.6
	84	11.0	B7	5.4	n/a	>10/>10	>10/>10	>7/>7	10	1	5.0	90.2	3.6	6.1	47.6	48.1	4.3
40°C	3	2.5	B9	5.5	0.323	0	0	0	0	0	5.0	95.0	2.0	3.1	64.5	30.7	4.8
	6	4.1	B8	5.4	0.326	0	0	0	6	0	5.0	93.1	2.6	4.3	57.6	36.70	5.8
	13	8.8	B7	5.5	0.334	>10	0	0	5	0	5.1	84.0	8.8	7.2	41.7	52.6	5.6
진탕	2-8°C	2.5	B9	해당없음	해당없음	0	0	0	20	0	5.1	97.3	1.8	0.9	68.5	28.3	3.2
진탕	25°C	2.5	B9	해당없음	해당없음	0	0	0	28	0	5.1	97.2	1.8	1.0	69.6	27.2	3.2
동결 /해동	5 주기	2.8	B9	해당없음	해당없음	0	0	0	0	0	5.1	97.2	1.8	1.0	69.3	27.5	3.1

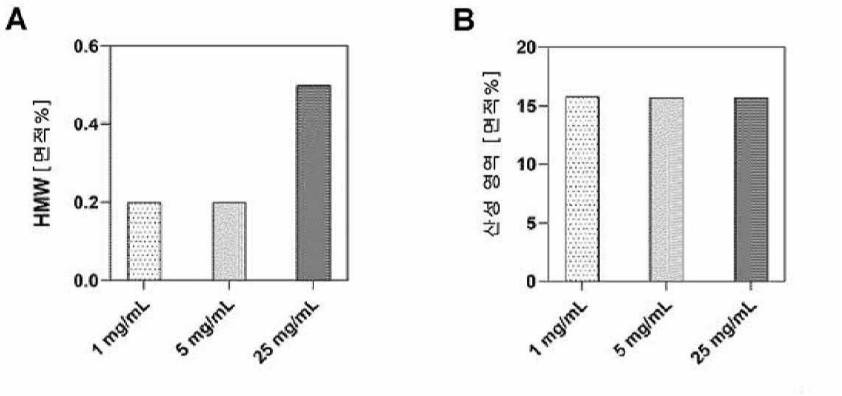
도면7a



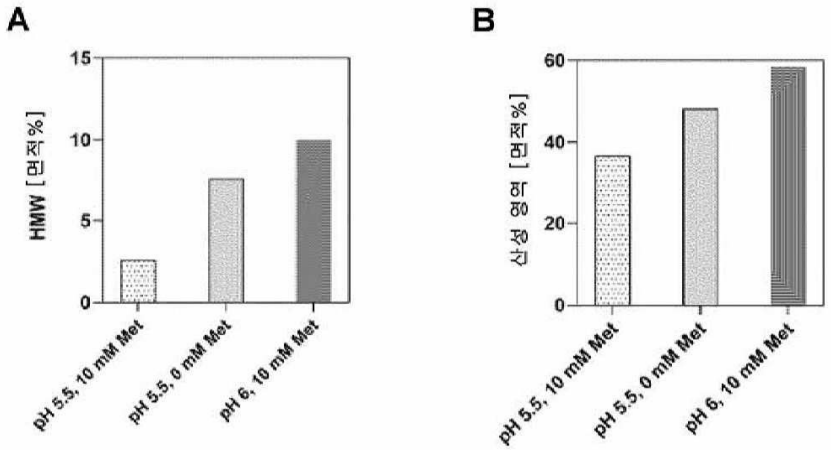
도면7b


B
huCD3 결합
상대 결합 % 차이
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
F1
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
F2
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PS20
-
240mM Sucr
F3
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
10mM Met
240mM Sucr
F4
20mM HisHCl pH 5.5
0.05% PX188
-
240mM Sucr
F5
20mM HisHCl pH 6.0
0.05% PS20
10mM Met
240mM Sucr
초기
3w/5°C
3w/25°C
3w/40°C
6w/5°C
6w/25°C
6w/40°C

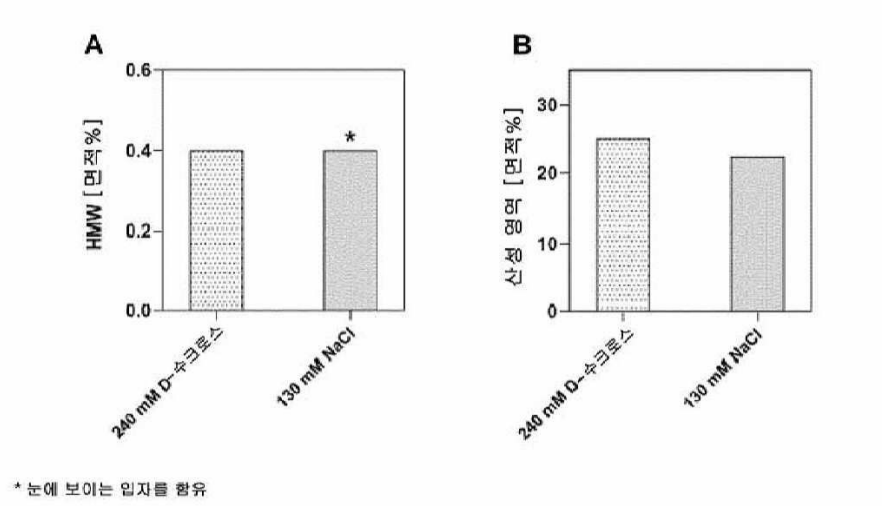
도면8


A
HMW [면적%]
0.6
0.4
0.2
0.0
1 mg/mL
5 mg/mL
25 mg/mL
B
산성 영역 [면적%]
20
15
10
5
0
1 mg/mL
5 mg/mL
25 mg/mL

도면9

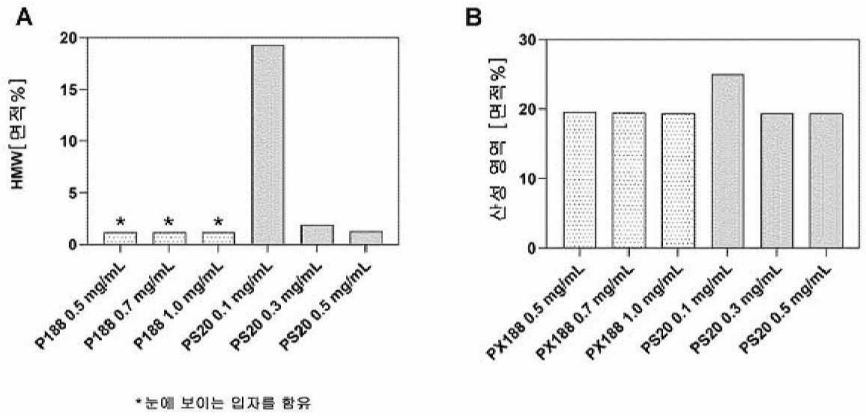

A
HMW [면적%]
15
10
5
0
pH 5.5, 10 mM Met
pH 5.5, 0 mM Met
pH 6, 10 mM Met
B
산성 영역 [면적%]
60
40
20
0
pH 5.5, 10 mM Met
pH 5.5, 0 mM Met
pH 6, 10 mM Met

도면10



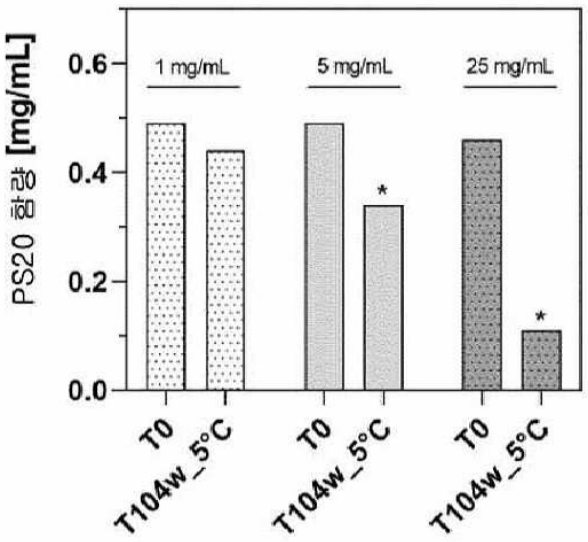
* 눈에 보이는 입자를 함유

도면11



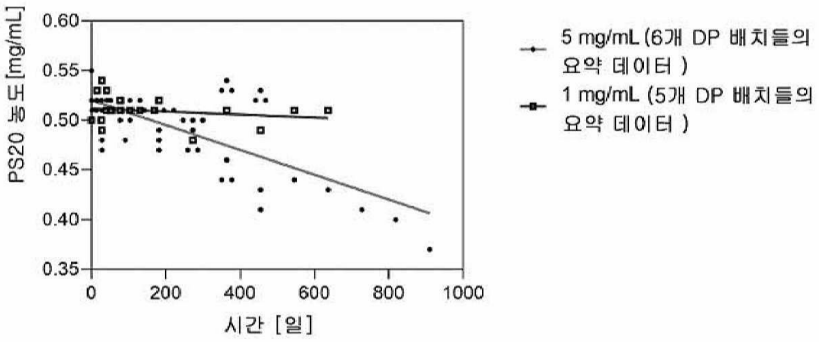
* 눈에 보이는 입자를 함유

도면12



*눈에 보이는 입자를 함유

도면13



서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.