



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0100977
(43) 공개일자 2013년09월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7003284
(22) 출원일자(국제) 2011년07월13일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년02월07일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/061983
(87) 국제공개번호 WO 2012/007516
국제공개일자 2012년01월19일
- (30) 우선권주장
1011771.1 2010년07월13일 영국(GB)
- (71) 출원인
바이오인벤트 인터내셔널 에이비
스웨덴 에스-223 70 룬드 솔베가탄 41
- (72) 발명자
헨슨, 마르쿠스
스웨덴, 에슬뢰브 에스-24193, 그리비가드
프렌데우스, 비욘
스웨덴, 란스크로나 에스-26161, 크리드그란덴 3
- (74) 대리인
특허법인씨엔에스

전체 청구항 수 : 총 25 항

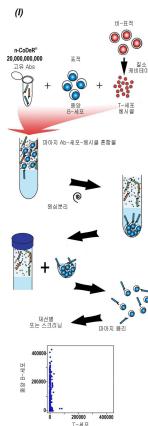
(54) 발명의 명칭 재발된 암을 가진 환자의 치료에 사용되는 ICAM-1에 대한 항체의 용도

(57) 요약

암에 대해 이전에 치료받은 적이 있으며, 상기 치료에 반응하지 않거나 상기 치료에 이전에는 반응하였고 후속적으로 재발된 환자에서, 암 치료에 사용하는,

ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트가 제공된다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 또는

ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트의 변이체, 융합체 또는 유도체, 또는 상기 변이체의 융합체 또는 이의 유도체를,

암에 대해 이전에 치료받은 적이 있으며, 상기 치료에 반응하지 않거나 상기 치료에 이전에는 반응하였고 후속적으로 재발된 환자에서, 암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도.

청구항 2

암에 대해 이전에 치료받은 적이 있으며, 상기 치료에 반응하지 않거나 상기 치료에 이전에는 반응하였고 후속적으로 재발된 환자에서, 암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는,

ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 또는

ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트의 변이체, 융합체 또는 유도체, 또는 상기 변이체의 융합체 또는 이의 유도체.

청구항 3

암에 대해 이전에 치료받은 적이 있으며, 상기 치료에 반응하지 않거나 상기 치료에 이전에는 반응하였고 후속적으로 재발된 환자에서 암 치료 방법으로서,

ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 또는

ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트의 변이체, 융합체 또는 유도체, 또는 상기 변이체의 융합체 또는 이의 유도체의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 적이 있는 암과 동일한 암인, 암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도.

청구항 5

제1항에 있어서,

치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 적이 있는 암과 다른 암인, 암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도.

청구항 6

제2항에 있어서,

치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 적이 있는 암과 동일한 암인,

ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체.

청구항 7

제2항에 있어서,
치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 적이 있는 암과 다른 암인,
ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체.

청구항 8

제3항에 있어서,
치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 적이 있는 암과 동일한 암인, 암 치료 방법.

청구항 9

제3항에 있어서,
치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 적이 있는 암과 다른 암인, 암 치료 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,
치료할 암은 림프세포 증식성 질환인,
암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
치료할 암은 다발성 골수종인,
암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,
ICAM-1은 형질 세포의 표면에 편재된,
암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체, 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 변이체, 융합체 또는 유도체의 유효량은 약 0.1 μ g 내지 5g의 상기 항체, 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 변이체, 융합체 또는 유도체인,

암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체는 무손상 항체(intact antibody)를 포함하거나 이로 구성되는,

암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체는 Fv 프래그먼트; Fab 프래그먼트; Fab-류 프래그먼트로 구성되는 그룹으로부터 선택된 항원-바인딩 프래그먼트를 포함하거나 이로 구성되는,

암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

Fv 프래그먼트는 단일쇄 Fv 프래그먼트 또는 이황화-결합 Fv 프래그먼트인,

암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 Fab-류 프래그먼트는 Fab' 프래그먼트 또는 F(ab)₂ 프래그먼트인,

암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체는 재조합 항체인,

암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체는 모노클로날 항체인,

암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트는 인간 항체 또는 인간화(humanised) 항체인,

암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트는 하기 아미노산 서열:

FSNAWMSWVRQAPG 및/또는

AFIWIYDGSNKYYADSVKGR 및/또는

ARYSGWYFDY 및/또는

CTGSSSNIGAGYDVH 및/또는

DNNNRPS 및/또는

CQSYDSSLSAWL

을 포함하는,

암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트는 도 15에 나타난 아미노산 서열 중 하나 이상을 포함하는,

암 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 암 치료 방법.

청구항 23

상세한 설명을 참조로 실질적으로 본 명세서에 기재된 바와 같은 전-다발성 골수종 질환 상태를 치료하는데 사용하는, 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트.

청구항 24

상세한 설명을 참조로 실질적으로 본 명세서에 기재된 바와 같은, 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트의 용도.

청구항 25

상세한 설명을 참조로 실질적으로 본 명세서에 기재된 바와 같은, 개체에서 형질 세포 질환을 치료하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 ICAM-1 항체, 및 다발성 골수종(multiple myeloma)과 같은 암의 치료에 사용되는 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 다발성 골수종(MM 또는 골수종이라고도 칭함)은 B 세포의 악성 종양이며, 전체 혈액 악성 종양의 10-20%를 차지한다. 현재, 이 질병은 65-70년생의 중위 연령(median age)에서 진단되는 경우에는 치유불가능한 질병이며, 40세 미만에서는 매우 소수의 환자들이 진단된다. 다발성 골수종은 전세계적으로 10만 명당 4명이 발생되며, 미국에서 2번째로 흔한 혈액 악성 종양이다. 미국에서, 2008년도에 19,920 가지의 새로운 다발성 골수종 사례 및 10,000명 이상의 사망이 다발성 골수종과 관련된 것으로 예측된다(American Cancer Society, 2008). 상기 질병은 남성에게 약간 더 많이 발병되며, 아프리카계 미국인에서 더 빈번하게 발견되며, 아시아 인구에서 덜 발병된다(Kyle & Rajkumar, Blood. 2008 Mar 15;111(6):2962-72. Review).

[0003] 다발성 골수종의 진단은 현재의 이용가능한 치료로 3-4년의 평균 생존기간을 가지며, 심각한 형태의 질병을 가진 경우에 최적의 치료에도 불구하고 단지 2년의 평균 생존기간을 갖는, 위중한 예후를 수반한다(Kyle & Rajkumar, Blood. 2008 Mar 15;111(6):2962-72. Review).

[0004] 다발성 골수종의 전형적인 임상상(clinical picture)은 병리학적 골절, 특히 흉곽 또는 척추에서의 병리학적 골절에 기인한 심한 통증을 가진 환자이다((Kyle & Rajkumar, 2004, N Engl J Med. 2004 Oct 28; 351(18): 1860-73. Review). 다른 일반적인 특징은 신부전, 고칼슘혈증, 빈혈증 및 혈소판 감소증을 갖는 골수 기능장애, 및 정맥 혈전증 및 폐색전과 같은 감염 및 혈전 색전증 합병증의 위험 증가이다. 장기 부전은 종종 면역글로블린 경쇄의 근모상 집합체(fibrillar aggregates)의 병리학적 침적, 소위 AL-아밀로이드증에 의해 야기된다. 장기 부전이 있는 경우에, 이는 전형적으로 심장 및 신장을 포함하며, 각각, 심각한 심부정맥 및/또는 심부전, 및 신장 기능이상 및 신부전을 일으킨다.

[0005] 다발성 골수종은 미충족 의료(unmet medical need)로 특징지어지며, 현재 다발성 골수종의 치료를 위한 구입가능한 약물은 비치유성이며, 현재의 독성 및 약물 내성의 발달과 관련이 있다. 다발성 골수종 형질 세포는 전형적으로 CD20을 발현하지 않거나, 낮고 불균일한 CD20 발현을 나타내며, 이는 CD20 표적 치료가 이러한 질병에서 효과적이지 못하게 한다(Kapo et al. Haematol, 2008, 141:135-248).

[0006] 다발성 골수종을 가진 환자를 치료하기 위한 광범위한 방법이 개발되었으며, 이에는 멜팔란(melfalan) (및 시클로포스파미드와 같은 다른 알킬화 물질); 다른 화학치료제(아드리아마이신, 빈크리스틴 및 시스플라틴과 같은); 고 스테로이드 제형; 인터페론; 비스포스포네이트(파미드로네이트 또는 졸드로네이트와 같은)의 사용을 포함한다. 또한, 자가조직 및 동종 줄기 세포 이식이 사용된다.

- [0007] 다발성 골수종의 치료 또는 예방을 위한 새로운 치료법의 개발에 있어서 최근의 진전에도 불구하고, 이러한 약물이 환자의 생존 및 생활의 질에 미치는 실제 효과는 여전히 제한적이다(Kumar et al., Blood, 2008, 111(5):2516-20). 또한, 현재의 치료는 상당한 비율의 환자에서 심각한 부작용과 관련이 있다. 예를 들어, 화학치료는 감염, 메스꺼움, 탈모 및 기관 장애에 대한 민감도를 증가시키며; 스테로이드 치료는 체중 증가, 당뇨, 감염에 대한 민감도 증가; 골다공증 및 정신적 외란을 일으키며; 인터페론 치료는 피로, 열, 근육 통증 및 우울증을 일으킬 수 있으며; 그리고 비스포스포네이트 치료는 드물지만 가끔 신장 손상 및 골 괴사를 일으킨다. 줄기 세포 이식을 이행하는 절차는 현저한 비율의 재발 및 이식-관련 이병률 및 사망률을 수반한다. 또한, 탈리도마이드, 보르테조미드 및 레날리도마이드를 포함하는 새로운 다발성 골수종 약물은 다수의 환자에서 이들의 사용을 제한하는 부작용을 갖는다.
- [0008] 최근에, 다발성 골수종의 발병 및 분자 메커니즘의 이해에 있어 실질적인 진전이 이루어졌다. 유전학적 연구 결과, 종종 이러한 질병과 연관된 전조 관련성을 수반하는, 다양한 배열의 여러 가지 염색체의 변화가 일어난다는 것이 밝혀졌다. 간략히, 이러한 염색체 전좌는 종종 면역글로블린(Ig) H 로커스(14q32.3)를 포함하며, Ig 인헨서에 의해 촉진된 세그먼트에 다양한 형질전환 유전자를 병치하며, 이는 불규칙적인 발현을 일으키고, 잠재적으로 악성 종양 형질전환을 일으킨다(Hideshima et al. Nat Rev Cancer. 2007. 7(8): 585-598). 다발성 골수종에서 보르테조미드를 이용한 프로테아좀 저해의 치료 효과는 시험관 내에서(*in vitro*) 골수 세포에서 처음으로 입증되었으며, 이는 아마도 직접적인 세포독성의 결과이며, 부착 분자 및 다양한 성장, 생존 및 맥관 형성 인자의 감소의 결과이다(Kyle & Rajikumar N Engl J Med. 2004 Oct 28;351(18):1860-73. Review). 전사 인자 NF κ B는 이의 정상 조절 단백질 I κ B의 프로테아좀 분해에 기인하여 다발성 골수종에서 증가된 활성을 가지며, 보르테조미드는 프로테아좀 활성을 저해함으로써 NF κ B 항상성을 회복시킨다.
- [0009] 뼈 파괴세포(bone osteoclasts), 내피세포, 골수 줄기 세포 뿐만 아니라 세포의 기질 단백질로 구성된 골수 미세환경은 다발성 골수종 발병에 결정적인 역할을 하며(Hideshima et al., Nat Rev Cancer. 2007. 7(8): 585-598), 악성 형질 세포의 성장, 생존 및 약물 내성을 조정하는 인자들을 제공한다. 예를 들어, ICAM-1과 같이, 다발성 골수종 세포에 의해 발현되는 다양한 부착 분자들은 이러한 상호작용에 중요하다.
- [0010] 세포간 부착 분자-1(ICAM-1)은 다발성 골수종(Huang, et al. Hybridoma. 1993. 12(6): 661-675; Huang et al. Cancer Res. 1995. 55(3): 610-616; Smallshaw et al. Immunolther 1997. 2004. 27(6): 419-424; Schmidmaier, Int J Biol Markers. 2006. 21(4): 218-222), 흑색종(Wang et al. Int J Cancer. 2006. 118(4): 932-941; Johnson et al., Immunobiology. 1988. 178(3): 275-284), 폐암(Grothey et al. Br J Cancer. 1998. 77(5): 801-807), 위암(Maruo et al. Int J Cancer. 2002. 100(4): 486-490), 방광암(Roche et al. Thromb Haemost. 2003. 89(6): 1089-1097), 유방암(Rosette C, et al. Carcinogenesis. 2005. 26(5): 943-950), 전립선암(Aalinkel R et al. Cancer Res 2004. 64(15): 5311-21), 및 림프종(Horst et al. Leukemia. 1991. 5(10): 848-853)을 포함하는 다양한 타입의 인간 악성 종양의 발병시 고 발현되고, 연루된다. 증가된 ICAM-1 발현은 약물-유도 내성의 발달(Schmidmaier et al. Int J Biol Markers. 2006. 21(4): 218-222), 종양 세포 침해성(Miele et al., Exp Cell Res 214 (1), 231 1994) 및 저조한 예후(Dowlati et al., Clin Cancer Res 14 (5), 1407 (2008))과 연관된다.
- [0011] 보다 젊은 환자(즉, 65세 미만)에서 다발성 골수종의 표준 치료는 빈크리스틴-아드리아마이신-텍사메타손을 이용하여 컨디셔닝한 다음, 자기유래 줄기 세포 지지체를 함유한 멜팔란의 고 투여로 이루어진다. 지난 10년 동안, 이러한 치료는 평균 생존 기간을 약 1년 연장시키는 것으로 나타났으나, 소수의 환자에게서만 골수에서 완전한 차도를 보였다(Harousseau JL. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008;2008:306-12). 고-투여량 치료시 따르는 위험 때문에, 노인 환자들은 주로 프리드니손과 함께 저-투여량의 멜팔란으로 치료받았다.
- [0012] 최근에, 다른 치료법들이 재발된 다발성 골수종의 치료용으로 승인되었다. 이러한 새로운 약물은 프로테아좀-

인히비터 보르테조미(Velcade®) 및 "면역조절(immunomodulatory)" 약물, 탈리도마이드 및 레날리도마이드(Revlimid®)를 포함하며, 치료 옵션시 현저한 진전을 이룬다. 이러한 약물을 이용한 재발된 다발성 골수종 환자에 대한 전체 반응률은 보통 약 30%이지만, 일반적으로 그 약물이 간헐적인 텍사메타손과 병용될 경우에 더 높다. 이러한 발견에 기초하여, 텍사메타손 및/또는 화학 치료와 함께 혼합된 새로운 약물들은 유망한 예비적 결과를 갖는(American Society of Hematology, December 6-9, 2008) 다발성 골수종에 대한 제1선의 치료로서 현재 임상 시험 중에 있다(<http://clinicaltrials.gov/ct2/search>).

[0013] 보르테조미, 레날리도마이드 및 탈리도마이드는 재발된 다발성 골수종 환자에서 통상적인 치료에 비해 더 우수한 생존 효과를 나타냄에도 불구하고((Rajkumar *Blood*. 2005. 106(13): 4050-4053; Richardson et al. *Blood*. 2006. 108(10): 3458-3464; Richardson et al. *N Engl J Med*. 2005. 352(24): 2487-2498; Singhal et al. *N Engl J Med*. 1999. 341(21): 1565-1571), 장기 생존 또는 치료의 목적은 아직까지 달성되지 못하였다. 더욱이, 보다 새로운 약물은 또한 예를 들어, 혈전 색전증, 신경병증, 및 면역 및 골수 억제의 위험 증가와 같은 심각한 부작용을 가지며, 상당한 수의 환자들에서 이의 사용이 제한된다.

[0014] 새로운 치료법의 개발에 있어 최근의 발전에도 불구하고, 이러한 약물들이 환자 생존 및 삶의 질에 미치는 실재 효과는 다수의 환자들에게 미미하며, 약물 내성 반응 또는 발달 및 후속적인 재발이 일어나거나, 다발성 골수종과 대항하는 신규의 보다 효과적이고 호평적인 치료법의 개발을 보장하지 못한다. 따라서, 다발성 골수종에 대한 새로운 잠재적인 표적 및 약물이 요구되며, 특히 현존하는 약물에 반응하지 않는 환자들 또는 초기에는 반응하지만 후속적으로 재발되는 환자들에게 사용하기 위한 새로운 잠재적인 표적 및 약물이 요구된다.

[0015] 지난 이십 년에 걸친 표적 면역치료 및 항체-기초 약물의 발달은 암 및 혈액학적 악성 종양과 대항하는 의사의 대항능력(armature)을 현저히 향상시켰다(1). 혈액학적 악성 종양에서, CD20-특이적 마우스 인간 키메라 모노클로날 항체 리툽시맵은 치료 항체의 주요 예를 제공하며, 이는 단일요법(2, 3)으로 사용될 경우 또는 통상적인 화학치료 약물과 함께 혼합될 경우(4-6)에 현저히 향상된 비-호지킨림프종(non-Hodgkin lymphoma) 환자 생존률을 갖는다(7, 8). 그러나, 혈액학적 질병을 가진 상당한 부분의 환자들은 CD20 발현이 결핍되거나 CD20 치료에 대한 선천적 또는 후천적 내성에 기인하여 항-CD20 치료에 부적절한 상태로 남아있다(9). 따라서, 이러한 현재 치유불가능한 암에 대한 활성을 갖는 차세대 항체의 개발은 임상 결과를 향상시키는 것을 상당히 보장한다.

[0016] 본 출원인은 생체내에서(*in vivo*) 여러 가지의 이식된 CD20-발현 및 CD20-음성 인간 B 세포 종양에 대한 기존의 유용한 치료법과 비교하여, 광범위하고, 고 효율적이며 강력한 항-종양 활성을 갖는 B11 에피토프를 표적하는 새로운 인간 ICAM-1 항체를 제공한다. ICAM-1 B11 항체는, 종양 B 세포 상향조절 표면 리셉터 및 이의 경쟁적 세포자살 유도 특성에 기초하여 다양한 바이오패닝 및 프로그램 세포사(programed cell death)(PCD) 스크리닝에 의해 나이브 항체(immune naive antibody) 라이브리리 n-CoDeR®(BioInvent)로부터 분리하였다. 본 출원인이 알고 있는 바로는, 처음으로 기능성 스크리닝 방법이 성공적으로 적용되고, 한편으로는 이전에 잘-특정화된 리셉터(ICAM-1)의 새로운 기능을 확인한 것이며, 그리고 이와 동시에 이러한 현저한 치료학적 잠재력을 갖는 동일한 표적에 대한 항체를 생성한 것이다. 따라서, 치료학적 항체 발견에 대한 이러한 "기능-우선-접근법(function-first-approach)"은 재조합 표적 단백질 또는 표적 감염 세포에 대한 패닝(panning)을 이용하며, 회수된 항체 풀이 미리 정의된 표적 리셉터(들)에 대한 특이성으로 제한되는 보다 통상적인 접근법에 대하여 중요하면서도 상호 보완적인 전략을 구성한다.

[0017] IgG B11은 다양한 림프종 서브 타입에서 명확하고 빈번한 ICAM-1 발현과 함께 CD20 발현 종양에 대한 리툽시맵과 비교하여 경쟁적인 생체내 항-종양 활성을 갖는다는 것을 발견하였으며, 이는 CD20 발현 림프종의 치료에 적용가능하다는 것을 나타낸다. 리툽시맵 전체는 단독으로 사용되거나 화학치료 약물과 함께 혼합될 경우(8)에 현저히 향상된 비-호지킨림프종(non-Hodgkin lymphoma)(NHL) 환자 생존률을 갖지만, 재발된 혹은 난치성의 CD20+ 여포성 림프종을 가진 상당한 부분의 환자들은 리툽시맵을 이용한 초기 치료에 반응하지 않으며(2), 이전의 리툽시맵에 반응하는 환자들의 반 이상이 후천적인 내성을 가지며 재치료시 더 이상 효과가 나타나지 않는다(63). 따라서, CD20-발현 종양에 대한 IgG B11 항-종양 활성의 추가적인 임상전 조사가 요구되며, 임상적으로

관련되고 성장하고 있는 그룹의 리톡시맵 내성 또는 난치성의 NHL 환자들의 치료를 위한 적용가능성을 나타낼 것이다.

[0018] 중요하게도, IgG B11은 광범위하고 강력한 생체내 항-골수종 활성을 갖는 것으로 나타났다. CD20은, 항원에 대한 B 세포 노출 후 까지, 초기 프리-B 세포 단계로부터 B 세포 발달 도중에 광범위하게 발현되나, 항체 분비 형질세포 및 다발성 골수종을 포함하는 이러한 단계로부터 기원한 암들이 전형적으로 발현하지 않거나 CD20의 낮은 이중성 발현을 나타낸다. 따라서, 다발성 골수종은 리톡시맵과 같은 CD20 표적 치료로 효과적으로 치료되는 것으로 보이지 않는다(23).

[0019] 이에 비해, 여러 관찰은 ICAM-1이 다발성 골수종 치료에 적절한 표적이 될 수 있으며, 특히 IgG B11과 같은 항체를 이용한 표적 치료에 적절한 표적이 될 수 있는 것으로 나타났다. 우선, 최근의 보고는 ICAM-1이 일차 다발성 골수종 형질 세포에 의해 강하게 발현되며, ICAM-1이 화학 치료를 이용한 치료에 반응하여 환자에서 더욱 상향조절되며, 화학 치료에 대한 내성이 발달한 환자(현재 불가피한 말기의 다발성 골수종)(14, 22)에서 가장 현저한 것으로 나타났다(64).

[0020] 이러한 관찰과 부합하여, 대부분의 골수종 세포는 환자의 비-골수종 림프구에 비해 증가된 수준으로 B11에 의해 표적된 에피토프를 발현하는 것이 본 발명에서 입증되었다.

[0021] 질병이 진행됨에 따라 상향조절되고, 현재 유용한 치료 옵션에 대한 내성이 발달함에 따라 상향조절되는, 악성 종양 세포에서의 높고 균질적인 표적 발현은 항체-기초 치료에 적절한 표적의 홀마크(hallmarks)로서 간주되며, 특히 암 세포에 대한 직접적인 세포독성을 제공하는 항체에 기초한 치료에 적절한 표적의 홀마크로서 간주된다.

[0022] IgG B11 항-종양 활성에 대한 중요한 메커니즘이 되는 직접적인 세포 독성과 부합하여, IgG B11 항-종양 활성은 IgG 바인딩 및 종양 세포 발현 ICAM-1 리셉터의 포화화 관련이 있는 것으로 입증되었다. 더욱이, 직접적인 종양 세포 세포독성이 되는 주요 작용 양식과 부합하여, IgG B11은, 이의 문서로 입증된 세포자살 유도 특성(10)에 부가적으로, 생체내에서 및 세포내에서 모두 Fc:Fc γ R-의존성 항-종양 활성을 부여하였다. 축적된 증거는 적어도 대조 환자군에서 항체 불변 영역(Fc) 및 호스트 Fc 감마 리셉터(Fc γ R) 간의 상호작용이 리톡시맵과 다른 암 항체들의 임상적 활성에 중요함을 제시한다(52, 53, 65-67).

[0023] 따라서, 독립적인 연구에서 항체 불변 Fc 영역에 대한 최고의 친화도를 갖는 Fc γ RIIIa 대립 형질에 대해 동형성인 NHL 환자는 리톡시맵을 이용한 치료에 대해 적어도 하나의 보다 낮은 친화도의 Fc γ RIIIa 대립 형질을 갖는 환자에 비해 향상된 생존율을 나타내며, 리톡시맵은 생체내에서 항-종양 활성이 항체 Fc:호스트 Fc γ R-상호작용에 의존하는 것으로 나타났다(54).

[0024] 현재, 다발성 골수종의 치료용으로 승인된 항체는 없으나, Fc:Fc γ R-개입 치료 항체는 형질변형되었으며, 이러한 방식으로 혈액암 및 고형암들이 치료되고 있다(1). 전임상 데이터는 골수종 치료를 위해 현재 사용되고 있고 개발된 ImiDs가 Fc:FcR-의존성 항-종양 활성을 증가시키는 것으로 입증하였다(Wu et al. (2008) Clin Cancer Res, 14 pp4650-7). ImiDs는 탈리도마이드의 구조적 및 기능적 유사체이며, 이는 염증, 자가면역 및 종양 질환의 치료를 위해 유망한 새로운 부류의 면역조절제임을 나타낸다.

[0025] 이러한 관찰은, 적절한 골수종 관련 리셉터들 및 이러한 구조물들을 표적하는 Fc:Fc γ R-개입 항체들이 확인될 수 있다면, 이러한 표적 특이 항체들이 골수종 치료 및 질병 결과를 개선할 수 있음을 제시한다(1). 따라서, 입수가능한 문헌들 및 본 명세서에 나타난 데이터에 기초하여, ICAM-1:IgG B11은 골수종 치료에 매력적인 축을 제공할 수 있는 것으로 나타났다.

- [0026] 골수종 치료의 ICAM-1 표적 중재를 위한 추가 근거 자료로, ICAM-1은 다발성 골수종 발병 및 다발성 수준에서의 약물 내성 발달에 연루된다(12, 14, 22). 다발성 골수종은 골수에서 악성종양 형질 세포의 침투 및 확장으로 특성화되며, 골수 세포는 증식 및 생존을 위해 기질 세포와의 상호작용에 의존한다. ICAM-1은 이의 리간드인 인테그린 $\alpha L\beta 2$, 인테그린 $\alpha M\beta 2$, 및 muc-1과 바인딩함으로써, 세포 접합 이벤트에 연루되며, 이는 다발성 골수종 세포 증가 증식, 이동, PCD에 대한 내성 및 세포 접합 분자 유도 약물 내성의 발달을 촉진하는 다중 세포 신호전달 경로를 촉발시킨다(12, 68, 69). 생체내 실험 모델(70)에서 및 시험관내에서 골아세포 또는 파골세포(71)와 골수 세포의 공동 배양으로 scid-hu를 이용한 ICAM-1 의존성 인간 골수종-인간 기질 세포 상호작용에 미치는 IgG B11의 영향을 조사할 목적으로 계획된 연구가 수행된바 있다.
- [0027] 리톡시맵 및 보르테조미프와 비교하여 IgG B11의 향상된 항-종양 활성은 기작론적 관점에서 흥미롭다. 향상된 항-종양 활성은 리톡시맵 에피토프와 비교하여 종양 세포에 의해 발현되는 보다 많은 수의 ICAM-1 에피토프로부터 발생하지 않았으며, 이는 IgG B11이 리톡시맵과 비교하여 다른 시그널링 또는 이펙터 경로에 의해 보다 강한 사멸 신호 또는 유도 세포사를 전달하였음을 나타낸다. 리톡시맵 및 보르테조미프와는 구별되는 경로에 의한 세포사를 유발하는 능력은 특히 이러한 약물에 대한 후천적인 내성을 가진 종양을 치료하는데 중요하다.
- [0028] 치료학적 암 항체는 현저한 항-종양 활성을 제공하는 것에 부가적으로 환자에게 안전하고 수용가능해야 한다. ICAM-1은 일반적인 생리학적 환경에서 제한된 발현 및 조직 분포를 나타내지만, 조직 손상 또는 염증 스트레스에 반응하여 여러 세포 타입에 대해서는 상향조절되어, 항-ICAM-1 항체를 이용한 치료에 대해 안전성 문제가 일어난다. 그러나, 독립적인 연구자들에 의한 이전 시험은, 항-ICAM-1 항체가 다양한 환자 그룹(75-79)에 의해 잘 수용된 것으로 입증되었다(75-79). 본 출원인의 B11의 전임상 안전성 평가는 안전하고, 잘 수용적이며, 그리고 B11이 중요한 면역 세포 기능을 증진 또는 방해한다는 증거가 없는 것으로 나타났다.
- [0029] 약리학적 관점으로부터, 그리고 이의 전적인 인간 특성에 기인하여 B11은 이전에 개발된 마우스 또는 키메라 ICAM-1 항체(80)에 비해 면역원성이 낮거나 없는 것으로 예측되며, 인간 IgGs에 대해 전형적인 반감기(2-3주)를 갖는 것으로 예측된다. 따라서, 이의 현저한 전임상 항-골수종 활성 및 예측된 안전성 프로파일에 기초하여, 다발성 골수종에서 IgG B11을 이용한 임상 시험은 현재 미국에서 시작되었다.
- [0030] 요약하면, 본 출원인은 다발성 골수종의 전임상 모델에서 보르테조미프(벨케이드), 텍사메타손, 레블리마이드(Revlimid) 및 알케란(Alkeran)을 포함하는 현재 사용되는 치료제들과 비교하여 향상된 항-골수종 활성을 갖는 새로운 세포사 유도 ICAM-1 항체(IgG B11)을 확인하였다. 또한, 본 출원인은 현재 사용되는 이러한 제제들을 이용한 생체내 치료 후에 수거된 대부분의 다발성 골수종 세포가 (B11 에피토프를 포함하는) ICAM-1의 발현을 유지하거나 증가시키는 것을 확인하였으며, 이는 이러한 ICAM-1 항체가 다른 제제들을 이용한 이전 치료에 반응하지 않거나 재발된 환자들에게 특히 유용할 것이라는 것을 제시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0031] 다발성 골수종에 대한 새로운 잠재적인 표적 및 약물이 요구되며, 특히 현존하는 약물에 반응하지 않는 환자들 또는 초기에는 반응하지만 후속적으로 재발되는 환자들에게 사용하기 위한 새로운 잠재적인 표적 및 약물이 요구된다.

과제의 해결 수단

- [0032] 따라서, 본 발명의 제1견지로,
- [0033] ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 ICAM-1에 대한 바인딩 특이

성을 갖는 상기 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트의 변이체, 융합체 또는 유도체, 또는 상기 변이체의 융합체 또는 이의 유도체를, 암에 대해 이전에 치료받은 적이 있으며, 상기 치료에 반응하지 않거나 상기 치료에 이전에는 반응하였고 후속적으로 재발된 환자에서 암의 치료를 위한 약제의 제조용으로 사용하는 용도가 제공된다.

[0034] 재발은 초기에 달성된 치료학적 반응(즉, 질병 컨디션의 향상) 후에, 증상성 질병을 갖는 질병 진행으로 정의된다. 무-반응성은 치료 중에 질병 진행 또는 치료학적 반응의 부재로 정의된다.

[0035] 환자가 재발되었는지 혹은 특정 치료에 무-반응성인지를 정의하는 것과 관련하여 임상시에 의해 고려될 수 있는 다양한 기준이 있다. 이러한 요인들에는 (이에 한정하는 것은 아니나), 골격 통증을 갖는 새로운 골절 위험, 낮아진 헤모글로빈 또는 증가된 신부전에 기인한 피로, 감염, 혈구세포수, 종양 크기 또는 종양 재성장/복귀, 새로운 암의 발달(전이)을 포함한다.

[0036] 이러한 어떠한 요인들에 대한 실험실 시험은 표준 임상 및 실험 기술 및 장치를 이용하여 수행된다.

[0037] 일 구현으로, 치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 암과 동일한 암이다.

[0038] 다른 구현으로, 치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 암과 다른 암이다.

[0039] 본 발명의 제2견지로,

[0040] 암에 대해 이전에 치료받은 적이 있으며, 상기 치료에 반응하지 않거나 상기 치료에 이전에는 반응하였고 후속적으로 재발된 환자에서 암의 치료를 위해 사용되는, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 상기 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트의 변이체, 융합체 또는 유도체, 또는 상기 변이체의 융합체 또는 이의 유도체가 제공된다.

[0041] 일 구현으로, 치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 암과 동일한 암이다.

[0042] 다른 구현으로, 치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 암과 다른 암이다.

[0043] 본 발명의 제3견지로,

[0044] 암에 대해 이전에 치료받은 적이 있으며, 상기 치료에 반응하지 않거나 상기 치료에 이전에는 반응하였고 후속적으로 재발된 환자에서 암 치료 방법으로서, ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 상기 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트의 변이체, 융합체 또는 유도체, 또는 상기 변이체의 융합체 또는 이의 유도체의 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법이 제공된다.

[0045] 일 구현으로, 치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 암과 동일한 암이다.

[0046] 다른 구현으로, 치료할 암은 환자가 이전에 치료받은 암과 다른 암이다.

도면의 간단한 설명

[0047]

도 1은 생체내에서 CD20-발현 종양에 대해 현저한 항-종양을 갖는 새로운 ICAM-1 항체가 콤바인 디퍼런셜 바이오패닝(combined differential biopanning) 및 프로그램 세포사 스크리닝에 의해 분리되는 방법을 나타낸다. (I) 종양 관련 리셉터에 특이적인 항체에 대한 디퍼런셜 바이오패닝. (II) 프로그램 세포사(PCD) 스크리닝. (III) 표적 확인. (IV) 생체내 항-종양 활성.

도 1a는 경합 연속 디퍼런셜 바이오패닝 방법을 이용하여 B 림프종 표적 세포에 대한 선택성을 갖는 항체가 회수되는 방법을 나타내며, 여기서 막 소포 형태의 과잉의 서브트랙터 세포 항원과 함께 전체 세포 형태의 표적 세포 항원이 고유의 n-CoDeR® 항체 파아지 라이브러리에 모두 적용되었다.

도 1b는 고 처리량 프로그램 세포사 스크리닝이 다발성 B 세포 림프종 PCD-유도 항체를 분리하는데 어떻게 사용되었는지를 나타낸다. B-세포 림프종 세포는 후보 항체의 적정 농도의 존재하에서 배양되고, 밤새 과-가교반응 시키고(hyper-cross-linking), 플로우 사이토메트리를 이용하여 아넥신 V-AF488 및 프로피듐 요오드로 복합 염색된 후에 세포사를 모니터링하였다. 도 1(II)(i)은 기능적으로 분리된 BI-505 항체에 의해 유도된, 각각, 초기 세포사멸 세포 및 말기 세포사멸 세포의 전형적인 거대분자에 대한 막 수포 및 세포막 투과성을 나타낸다. 도 1(II)(ii)는 아넥신 V-488-양성으로 측정된 죽은 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 1c는 전적으로 인간 IgG로 용균되고(lysed), 면역침전된 후, 단백질을 A 세파로오스로 가교된 Raji 또는 Ramos B 림프종 세포에서 표적 확인이 어떻게 수행되었는지 나타낸다. 항체-특이적 밴드를 잘라내고 트립신 분해 처리한 다음, MALDI-TOF로 분석하였다. BI-505에 의해 침전된 단일 밴드는 ICAM-1으로 확인되었다. ICAM-1의 확인된 확인은 최대 50배 몰의 과잉의 가용성 재조합 ICAM-1 또는 VCAM에 의한 블로킹 시험으로 확인되었다. PC-3 세포에 대한 BI-505의 MFI는 플로우 사이토메트리에 의해 측정되었다. 과선은 음성 대조구 항체를 나타내며, 회색으로 채워진 막대 그래프는 예비블로킹을 하지 않은 BI-505의 MFI를 나타낸다. BI-505는 재조합 VCAM 또는 ICAM-1으로 예비블로킹되었다. 도 1c(iii)은 ELISA 플레이트가 재조합 인간 ICAM-1, ICAM-2 또는 ICAM-3로 어떻게 코팅되고, ICAM-1에 대한 BI-505의 바인딩이 발광 프로토콜을 이용하여 어떻게 검출되었는지 나타낸다. 항-ICAM-2 및 α -ICAM-3 항체가 각각, ICAM-2 및 ICAM-3를 검출하기 위한 양성 대조구로 사용되었다. 도 1d는 PCD-유도 ICAM-1 항체의 치료 효능을 더욱 조사하기 위해, BI-505의 생체내 항-종양 활성을, CD20을 발현하는 2가지의 잘 특성화된 종양 B 세포주, ARH-77 또는 Daudi로 이식된 면역결핍 scid 마우스를 포함하는 종양 모델에서 평가하였다.

도 2: BI-505는 SCID/ARH-77 골수종 및 Daudi 이종 이식 모델에서 현저한 생체내 항-골수종 효과 및 효능을 나타낸다.

종양 세포를 SCID 마우스의 좌측면에 피하주사하였다. 종양 세포 접종 후 1일에 시작하여 마우스에 20, 2 및/또는 0.2mg/kg의 투여량으로 BI-505, 대조구 항체 및 리톡시맙을 1주일에 2회 복강내 주사하였다. 처리군 당 8 내지 10마리로 하였다. (A) 항체 투여량에 따른 종양 크기. (B) 항체 투여량에 따른 카플란 마이어(Kaplan-Meier) 생존 그래프. (C) 플로우 사이토메트리에 의해 분석된 에피토프 발현. 통계학적 유의성은, 각각, Graphpad InStat 또는 Prism 소프트웨어를 사용하여 던즈 다중 비교 검정(Dunn's Multiple Comparisons Test)(종양 부피) 또는 로그 순위 검정(log-rank test)(마우스 생존률)으로 크루스칼-윌리스 검정(Nonparametric ANOVA)을 사용하여 대조구 항체 처리군에 대해 산출되었다. 통계학적 유의성은 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 로 고려되었다.

도 3: BI-505는 SCID/ARH-77 골수종 이종 이식 모델에서 현저한 생체내 항-골수종 효과 및 효능을 나타낸다.

종양 세포를 SCID 마우스의 좌측면에 피하주사하였다. 종양 세포 접종 후 1일에 시작하여 마우스에 0.02-20mg/kg의 투여량으로 BI-505를 1주일에 2회 복강내 주사하였다. 처리군 당 8 내지 10마리로 하였다. (A) 항체 투여량에 따른 종양 크기. (B) 항체 투여량에 따른 카플란 마이어(Kaplan-Meier) 생존 그래프. 통계학적 유의성은, 각각, Graphpad InStat 또는 Prism 소프트웨어를 사용하여 던즈 다중 비교 검정(Dunn's Multiple Comparisons Test)(종양 부피) 또는 로그 순위 검정(log-rank test)(마우스 생존률)으로 크루스칼-윌리스 검정(Nonparametric ANOVA)을 사용하여 대조구 항체 처리군에 대해 산출되었다. 통계학적 유의성은 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 로 고려되었다. 그래프는 수회 수행된 실험을 대표적으로 나타낸다. (C) 종양 세포주에 대한 BI-505의 에피토프 포화는 BI-505 농도에 따라 도시되었다. (D) Daudi B 림프종 세포는 16시간 동안 가교 2차 Fab'2 염소 항-인간-Fc 항체의 존재하에서 BI-505 또는 대조구 항체와 함께 배양되었으며, 세포사 유도는 아넥신 V/프로피듐 요오드로 세포를 염색한 후 검출하였다. BI-505에 의한 세포사 유도는 농도에 따라 도

시되었다. 실험은 3회 수행되었으며, 각 실험은 적어도 5회 반복되었다. 그래프는 각 실험(n=5x3)으로부터 수집된 표준화 데이터를 나타낸다. (E) 혈액 시료를 생체내 이중 이식 실험 코스 중에 다른 시점에서 수집하고, ELISA에 의해 BI-505 트로프(trough) 수준을 분석하였다. 생체내 항-종양 활성은 트로프 BI-505 혈청 농도에 따라 도시하였으며, 5-파라미터 로그-로그 곡선(five-parameter log-log curve) 및 XLfit 소프트웨어를 이용하여 맞추어졌다. (F) 시험관내 항-종양 활성과 BI-505 에피토프 포화의 상관성. (G) 생체내 항-종양 활성과 BI-505 에피토프 포화의 상관성.

도 4는 다발성 골수종 환자가 현저한 BI-505 에피토프 발현을 갖는 것을 나타낸다. (A) 다발성 골수종 환자 특징 및 BI-505 에피토프 발현. (B) 골수종 세포와 정상 B 세포 상의 BI-505 에피토프.

도 5는 BI-505가 생체내에서 광범위하고 ICAM-1-의존성 항-골수종 활성을 갖는 것을 나타낸다.

NCI-H929, EJM, RPMI-8226 또는 OPM-2 골수종 세포를 0일에 SCID 마우스의 좌측면에 피하주사하였다. 2mg/kg BI-505 또는 대조구 IgG1을 이용한 항체 처리를 1일에 시작하였으며, 1주일에 2회 복강내주사 투여요법을 계속 하였다. 종양 크기가 윤리적 한계에 이르렀을 때 마우스를 희생시켰다. IgG B11은 ICAM-1-음성 세포주 OPM-2로 이중 이식된 동물에서 종양 성장에 영향을 주지 않았으며, 이는 항-골수종 활성이 ICAM-1-의존성을 입증 한다. (A)는 2회 수행된 대표적인 실험으로부터 얻어진 데이터를 나타낸다(검은 원은 BI-505 처리군을 나타내고, 백색 원은 대조 IgG1 처리군을 나타냄). (B)는 2회의 독립적인 실험으로부터 수집되고 표준화된 데이터를 나타낸다(n = 처리군 당 8 내지 10마리). 검은 막대는 BI-505 처리군을 나타내며, 백색 막대는 대조 IgG1 처리 군을 나타냄). 통계학적 유의성은 맨 휘트니 비-모수 분석 및 그래프 패드 인스태트 프로그램을 이용하여 대조 구 항체 처리군에 대해 산출되었다. 통계학적 유의성은 *p<0.05, **p<0.01 및 ***p<0.001로 고려되었다.

도 6: BI-505는 실험적인 진전된 다발성 골수종에 대한 보호를 부여한다.

ARH-77 세포 또는 RPMI-8226은 SCID 마우스에 정맥내 주사되었다. (A) ARH-77 모델. (그래프에서 화살표로 나타낸 바와 같이) 7일, 10일, 13일 및 16일에 항체 2mg/kg 또는 보르테조미프(Velcade) 0.5mg/kg을 동물에 정맥 내 주사하였다. (B) RPMI-8226-모델. BI-505 또는 대조구 mAb를 8주 동안 1주일에 2회 2mg/kg으로, 보르테조 미프 1mg/kg을 8주 동안 1주일에 1회 정맥내 주사로 투여하고, 처리 5일 및 위시 아웃 2일로 구성된 2 사이클 동안 레날리도마이드를 2mg/kg으로 경구(p.o.) 투여하고, 8주 동안 1주일에 1회 3mg/kg으로 멜팔란을 그리고 2주 연속으로 1주일에 3회 6mg/kg/inj로 텍사메타손(DXH)을 정맥내 주사로 투여하였다. 처리군 당 6-10마리의 마우스로 하였다. 통계학적 유의성은 로그-순위 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 산출되었으며, ***p<0.001로 검출하였다. (C) 인간 세포에서 ICAM-1 수준을 조사하기 위해, 다양한 기관들로부터 얻은 세포들을 CD38+/mCD45-/BI-505+에 대해 염색하고 게이트(gate)하였다. 좌측 패널은 CD38+/mCD45 집단에서 BI-505 양성 세포의 퍼센트를 나타내고, 우측 패널은 양성 세포의 평균 형광 강도를 나타낸다.

도 7은 BI-505 FcγR-바인딩 능력이 시험관내 및 생체내 항-종양 활성과 상관성이 있음을 나타낸다.

(A) ARH-77 세포를 SCID 마우스(n = 그룹당 8)의 좌측면에 피하주사하였다. 마우스를 1주일에 2회 다양한 BI-505 아이소타입으로 처리하였다. (B) 다양한 제조합 FcγRs에 대한 BI-505 아이소타입의 바인딩을 비아코어(Biacore)를 이용하여 측정하였다. IgG4 또는 N297Q-돌연변이가 아니라 BI-505 IgG1이, 마우스에서 Fc-매개 활성에 관련된 주요 Fc-리셉터인 뮤린 FcγRIV에 대하여 강한 바인딩을 나타내었다. (C) ADCC는 주요 세포로서 다양한 비율의 내츨러 킬러 세포 및 표적 세포로서 B 림프종 세포주(CL-01)를 이용하여 조사하였다. 예측대로, BI-505만이 종양 세포의 FcγRIIIA-의존적 ADCC를 매개하였다. (D) BI-505 아이소타입이 다양한 친화도로 주요 인간 ADCC-매개 리셉터인 인간 FcγRIIIA에 바인딩하였기 때문에, ADCC 활성과 항-종양 활성의 상관성이 관찰되었다. (E) 처리된 마우스로부터 얻어진 ARH-77 이중 이식 조직을 염색하고, F4/80 양성 부분에 대해 정량화하였으며, 이는 BI-505 처리된 마우스에서 종양 조직의 마크로파지 침투가 리톡시맵 및 대조 IgG 처리된 마우스에서보다 더 현저히 증가하였음을 보여주었다. 도표는 측정된 조직에서 F4/80 양성 부분의 퍼센트를 나타낸다. 통계학적 유의성은 던즈 다중 비교 검정(Dunn's Multiple Comparisons Test)으로 크러스컬-윌리스 검정(Nonparametric ANOVA)을 사용하여 대조구 항체 처리군에 대해 산출되었다. 통계학적 유의성은 *p<0.05, **p<0.01 및 ***p<0.001로 고려되었다.

도 8은 (A) ARH-77 및 (B) Daudi 이중 이식 모델에서 리톡시맵과 비교한 BI-505/IgG B11의 높은 효과 및 효능을 나타낸다.

도 9는 BI-505, 리톡시맵 또는 대조군으로 처리된 종양들 모두가 유사하고 현저한 양의 CD20 및 ICAM-1 항체-표적 에피토프를 발현하는 것을 면역조직학적 분석을 통해 나타내었다.

도 10: (A)는 MM 골수 세포에 대한 면역 표현형 염색 패널을 나타낸다. (B)는 높은 CD38, CD138 및 CD56 발현 및 CD45의 상실에 대한 선택을 위해 사용된 플로우 사이토메트리 분석을 나타내며, 이는 모노클로날 발현을 확인한다. B11 에피토프 발현은 후속적으로 환자 #7(+), #8(++) 및 #10(+++)에 대해 측정되었다. (C)는 환자 (1), 재발 후(2) 및 재발된 다음 처리 후(3)의 골수중 세포에서 B11 에피토프 발현을 나타낸다.

도 11은 BI-505의 생성된 아이소타입 스위치 변이체의 표적 단백질의 바인딩 친화도에 대한 거의 동일한 EC_{50} 값을 나타낸다.

도 12는 B-세포 세포사멸, T-세포 증식, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 보체 의존성 세포독성(CDC) 및 사이토카인 방출(특히 TNF- α 및 IL-8)이 B11 처리에 의해 현저히 영향받지 않음을 보여준다.

도 13은 다발성 MM 이종 이식 모델에서 대조구 처리된 마우스($p < 0.001$)에 비하여, 그리고 4가지 다른 SOC 치료(레빌리마이드 또는 벨케이트에 비해, $p < 0.05$, 텍사메타손 또는 알케란에 비해 $p < 0.001$)에 비하여 BI-505가 현저히 생존률을 증가시키는 것을 나타낸다. $N = 6-10$ /그룹

도 14는 표준 치료 약물을 이용한 다발성 MM 세포로 이종 이식된 마우스의 치료가 ICAM-1(A)을 발현하는 MM 세포의 수 또는 ICAM-1 발현 수준(B)에 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

도 15a 및 도 15b는 B11 항체 가변 헤비(B11-VH) 및 가변 라이트(B11-VL) 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 암 치료는 종양 세포 이동성 및 침투성의 감소에 의한 종양 세포 증식 억제, 혈관형성(종양 성장을 지지하는데 필요한 새로운 혈관의 성장) 억제 및/또는 전이 억제에 의한 종양 퇴행을 촉진한다.

[0049] 본 발명의 항체는 고형 상 종양/악성 종양, 국소적으로 진행된 종양, 인간 연조직 육종, 임파선 전이, 다발성 골수종, 급성 및 만성 백혈병, 및 림프종을 포함하는 혈액 세포 전이를 포함하는 전이성 암, 구강암, 후두암 및 갑상선암을 포함하는 두경부암, 소세포 암종 및 비소세포 암을 포함하는 폐암, 소세포 암종 및 도관암을 포함하는 유방암, 식도암, 위암, 대장암, 결장암 및 결장 종양 형성과 관련된 폴립을 포함하는 위장암, 췌장암, 간암, 방광암 및 전립선암을 포함하는 비뇨기암, 난소암, 자궁(자궁 내막 포함)암 및 난포 내의 고형 종양을 포함하는 여성 생식기의 악성 종양, 신장 세포 암종을 포함하는 신장암, 내인성 뇌 종양, 신경아세포종, 성상 세포 뇌 종양을 포함하는 뇌암, 신경교종, 중추신경계에서의 전이성 종양 세포 침입, 골종을 포함하는 뼈암, 악성 흑색종, 인간 피부 케라티노사이트의 종양 진전, 편평세포암종, 기저세포암종, 혈관주위세포종 및 카포시 육종을 포함하는 피부암을 포함하는 성인 및 소아 종양에 효과적일 수 있다.

[0050] 상기 치료 조성물은 단독으로 또는 수술, 화학 치료, 방사선 치료, 열치료법 및 레이저 치료법과 같은 보조적인 암 치료와 함께 치료학적으로 유효한 투여량으로 투여될 수 있으며, 예를 들어, 종양 크기 감소, 종양 성장의 감속, 전이 억제 또는 이외의 전체적인 임상학적 컨디션의 개선과 같은 유용한 효과를 필연적인 암 근절 없이 제공할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명의 치료 조성물은 암의 예방적 처리를 위해 사용될 수 있다. 개체가 암이 발달되는 성향을 갖게 하는 당해 기술분야에 알려진 유전적 조건 및/또는 환경적 상황(예, 발암 물질에 대한 노출)이 존재한다. 이러한 환경하에서, 이러한 개체를 본 발명의 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트의 치료학적으로 유효한 투여량으로 처리하여 암 발달 위험을 감소시키는데 유용할 수 있다.

[0052] 시험관내 모델은 본 발명의 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트의 유효량을 잠재적 암 치료제로서 조사하는데 사용될 수 있다. 이러한 시험관내 모델은 배양된 종양 세포의 증식 어세이, 소프트 아가(soft agar)에서 배양된 종양 세포의 성장(Freshney, (1987) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Wiley-Liss, New York, NY Ch 18 and Ch 21), 누드 마우스에서의 종양 시스템(Giovanella *et al.*, *J. Natl. Can. Inst.*, 52: 921-30 (1974)), 보이덴 챔버 어세이(Boyden Chamber assays)에서 종양 세포의 이동성 및 침습 가

능성 평가(Pilkington *et al.*, *Anticancer Res.*, 17: 4107-9 (1997)), 및 병아리 용모요막의 혈관 신생 유도 또는 혈관 내피 세포 이동의 유도와 같은 혈관형성 어세이(Ribatta *et al.*, *Intl. J. Dev. Biol.*, 40: 1189-97 (1999) and Li *et al.*, *Clin. Exp. Metastasis*, 17:423-9 (1999))를 포함한다. 적절한 종양 세포주는 예를 들어, American Type Tissue Culture Collection 카탈로그로부터 입수가능하다.

[0053] 일 구현으로, 치료할 암은 혈액학적 신생물 종양이다.

[0054] 혈액학적 신생물 종양은 혈액, 골수 및 림프절에 영향을 준다. 이들 3가지는 면역 시스템을 통해 친밀히 연결되어 있어, 이들 중 하나에 영향을 미치는 질병은 종종 나머지들에도 영향을 미친다. 예를 들어, 림프종은 엄밀히 말하면 림프절의 질병이지만, 이는 종종 골수에 퍼져, 혈액에 영향을 주고 가끔 파라단백질을 생성한다.

[0055] 혈액학적 악성 종양은 2가지의 주요 혈액 세포 계통, 골수 세포주 및 림프성 세포주 중 하나로부터 유래될 수 있다. 골수 세포주는 일반적으로 과립성 백혈구, 적혈구, 혈소판, 대식 세포 및 비만 세포를 생성하며; 림프성 세포주는 B, T, NK 및 형질 세포를 생성한다. 림프종, 림프성 백혈병 및 골수는 림프성 세포주로부터 유래하며, 한편 급성 및 만성 골수성 백혈병, 골수 이형성 증후군(myelodysplastic syndrome) 및 골수 증식성 질환은 골수로부터 유래한다.

[0056] 일 구현으로, 치료할 암은 림프세포 증식성 질환(lymphoproliferative disorder, LPD)이다.

[0057] 림프세포 증식성 질환(LPD)은 림프구가 과량으로 생성되는 여러 가지의 컨디션을 칭한다. 이는 전형적으로 컴프로마이즈드(compromised) 면역 시스템을 갖는 환자에서 발생한다.

[0058] LPD의 예는 다음과 같다.

[0059] · 여포성 림프종

[0060] · 만성 림프구성 백혈병

[0061] · 급성 림프구성 백혈병

[0062] · 모발성 세포 백혈병

[0063] · 림프종

[0064] · 다발성 골수종

[0065] · 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia)

[0066] · 비스코트-올드리치증후군(Wiskott-Aldrich syndrome)

[0067] · 이식후 림프세포 증식성 질환(Post-transplant lymphoproliferative disorder)

[0068] · 자가면역 림프세포 증식성 증후군(Autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS)

[0069] · 전신성 홍반성 낭창(Systemic lupus erythematosus, SLE)

[0070] 일 구현으로, 치료할 암은 림프종 또는 비-호지킨림프종(non-Hodgkin lymphoma, NHL)이다.

[0071] 림프종은 면역 시스템의 림프 세포에서 시작되어 림프 세포의 고형 종양으로 나타난다. 이러한 악성 종양 세포는 종종 림프절에서 기원하여, 림프절의 확장(종양)으로 나타난다. 림프종은 림프구성 백혈병과 밀접한 관계가

있으며, 이는 또한 림프구에서 기원하지만 전형적으로 순환하는 혈액 및 골수(이곳에서 혈액 세포가 조혈이라 불리는 공정으로 생성됨)만을 포함하며, 일반적으로 고정된 중양을 형성하지 않는다. 다수 종류의 림프종이 있으며, 림프종은 혈액학적 신생물 중양이라 불리는 광범위한 그룹의 질병 중 일부이다.

[0072] 일 구현으로, 치료할 암은 형질 세포 질환(형질구 질환이라고도 함)이다.

[0073] 암은 상기 질환(형질구 질환)의 형태를 취할 수 있다. 형질구 질환은 모노클로날 면역글로불린 또는 보통 M 단 백질이라 불리는 파라단백질의 검출가능한 수준을 분비하거나 분비하지 않을 수 있는 형질 세포의 모노클로날 집단의 악성 증식의 결과로서 생성된다. 일반적인 형질구 질환은 불분명한 징후의 모노클로날 감마글로불린 장애(Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), 다발성 골수종, 단독 골 형질세포종, 골수의 성 형질세포종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(WM), 원발성 유전분증(primary amyloidosis), 및 H-쇄 병(heavy-chain disease)을 포함한다.

[0074] 다른 구현으로, 치료할 암은 다발성 골수종이다.

[0075] 일 구현으로, 상기 암 치료 방법은 다발성 골수종의 치료에 통상적으로 사용되는 추가의 항암제를 더 포함한다.

[0076] '치료(treatment)'란 대상자/환자의 치료학적 및 예방학적 치료 모두를 포함한다. 용어 '예방(prophylactic)'은 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 또는 조성물을 환자 또는 대상자에서 (다발성 골수종과 같은) 암의 발생 또는 발달의 가능성을 억제하거나 감소하는데 사용하는 것을 포함하는 것으로 사용된다.

[0077] 본 명세서에 사용된 '치료학적으로 유효한 투여량(therapeutically effective amount)' 또는 '유효량(effective amount)' 또는 '치료학적으로 유효한(therapeutically effective)'이란 주어진 조건 및 투여 요법에 대해 치료 효과를 제공하는 양을 칭한다. 이는 필수 첨가제 및 희석제, 즉, 캐리어 또는 투여 운반체와 공동으로 소정의 치료 효과를 생성하기 위해 산출된 활성 물질의 미리 결정된 양이다. 또한, 이는 호스트의 활성, 기능 및 반응에서 임상적으로 현저한 결손을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양을 의미하는 것으로 의도된다. 또한, 치료학적으로 유효한 양은 숙주에서 임상적으로 현저한 컨디션의 개선을 일으키기에 충분한 양이다.

[0078] 바람직한 구현으로, 본 발명의 제1 및 제2 견지의 용도 및 본 발명의 제3 견지의 방법은, 상기 항체, 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 변이체, 융합체 또는 유도체를 약 0.02mg/kg 내지 20mg/kg의 양으로 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0079] 특히 바람직한 구현으로, 환자에게 투여되는 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 변이체, 융합체 또는 유도체의 양은 약 0.02mg/kg 내지 0.10mg/kg; 또는 0.10mg 내지 0.20mg/kg; 또는 0.20mg 내지 0.30mg/kg; 또는 0.30mg 내지 0.40mg/kg; 또는 0.40mg 내지 0.50mg/kg; 또는 0.50mg 내지 0.60mg/kg; 또는 0.60mg 내지 0.70mg/kg; 또는 0.70mg 내지 0.80mg/kg; 또는 0.80mg 내지 0.90mg/kg; 또는 0.90mg 내지 1.00mg/kg; 또는 1.00mg 내지 1.10mg/kg; 또는 1.10mg 내지 1.20mg/kg; 또는 1.20mg 내지 1.30mg/kg; 또는 1.30mg 내지 1.40mg/kg; 또는 1.40mg 내지 1.50mg/kg; 또는 1.50mg 내지 1.60mg/kg; 또는 1.60mg 내지 1.70mg/kg; 또는 1.70mg 내지 1.80mg/kg; 또는 1.80mg 내지 1.90mg/kg; 또는 1.90mg 내지 2.00mg/kg; 또는 2.00mg/kg 내지 2.10mg/kg; 또는 2.10mg 내지 2.20mg/kg; 또는 2.20mg 내지 2.30mg/kg; 또는 2.30mg 내지 2.40mg/kg; 또는 2.40mg 내지 2.50mg/kg; 또는 2.50mg 내지 2.60mg/kg; 또는 2.60mg 내지 2.70mg/kg; 또는 2.70mg 내지 2.80mg/kg; 또는 2.80mg 내지 2.90mg/kg; 또는 2.90mg 내지 3.00mg/kg; 또는 3.00mg 내지 3.10mg/kg; 또는 3.10mg 내지 3.20mg/kg; 또는 3.20mg 내지 3.30mg/kg; 또는 3.30mg 내지 3.40mg/kg; 또는 3.40mg 내지

3.50mg/kg; 또는 3.50mg 내지 3.60mg/kg; 또는 3.60mg 내지 3.70mg/kg; 또는 3.70mg 내지 3.80mg/kg; 또는 3.80mg 내지 3.90mg/kg; 또는 3.90mg 내지 4.00mg/kg; 또는 4.00mg 내지 4.10mg/kg; 또는 4.10mg 내지 4.20mg/kg; 또는 4.20mg 내지 4.30mg/kg; 또는 4.30mg 내지 4.40mg/kg; 또는 4.40mg 내지 4.50mg/kg; 또는 4.50mg 내지 4.60mg/kg; 또는 4.60mg 내지 4.70mg/kg; 또는 4.70mg 내지 4.80mg/kg; 또는 4.80mg 내지 4.90mg/kg; 또는 4.90mg 내지 5.00mg/kg; 또는 5.00mg/kg 내지 6.00mg/kg; 또는 6.00mg 내지 7.00mg/kg; 또는 7.00mg 내지 8.00mg/kg; 또는 8.00mg 내지 9.00mg/kg; 또는 9.00mg 내지 10.00mg/kg; 또는 10.00mg 내지 11.00mg/kg; 또는 11.00mg 내지 12.00mg/kg; 또는 12.00mg 내지 13.00mg/kg; 또는 13.00mg 내지 14.00mg/kg; 또는 14.00mg 내지 15.00mg/kg; 또는 15.00mg 내지 16.00mg/kg; 또는 16.00mg 내지 17.00mg/kg; 또는 17.00mg 내지 18.00mg/kg; 또는 18.00mg 내지 19.00mg/kg; 또는 19.00mg 내지 20.00mg/kg이다.

[0080] 다른 구현으로, 환자에게 투여되는 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 변이체, 융합체 또는 유도체의 양은 0.02mg/kg; 또는 0.03mg/kg; 또는 0.04mg/kg; 또는 0.05mg/kg; 또는 0.06mg/kg; 또는 0.07mg/kg; 또는 0.08mg/kg; 또는 0.09mg/kg; 또는 0.10mg/kg; 또는 0.15mg/kg; 또는 0.20mg/kg; 또는 0.25mg/kg; 또는 0.30mg/kg; 또는 0.35mg/kg; 또는 0.40mg/kg; 또는 0.45mg/kg; 또는 0.50mg/kg; 또는 0.60mg/kg; 또는 0.70mg/kg; 또는 0.80mg/kg; 또는 0.90mg/kg; 또는 1.00mg/kg; 또는 1.10mg/kg; 또는 1.20mg/kg; 또는 1.30mg/kg; 또는 1.40mg/kg; 또는 1.50mg/kg; 또는 1.60mg/kg; 또는 1.70mg/kg; 또는 1.80mg/kg; 또는 1.90mg/kg; 또는 2.00mg/kg; 또는 2.10mg/kg; 또는 2.20mg/kg; 또는 2.30mg/kg; 또는 2.40mg/kg; 또는 2.50mg/kg; 또는 2.60mg/kg; 또는 2.70mg/kg; 또는 2.80mg/kg; 또는 2.90mg/kg; 또는 3.00mg/kg; 또는 3.10mg/kg; 또는 3.20mg/kg; 또는 3.30mg/kg; 또는 3.40mg/kg; 또는 3.50mg/kg; 또는 3.60mg/kg; 또는 3.70mg/kg; 또는 3.80mg/kg; 또는 3.90mg/kg; 또는 4.00mg/kg; 또는 4.10mg/kg; 또는 4.20mg/kg; 또는 4.30mg/kg; 또는 4.40mg/kg; 또는 4.50mg/kg; 또는 4.60mg/kg; 또는 4.70mg/kg; 또는 4.80mg/kg; 또는 4.90mg/kg; 또는 5.00mg/kg; 또는 6.00mg/kg; 또는 7.00mg/kg; 또는 8.00mg/kg; 또는 9.00mg/kg; 또는 10.00mg/kg; 또는 11.00mg/kg; 또는 12.00mg/kg; 또는 13.00mg/kg; 또는 14.00mg/kg; 또는 15.00mg/kg; 또는 16.00mg/kg; 또는 17.00mg/kg; 또는 18.00mg/kg; 또는 19.00mg/kg; 또는 20.00mg/kg이다.

[0081] 통상의 기술자에게 인식되는 바와 같이, 항체를 이용한 치료는 암 세포를 표적하며 주변 조직에는 영향을 주지 않는 이의 능력을 저 독성으로 치료하는 효과를 제공할 수 있다. 내성은 자연 살해(NK) 세포 매개 세포사 또는 종양 세포의 괴사 보다는 세포 사멸을 직접 유도하는 것과 같은 생리학적 메커니즘을 이용하는, 면역 글로불린의 역학적 작용을 반영할 수 있다.

[0082] 통상의 기술자에게 인식되는 바와 같이, 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트의 정확한 양은 이의 특정 활성에 따라 크게 달라질 수 있다. 적절한 투여량은 필수 희석제와 공동으로 소정의 치료 효과를 생성하도록 산출된 미리 정해진 양의 활성 조성물을 함유할 수 있다. 상기 방법 및 본 발명의 조성물의 제조용 용도에서, 활성 성분의 치료학적으로 유효한 양이 제공된다. 치료학적으로 유효한 양은 당해 기술분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 나이, 체중, 성별, 컨디션, 합병증, 다른 질병들 등과 같이 환자 특성에 기초하여 통상의 숙련된 의료 또는 수의 종사자에 의해 결정될 수 있다.

[0083] 다른 구현으로, 본 발명의 용도, 항체 또는 방법은 형질 세포의 표면에 편재된 ICAM-1을 포함한다.

[0084] 다른 구현으로, 본 발명의 용도, 항체 또는 방법은 세포의 표면에 편재된 ICAM-1을 특이적으로 바인딩하고, 그 세포의 세포사 또는 세포자멸사를 유도할 수 있는, 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체를 포함한다.

[0085] 다른 구현으로, 본 발명의 용도, 항체 또는 방법은 상기 항체, 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 변이체, 융합체 또는 유도체를 유효량으로 포함하며, 이는 약 0.1 μ g 내지 5g의 상기 항체, 이의 항원-바인딩 프래그먼트, 변이

체, 융합체 또는 유도체이다.

[illegible]

2.90mg 내지 3.00mg; 또는 3.00mg 내지 3.10mg; 또는 3.10mg 내지 3.20mg; 또는 3.20mg 내지 3.30mg; 또는 3.30mg 내지 3.40mg; 또는 3.40mg 내지 3.50mg; 또는 3.50mg 내지 3.60mg; 또는 3.60mg 내지 3.70mg; 또는 3.70mg 내지 3.80mg; 또는 3.80mg 내지 3.90mg; 또는 3.90mg 내지 4.00mg; 또는 4.00mg 내지 4.10mg; 또는 4.10mg 내지 4.20mg; 또는 4.20mg 내지 4.30mg; 또는 4.30mg 내지 4.40mg; 또는 4.40mg 내지 4.50mg; 또는 4.50mg 내지 4.60mg; 또는 4.60mg 내지 4.70mg; 또는 4.70mg 내지 4.80mg; 또는 4.80mg 내지 4.90mg; 또는 4.90mg 내지 5.00mg; 또는 5.00mg 내지 6.00mg; 또는 6.00mg 내지 7.00mg; 또는 7.00mg 내지 8.00mg; 또는 8.00mg 내지 9.00mg; 또는 9.00mg 내지 10.00mg; 또는 10.00mg 내지 11.00mg; 또는 11.00mg 내지 12.00mg; 또는 12.00mg 내지 13.00mg; 또는 13.00mg 내지 14.00mg; 또는 14.00mg 내지 15.00mg; 또는 15.00mg 내지 16.00mg; 또는 16.00mg 내지 17.00mg; 또는 17.00mg 내지 18.00mg; 또는 18.00mg 내지 19.00mg; 또는 19.00mg 내지 20.00mg; 또는 20.00mg 내지 21.00mg; 또는 21.00mg 내지 22.00mg; 또는 22.00mg 내지 23.00mg; 또는 23.00mg 내지 24.00mg; 또는 24.00mg 내지 25.00mg; 또는 25.00mg 내지 26.00mg; 또는 26.00mg 내지 27.00mg; 또는 27.00mg 내지 28.00mg; 또는 28.00mg 내지 29.00mg; 또는 29.00mg 내지 30.00mg; 또는 30.00mg 내지 31.00mg; 또는 31.00mg 내지 32.00mg; 또는 32.00mg 내지 33.00mg; 또는 33.00mg 내지 34.00mg; 또는 34.00mg 내지 35.00mg; 또는 35.00mg 내지 36.00mg; 또는 36.00mg 내지 37.00mg; 또는 37.00mg 내지 38.00mg; 또는 38.00mg 내지 39.00mg; 또는 39.00mg 내지 40.00mg; 또는 40.00mg 내지 41.00mg; 또는 41.00mg 내지 42.00mg; 또는 42.00mg 내지 43.00mg; 또는 43.00mg 내지 44.00mg; 또는 44.00mg 내지 45.00mg; 또는 45.00mg 내지 46.00mg; 또는 46.00mg 내지 47.00mg; 또는 47.00mg 내지 48.00mg; 또는 48.00mg 내지 49.00mg; 또는 49.00mg 내지 50.00mg; 또는 50.00mg 내지 51.00mg; 또는 51.00mg 내지 52.00mg; 또는 52.00mg 내지 53.00mg; 또는 53.00mg 내지 54.00mg; 또는 54.00mg 내지 55.00mg; 또는 55.00mg 내지 56.00mg; 또는 56.00mg 내지 57.00mg; 또는 57.00mg 내지 58.00mg; 또는 58.00mg 내지 59.00mg; 또는 59.00mg 내지 60.00mg; 또는 60.00mg 내지 61.00mg; 또는 61.00mg 내지 62.00mg; 또는 62.00mg 내지 63.00mg; 또는 63.00mg 내지 64.00mg; 또는 64.00mg 내지 65.00mg; 또는 65.00mg 내지 66.00mg; 또는 66.00mg 내지 67.00mg; 또는 67.00mg 내지 68.00mg; 또는 68.00mg 내지 69.00mg; 또는 69.00mg 내지 70.00mg; 또는 70.00mg 내지 71.00mg; 또는 71.00mg 내지 72.00mg; 또는 72.00mg 내지 73.00mg; 또는 73.00mg 내지 74.00mg; 또는 74.00mg 내지 75.00mg; 또는 75.00mg 내지 76.00mg; 또는 76.00mg 내지 77.00mg; 또는 77.00mg 내지 78.00mg; 또는 78.00mg 내지 79.00mg; 또는 79.00mg 내지 80.00mg; 또는 80.00mg 내지 81.00mg; 또는 81.00mg 내지 82.00mg; 또는 82.00mg 내지 83.00mg; 또는 83.00mg 내지 84.00mg; 또는 84.00mg 내지 85.00mg; 또는 85.00mg 내지 86.00mg; 또는 86.00mg 내지 87.00mg; 또는 87.00mg 내지 88.00mg; 또는 88.00mg 내지 89.00mg; 또는 89.00mg 내지 90.00mg; 또는 90.00mg 내지 91.00mg; 또는 91.00mg 내지 92.00mg; 또는 92.00mg 내지 93.00mg; 또는 93.00mg 내지 94.00mg; 또는 94.00mg 내지 95.00mg; 또는 95.00mg 내지 96.00mg; 또는 96.00mg 내지 97.00mg; 또는 97.00mg 내지 98.00mg; 또는 98.00mg 내지 99.00mg; 또는 99.00mg 내지 100.00mg; 또는 100.00mg (0.10g) 내지 0.20g; 또는 0.20g 내지 0.30g; 또는 0.30g 내지 0.40g; 또는 0.40g 내지 0.50g; 또는 0.50g 내지 0.60g; 또는 0.60g 내지 0.70g; 또는 0.70g 내지 0.80g; 또는 0.80g 내지 0.90g; 또는 0.90g 내지 1.00g; 또는 1.00g 내지 1.10g; 또는 1.10g 내지 1.20g; 또는 1.20g 내지 1.30g; 또는 1.30g 내지 1.40g; 또는 1.40g 내지 1.50g; 또는 1.50g 내지 1.60g; 또는 1.60g 내지 1.70g; 또는 1.70g 내지 1.80g; 또는 1.80g 내지 1.90g; 또는 1.90g 내지 2.00g; 또는 2.00g 내지 2.10g; 또는 2.10g 내지 2.20g; 또는 2.20g 내지 2.30g; 또는 2.30g 내지 2.40g; 또는 2.40g 내지 2.50g; 또는 2.50g 내지 2.60g; 또는 2.60g 내지 2.70g; 또는 2.70g 내지 2.80g; 또는 2.80g 내지 2.90g; 또는 2.90g 내지 3.00g; 또는 3.00g 내지 3.10g; 또는 3.10g 내지 3.20g; 또는 3.20g 내지 3.30g; 또는 3.30g 내지 3.40g; 또는 3.40g 내지 3.50g; 또는 3.50g 내지 3.60g; 또는 3.60g 내지 3.70g; 또는 3.70g 내지 3.80g; 또는 3.80g 내지 3.90g; 또는 3.90g 내지 4.00g; 또는 4.00g 내지 4.10g; 또는 4.10g 내지 4.20g; 또는 4.20g 내지 4.30g; 또는 4.30g 내지 4.40g; 또는 4.40g 내지 4.50g; 또는 4.50g 내지 4.60g; 또는 4.60g 내지 4.70g; 또는 4.70g 내지 4.80g; 또는 4.80g 내지 4.90g; 또는 4.90g 내지 5.00g이다.

[0088] 다른 구현으로, 본 발명의 용도, 항체 또는 방법에서 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체는 무손상 항체(intact antibody)를 포함하거나, 무손상 항체로 구성된다.

[0089] "항체(antibody)"란 실질적으로 무손상 항체 분자를 포함할 뿐만 아니라, 키메라 항체, 인간화된(humanised) 항체, (적어도 하나의 아미노산이 자연 발생 인간 항체에 대해 돌연변이된) 인간 항체, 단일 체 항체, 2중 특이성 항체, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 항체 중쇄 및/또는 경쇄의 호모-다이어 및 헤테로다이어, 및 이의 항원 바인딩 프

래그먼트 및 유도체를 포함한다.

- [0090] 또한, 용어 '항체(antibody)'는 IgG, IgA, IgM, IgD 및 IgE를 포함하는 모든 부류의 항체를 포함한다. 따라서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 분자와 같은 IgG 분자일 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 항체는 IgG 분자, 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체이다.
- [0091] 본 발명의 용도, 항체 또는 방법의 일 구현으로, 상기 항체는 무손상 항체를 포함하거나 무손상 항체로 구성된다. 변형적으로, 상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체는 무손상 항체로 필수적으로 구성될 수 있다. "필수적으로 구성된다(consist essentially of)"라는 것은 상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체가 ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 나타내는데 충분한 무손상 항체의 일부로 구성되는 것을 의미한다.
- [0092] 본 발명의 용도, 항체 또는 방법의 일 구현으로, 상기 항체는 비-자연발생 항체이다. 물론, 상기 항체가 자연 발생 항체인 경우, 이는 분리된 형태(즉, 자연에서 발견되는 것과 구별되는 형태)로 제공된다.
- [0093] 항체의 가변 중 영역(V_H) 및 가변 경 영역(V_L)은 항원 인지에 연루되며, 이는 초기 프로테아제 분해 실험에 의해 인정된 첫 번째 사실이다. 추가 확인은 설치류 항체의 "인간화(humanisation)"에 의해 발견되었다. 설치류 기원의 가변 영역은 그 결과물인 항체가 설치류-모체의 항체의 항원 특이성을 보유하도록 인간 기원의 불변 영역과 융합될 수 있다(Morrison *et al* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851-6855).
- [0094] 하나 이상의 가변 영역을 모두 함유하는 항체 프래그먼트의 박테리아 발현과 관련된 실험으로부터 알려진 바와 같이, 항원 특이성은 가변 영역에 의해 부여되며, 불변 영역과는 독립적이다. 이러한 분자는 Fab-류 분자(Better *et al* (1988) *Science* 240, 1041); Fv 분자(Skerra *et al* (1988) *Science* 240, 1038); V_H 및 V_L 파트너 영역이 가요성 올리고펩타이드를 통해 연결된 단일-쇄 Fv(ScFv) 분자(Bird *et al* (1988) *Science* 242, 423; Huston *et al* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879) 및 분리된 V 영역을 포함하는 단일 영역 항체(dAbs)(Ward *et al* (1989) *Nature* 341, 544)를 포함한다. 특이적 바인딩 사이트를 보유하는 항체 프래그먼트의 합성시 연루되는 기술의 일반적 리뷰는 Winter & Milstein (1991) *Nature* 349, 293-299에서 찾아볼 수 있다.
- [0095] 따라서, "항원-바인딩 프래그먼트(antigen-binding fragment)"는 ICAM-1에 바인딩할 수 있는 항체의 기능성 프래그먼트를 의미한다.
- [0096] 예시적인 항원-바인딩 프래그먼트는 Fv 프래그먼트(예, 단일 쇠 Fv 및 이황화 결합 Fv) 및 Fab-류 프래그먼트(예, Fab 프래그먼트, Fab' 프래그먼트 및 $F(ab)_2$ 프래그먼트)로 구성되는 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0097] 본 발명의 용도, 항체 또는 방법의 일 구현으로, 상기 항원-바인딩 프래그먼트는 단일 쇠 Fv(scFv) 또는 이황화 결합 Fv이다.
- [0098] 편리하게, 상기 항원-바인딩 프래그먼트는 Fab' 프래그먼트 또는 $F(ab)_2$ 이다.
- [0099] 항체 프래그먼트를 이용하는 장점은 전체 항체보다 수배 더 많다. 보다 작은 크기의 프래그먼트는 고정 조직의

보다 우수한 침투성과 같은 향상된 약학 특성을 이룰 수 있다. 더욱이, Fab, Fv, ScFv 및 dAb 항체 프래그먼트와 같은 항원-바인딩 프래그먼트는 이. 콜라이(*E. coli*)에서 발현되고 이로부터 분비될 수 있어, 다량의 상기 프래그먼트의 용이한 생산이 가능하다.

- [0100] 또한, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 또는 다른 적절한 폴리머의 공유결합에 의해 변형된 것과 같은, 변형된 형태의 항체 및 이의 항원-바인딩 프래그먼트가 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0101] 항체 및 항체 프래그먼트를 생성하는 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 항체는 항체 분자의 생체내 생성의 유도, 면역 글로불린 라이브러리의 스크리닝(Orlandi. *et al.*, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:3833-3837; Winter *et al.*, 1991, *Nature* 349:293-299) 또는 배양 세포주에 의한 모노클로날 항체 분자의 생성을 이용하는 여러 가지 방법들 중 어느 하나를 통해 생성될 수 있다. 이에는 하이브리도마 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술 및 앱스테인-바 바이러스(EBV)-하이브리도마 기술(Kohler *et al.*, 1975. *Nature* 256:4950497; Kozbor *et al.*, 1985. *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote *et al.*, 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030; Cole *et al.*, 1984. *Mol. Cell. Biol.* 62:109-120)을 포함하나, 이로써 제한되는 것은 아니다.
- [0102] 편리하게, 본 발명은 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체를 제공하며, 여기서 상기 항체는 재조합 항체(즉, 재조합 수단에 의해 생성된 항체)이다.
- [0103] 본 발명의 용도, 항체 또는 방법의 바람직한 구현으로, 상기 항체는 모노클로날 항체이다.
- [0104] 선택된 항원에 대한 적절한 모노클로날 항체는 예를 들어, 본 명세서에 참조로 편입된 "*Monoclonal Antibodies: A manual of techniques*", H Zola (CRC Press, 1988) 및 "*Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*", J G R Hurrell (CRC Press, 1982)에 기재된 바와 같은 공지 기술에 의해 제조될 수 있다.
- [0105] 또한, 항체 프래그먼트는 예를 들어, 본 명세서에 참조로 편입된 Harlow & Lane, 1988, "*Antibodies: A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory, New York에 기재된 바와 같은 공지 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법 및 용도에 사용되는 항체 프래그먼트는 상기 항체의 단백질 가수분해 또는 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 포유류 세포(예, 차이나이즈 햄스터 난소 세포 또는 다른 단백질 발현 시스템)에서의 상기 프래그먼트를 암호하는 DNA의 발현에 의해 제조될 수 있다. 변형적으로, 항체 프래그먼트는 통상적인 방법에 의해 전체 항원의 펩신 또는 파파인 분해에 의해 획득될 수 있다.
- [0106] 바람직하게, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트가 인간 항체 또는 인간화된(humanised) 항체인 용도, 방법, 조성물 또는 시스템을 제공한다.
- [0107] 인간 치료 또는 진단에 인간화된 항체가 사용될 수 있다는 것은 통상의 기술자에게 인식될 것이다. 비-인간(예, 쥐) 항체의 인간화된 형태는 비-인간 항체로부터 유도된 최소-일부(minimal-portions)를 갖는 유전학적으로 합성된 키메라 항체 또는 항체 프래그먼트이다. 인간화된 항체는 인간 항체(리시피언트 항체)의 CDR(complementary determining regions)이 소정의 기능성을 갖는 마우스, 랫트 또는 토끼와 같은 비-인간 종(도너 항체)의 CDR의 잔기로 대체된 항체를 포함한다. 일부 예로, 인간 항체의 Fv 프래임워크 잔기는 이에 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화된 항체는 리시피언트 항체 또는 외래의 CDR 또는 프래임워크 서열 모두에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 하나, 그리고 전형적으로 2개의 가변 영역 모두를 실질적으로 포함하며, 이의 모든 또는 실질적으로 모든 CDR은 비-인간 항체의 CDR에 상응하며, 그리고 이의 모든 또는 실질적으로 모든 프래임워크 리전(framework regions)은 관련 인간 공

통 서열의 프레임워크 리전에 상응한다. 또한, 인간화된 항체는 최적으로 Fc 리번과 같이, 전형적으로 인간 항체로부터 유도되는 항체 불변 리전의 적어도 일부를 포함한다(참조, 예, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-329; Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, 본 명세서에 참조로 편입됨).

[0108] 비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 비-인간 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 종종 외래 잔기라 칭하여지며, 전형적으로 외래 가변 영역으로부터 취하여진다. 인간화는 본질적으로 인간 CDR을 이에 상응하는 설치류 CDR로 치환함으로써 수행될 수 있다(참조, 예, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536; US 4,816,567, 본 명세서에 참조로 편입됨). 따라서, 이러한 인간화된 항체는 실질적으로 무손상 인간 가변 영역 보다 적은 영역이 비-인간 종의 이에 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다. 실제로, 인간화된 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 아마도 일부 프레임워크 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위의 잔기로 치환된 인간 항체일 수 있다.

[0109] 또한, 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리를 포함하는 당해 기술분야에 알려진 다양한 기술을 이용하여 확 인될 수 있다(Hoogenboom & Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; Cole *et al.*, 1985, In: *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp.77; Boerner *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:86-95, Soderlind *et al.*, 2000, *Nat Biotechnol* 18:852-6 및 WO 98/32845, 본 명세서에 참조로 편입됨).

[0110] 적절한 항체가 얻어지면, 그 항체의 바인딩 특이성 또는 생물학적 활성과 같은 활성에 대해, 예를 들어, ELISA, 면역조직화학법, 플로우 사이토메트리, 면역침전법, 웨스턴 블롯 등에 의해 시험될 수 있다. 생물학적 활성은 특정한 특징에 대한 관독으로 다양한 어세이에서 시험될 수 있다.

[0111] 편리하게, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트는 하기 아미노산 서열(CDR 리전) 중 하나 이상을 포함한다:

[0112] FSNAWMSWVRQAPG 및/또는

[0113] AFIWYDGSNKYYADSVKGR 및/또는

[0114] ARYSGWYFDY 및/또는

[0115] CTGSSSNIGAGYDVH 및/또는

[0116] DNNNRPS 및/또는

[0117] CQSYDSSLSAWL

[0118] 변형적으로, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트는 도 15에 나타낸 가변 리전 중 하나 이상을 포함한다.

[0119] 본 명세서에 사용된 용어 '아미노산(amino acid)'은 표준 20개의 유전학적으로 암호화된 아미노산 및 (자연 'L' 형태와 비교되는) 'D' 형태의 이에 상응하는 입체 이성질체, 오메가-아미노산, 이외의 자연발생 아미노산, 이례적인 아미노산(예, α, α-2가 치환 아미노산, N-알킬 아미노산 등) 및 화학적으로 유도된 아미노산(하기 참조)을 포함한다.

- [0120] 아미노산이 '알라닌' 또는 'Ala' 또는 'A'와 같이 특이적으로 나열되는 경우, 이는 다른 언급이 없는 한 L-알라닌 및 D-알라닌 모두를 칭한다. 또한, 소정의 기능적 특성이 그 폴리펩타이드에 의해 유지되는 한, 이외의 이례적인 아미노산이 본 발명의 폴리펩타이드를 위한 적절한 성분이 될 수 있다. 나타낸 펩타이드에 대해, 적절한 곳의 각 암호화된 아미노산 잔기는 통상적인 아미노산의 통속명에 해당하는 단일 문자 지정으로 표기된다.
- [0121] 일 구현으로, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드는 L-아미노산을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0122] 본 발명의 방법 및 용도가 상기 폴리펩타이드의 변이체, 융합체 및 유도체를 포함할 뿐만 아니라, 이러한 변이체, 융합체 및 유도체가 ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는다면, 상기 변이체 또는 유도체의 융합체를 포함한다는 것이 통상의 기술자에 의해 인식될 것이다.
- [0123] 변이체는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 이용하여 당해 기술분야에 잘 알려진 단백질 합성 및 부위 특이적 돌연변이의 방법을 이용하여 제조될 수 있다(참조, 예, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edition, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 본 명세서에 참조로 편입된).
- [0124] 상기 폴리펩타이드의 '융합체(fusion)'는 어떠한 다른 폴리펩타이드에 융합된 폴리펩타이드를 포함한다. 예를 들어, 상기 폴리펩타이드는 상기 폴리펩타이드의 정제를 촉진하기 위해 글루타티온-S-트랜스퍼라아제(GST) 또는 프로틴 A와 같은 폴리펩타이드에 융합될 수 있다. 이러한 융합체의 예는 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 마찬가지로, 상기 폴리펩타이드는 His6와 같은 올리고-히스티딘 태그에 융합되거나, 잘 알려진 Myc-태그 에피토프와 같은 항체에 의해 인식되는 에피토프에 융합될 수 있다. 또한, 상기 폴리펩타이드의 어떠한 변이체 또는 유도체는 본 발명의 범위에 포함된다. ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 갖는 것과 같은 소정의 특성을 보유한 융합체(또는 이의 변이체 또는 유도체)가 바람직한 것으로 인식될 것이다.
- [0125] 상기 융합체는 본 발명의 폴리펩타이드에 소정의 특징을 부여하는 추가 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 부분은 상기 폴리펩타이드를 검출하거나 분리하는데 유용하거나 상기 폴리펩타이드의 세포 흡수를 촉진하는데 유용할 수 있다. 상기 부분은 통상의 기술자에게 잘 알려진 바와 같이, 예를 들어, 바이오틴부, 방사능부, 예를 들어, 소 형광단 또는 그린 형광 단백질(GFP) 형광단과 같은 형광부일 수 있다. 상기 부는 통상의 기술자에게 알려진 바와 같이, 예를 들어, Myc-태그와 같은 면역원성 태그일 수 있으며, 또는 통상의 기술자에게 알려진 바와 같이, 폴리펩타이드의 세포 흡수를 촉진할 수 있는 친유성 분자 또는 폴리펩타이드 영역일 수 있다.
- [0126] 상기 폴리펩타이드의 '변이체(variants)'는 보존적이거나 비보존적인 삽입, 결실 및 치환을 포함한다. 특히, 상기 폴리펩타이드의 변이체는 이러한 변화가 실질적으로 상기 폴리펩타이드의 활성을 변화시키지 않는 것을 포함한다. 특히, 상기 폴리펩타이드의 변이체는 이러한 변화가 ICAM-1에 대한 바인딩 특이성을 실질적으로 변화시키지 않는 것을 포함한다.
- [0127] 상기 폴리펩타이드 변이체는 하나 이상의 상기 특정 아미노산 서열과 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 것과 같이, 상기 주어진 하나 이상의 아미노산 서열과 적어도 75% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0128] 두 폴리펩타이드 사이의 퍼센트 서열 동일성은 예를 들어, 위스콘신 유전학 컴퓨팅 그룹 대학의 GAP 프로그램과 같은 적절한 컴퓨터 프로그램을 사용하여 검출될 수 있으며, 퍼센트 동일성은 서열이 최적으로 정렬된 폴리펩타이드에 대해 산출되는 것으로 인식될 것이다.

- [0129] 상기 정렬은 변형적으로 클러스털 W 프로그램(Thompson *et al.*, 1994, *Nuc. Acid Res.* 22:4673-4680, 본 명세서에 참조로 편입됨)을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0130] 사용되는 파라미터는 다음과 같을 수 있다:
- [0131] - 패스트 페어와이즈 정렬 파라미터: K-터플(워드) 사이즈; 1, 윈도우 사이즈; 5, 갭 페널티; 3, 탐 다이아고날의 수; 5. 평정법: x 퍼센트.
- [0132] - 다중 정렬 파라미터: 갭 오픈 페널티; 10, 갭 익스텐션 페널티; 0.05.
- [0133] - 스코어링 매트릭스: BLOSUM.
- [0134] 변형적으로, BESTFIT 프로그램이 로컬 서열 정렬을 검출하는데 사용될 수 있다.
- [0135] 본 발명의 방법 또는 용도에 사용되는 폴리펩타이드, 변이체, 융합체 또는 유도체는 변형되거나 파생된 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0136] 하나 이상의 아미노산의 화학 유도체는 결가지 작용기와의 반응에 의해 얻어질 수 있다. 이러한 유도체화 분자는 예를 들어, 유리 아미노기가 유도체화되어 아민 히드로클로라이드, p-톨루엔 설폰닐기, 카르복시벤즈옥시기, t-부틸옥시카보닐기, 클로로아세틸기 또는 포밀기를 형성하는 분자들을 포함한다. 유리 카르복실기가 유도체화되어 염, 메틸 및 에틸 에스테르 또는 다른 타입의 에스테르 및 히드라지드를 형성할 수 있다. 유리 히드록실기가 유도체화되어 O-아실 또는 O-알킬 유도체를 형성할 수 있다. 또한, 화학 유도체로서, 20개의 표준 아미노산의 자연발생 아미노산 유도체를 함유하는 펩타이드가 포함된다. 예를 들어, 4-히드록시프롤린이 프롤린에 대해 치환될 수 있으며; 5-히드록시리진이 리신에 대해 치환될 수 있으며; 3-메틸히스티딘이 히스티딘에 대해 치환될 수 있으며, 호모세린이 세린에 대해 그리고 오르니티딘이 리신에 대해 치환될 수 있다. 또한, 유도체는 필수 활성이 유지되는 한 하나 이상의 첨가 또는 결실을 함유하는 펩타이드를 포함한다. 다른 변형들로는 아미드화, 아미노 말단 아실화(예, 아세틸화 또는 티오글리콜산 아미드화), 말단 카르복실아미드화(예, 암모니아 또는 메틸아민을 이용한) 등의 말단 변형이 포함된다.
- [0137] 또한, 펩티도미메틱(peptidomimetic) 화합물이 유용할 수 있음이 통상의 기술자에게 인식될 것이다. 따라서, '폴리펩타이드(poly peptide)'는 ICAM-1을 바인딩할 수 있는 펩티도미메틱 화합물을 포함한다. 용어 '펩티도미메틱'은 치료제로서 특정 펩타이드의 형태 및 소정의 특징을 모방하는 화합물을 칭한다.
- [0138] 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드는 아미노산 잔기가 펩타이드(-CO-NH-) 결합에 의해 연결된 분자뿐만 아니라, 펩타이드 결합이 리버스된 분자를 포함한다. 이러한 레트로-인verso(retro-inverso) 펩티도미메틱은 예를 들어, Meziere *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237(본 명세서에 참조로 편입됨)에 기재된 바와 같이 당해 기술분야에 알려진 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 이러한 접근은 백본을 포함하는 변화를 함유하는 유도펩타이드를 제조하는 것을 포함하며, 측쇄의 배향은 포함하지 않는다. CO-NH 펩타이드 결합 대신에 NH-CO 결합을 함유하는 레트로-인버스 펩타이드가 단백질 가수분해에 더 저항적이다. 변형적으로, 본 발명의 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 잔기가 통상적인 아미드 결합 대신에 -y(CH₂NH)- 결합에 의해 연결된 펩티도미메틱일 수 있다.
- [0139] 다른 구현으로, 상기 펩타이드 결합은 아미노산 잔기의 탄소 원자들간의 간격을 유지하는 적절한 링커가 사용된다면 전적으로 생략될 수 있으며, 상기 링커부는 실질적으로 동일한 전하 분포를 가지며, 펩타이드 결합과 실질적으로 동일한 평면성을 갖는 것이 유리할 수 있다.

- [0140] 상기 폴리펩타이드는 외부 단백질 분해에 대한 민감도를 감소하는데 도움이 되도록 이의 N- 또는 C-말단에 편리하게 블로킹될 수 있다.
- [0141] D-아미노산 및 N-메틸 아미노산과 같이, 다양한 비암호화되거나 변형된 아미노산이 또한 포유류 펩타이드를 변형하는데 사용된다. 또한, 추정되는 생리 활성 형태는 고리화와 같은 공유 변이(covalent modification)에 의해 또는 락탐이나 다른 타입의 결합의 편입에 의해 안정화될 수 있다(참조, 예, Veber *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2636 and Thursell *et al.*, 1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111:166, 본 명세서에 참조로 편입됨).
- [0142] 다수의 합성법 중에 공통적인 사항은 일부 고리부를 펩티드계 프레임워크로 도입하는 것이다. 고리부는 펩타이드 구조의 입체 구조 공간을 제한하며, 이는 종종 특정 생물학적 리셉터에 대한 펩타이드의 특이성을 증가시킨다. 이러한 전략의 부가 장점은 펩타이드 내로 고리부를 도입하는 것은 또한 세포성 펩티다아제에 대한 감소된 민감도를 갖는 펩타이드를 형성하는 것이다.
- [0143] 따라서, 본 발명의 방법 및 용도에 유용한 예시적인 폴리펩타이드는 말단 시스테인 아미노산을 포함한다. 이러한 폴리펩타이드는 말단 시스테인 아미노산 내에 메르캅티드기의 이황화 결합 형성에 의해 헤테로테틱 고리 형태로 존재하거나, 말단 아미노산들 사이에 아미드 펩타이드 결합 형성에 의해 호모테틱 형태로 존재할 수 있다. 상기한 바와 같이, N-말단 및 C-말단 시스테인들 사이의 이황화 또는 아미드 결합을 통해 소 펩타이드들을 고리화하는 것은, 단백질 가수분해를 감소시키고, 또한 구조의 강도를 증가시킴으로써, 보다 높은 특이성의 화합물을 생성하여, 선형 펩타이드에서 다소 관찰되는 특이성 및 반감기의 문제를 회피할 수 있다. 이황화 결합에 의해 고리화된 폴리펩타이드는 단백질 가수분해에 여전히 민감할 수 있는 유리 아미노 및 카르복시-말단을 갖는 한편, N-말단 아민 및 C-말단 카르복실 사이에 아미드 결합의 형성에 의해 고리화된 펩타이드는 이러한 이유로 더 이상 유리 아미노 또는 카르복시 말단을 함유하지 않는다. 따라서, 본 발명의 펩타이드는 C-N 결합 또는 이황화 결합에 의해 연결될 수 있다.
- [0144] 본 발명은 펩타이드의 고리화 방법에 어떠한 한정을 하지 않으나, 이의 고리 구조가 어느 적절한 합성 방법에 의해 얻어질 수 있는 펩타이드를 포함한다. 따라서, 헤테로테틱 결합은 이에 한정하는 것은 아니나, 이황화, 알킬렌 또는 황화물 결합을 통한 형성을 포함할 수 있다. 이황화, 황화물 및 알킬렌 결합을 포함하는 고리 호모테틱 펩타이드 및 고리 헤테로테틱 펩타이드의 합성 방법은 본 명세서에 참조로 편입된 미국 특허 제 5,643,872호에 기재되어 있다. 고리화 방법의 다른 예는 본 명세서에 참조로 편입된 미국 특허 제 6,008,058호에 기재되어 있다.
- [0145] 환상 안정화 펩티도미메틱 화합물의 합성에 대한 다른 방법은 링-클로징 복분해(ring-closing metathesis)(RCM)이다. 이 방법은 펩타이드 전구체를 합성하는 단계 및 이를 RCM 촉매와 접촉하여 구조적으로 제한된 펩타이드를 생성하는 단계를 포함한다. 적절한 펩타이드 전구체는 2 이상의 불포화 C-C 결합을 함유할 수 있다. 상기 방법은 고상-펩타이드-합성 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 이러한 구현에서, 고형 지지체에 고정된 전구체는 RCM 촉매와 접촉하고, 그 다음 그 생성물은 고형 지지체로부터 분할되어 구조적으로 제한된 펩타이드가 얻어진다.
- [0146] D. H. Rich(Protease inhibitors, Barrett and Selveson, eds., Elsevier (1986), 본 명세서에 참조로 편입됨)에 의해 개시된 다른 방법은 효소 인히비터 디자인시 전이 상태 유사체의 적용을 통해 펩타이드 미믹(peptide mimics)을 디자인하였다. 예를 들어, 스탈린(staline)의 2차 알코올은 펩신 기질의 분리되기 쉬운 아미드 결합의 사면체 전이 상태를 모방한다.

- [0147] 정리하면, 말단 변형은 잘 알려진 바와 같이 프로테이나아제 분해에 의한 민감도를 감소시키는데 유용하며, 이에 따라 용액에서, 특히, 프로테아제가 존재할 수 있는 생물학적 유체에서 펩타이드의 반감기를 연장시키는데 유용하다. 또한, 폴리펩타이드 고리화는 고리화에 의해 형성되는 안정한 구조와 환상 펩타이드에서 관찰되는 생물학적 활성 측면에서 유용한 변형이다.
- [0148] 따라서, 일 구현으로, 본 발명의 용도, 방법, 조성물 및 시스템에 사용되는 폴리펩타이드는 환상이다. 그러나, 다른 구현으로, 상기 폴리펩타이드는 선형이다.
- [0149] 본 발명의 용도, 항체 또는 방법의 바람직한 구현으로, 상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체는 세포의 표면에 편재된 ICAM-1에 특이적으로 바인딩하고, 그 세포의 증식을 억제 및/또는 방지할 수 있다.
- [0150] 변형적인 구현으로, 상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체는 세포의 표면에 편재된 ICAM-1에 특이적으로 바인딩하고 그 세포의 세포 사멸을 유도할 수 있다.
- [0151] 변형적인 구현으로, 상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체는 세포의 표면에 편재된 ICAM-1에 특이적으로 바인딩하고 그 세포에 대해 항체-의존적 세포 독성을 유도할 수 있다.
- [0152] 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 주사가 가능한 지효성 약물 전달 시스템(sustained-release drug delivery system)을 사용하여 전달될 수 있다. 이는 주사 빈도를 줄이도록 특별히 디자인된다. 이러한 시스템의 예는 생분해성 마이크로스피어 내에 재조합 인간 성장 호르몬(rhGH)을 캡슐화한 Nutropin Depot이며, 이는 주입되면 지속된 기간에 걸쳐 서서히 rhGH를 방출한다. 바람직하게, 투여는 근육 내(i.m.) 및/또는 피하(s.c.) 및/또는 정맥 내(i.v.) 투여로 수행된다.
- [0153] 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 필요한 부위에 직접 약물을 방출하는 외과적으로 이식된 장치에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 비트라서트(vitraser)는 CMV 망막염을 치료하기 위해 눈에 직접 간시클로비르(ganciclovir)를 방출한다. 질병 부위에 이러한 독성 제제의 직접적인 적용은 약물의 현저한 전신성 부작용 없이 효과적인 치료를 달성한다.
- [0154] 또한, 전기 천공법 치료(EPT) 시스템이 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 본 발명의 약제 및 약학 조성물의 투여를 위해 이용될 수 있다. 세포에 펄스 전기장을 전달하는 장치는 세포막의 약물 투과성을 증가시켜 세포 내 약물 전달의 현저한 증가를 일으킨다.
- [0155] 또한, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 일렉트로-인코포레이션(EI)에 의해 전달될 수 있다. EI는 피부의 표면에 직경이 최대 30미크론의 소 입자가 전기 천공법에 사용된 것과 동일하거나 유사한 전기 펄스를 받을 경우에 발생한다. EI에서, 이러한 입자는 각질층을 통해 움직이며, 피부의 보다 깊은 층으로 들어간다. 상기 입자에 약물 또는 유전자가 적재되거나 코팅될 수 있으며, 또는 상기 입자는 단순히 약물이 이를 통해 들어갈 수 있는 피부에 공극을 생성하는 "발사체(bullets)"로 작용할 수 있다.
- [0156] 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제를 전달하는 변형적인 방법은 온도 감응성인 ReGel® 주사 시스템이다. 체온 미만의 온도에서, ReGel은 주사가 가능한 액체가

지만, 체온에서는 즉시 겔 저장소(gel reservoir)를 형성하며, 이는 알려진, 안전하고 생분해성의 폴리머로 서서히 침식 및 용해된다. 활성 물질은 생물 고분자 물질이 용해됨에 따라 시간이 지나면서 전달된다.

[0157] 또한, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 경구 투여될 수 있다. 이 공정은 보조-운반(co-deliver) 단백질 및 펩타이드에 대한 체내 비타민 B₁₂ 및/또는 비타민 D의 경구 섭취를 위한 자연적인 처리를 이용한다. 비타민 B₁₂ 및/또는 비타민 D 섭취 시스템을 통해, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 장벽을 통해 이동할 수 있다. 복합체는 비타민 B₁₂ 유사체들 및/또는 비타민 D 유사체들과, 그리고 상기 복합체의 비타민 B₁₂ 부분/비타민 D 부분에 고유 인자(IF)에 대한 현저한 친화도 및 상기 복합체의 활성 물질의 현저한 생물 활성 모두를 보유하는 약물 사이에 합성된다.

[0158] 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 "트로이 펩타이드(Trojan peptides)"에 의해 세포로 도입될 수 있다. 이는 전위 특성을 가지며, 원형질막을 지나 친수성 화합물을 운반할 수 있는 페너트라틴이라 불리는 폴리펩타이드 부류이다. 이 시스템은 세포질 및 핵에 올리고펩타이드를 직접 표적할 수 있도록 하며, 비-세포 타입 특이적이며 고 효율적이다(Derossi et al. (1998), Trends Cell Biol 8, 84-87).

[0159] 바람직하게, 본 발명의 약제는 활성 성분의 일일 투여량 또는 단위, 일일 부-투여량(sub-dose) 또는 이의 적절한 분획을 함유하는 단위 정량이다.

[0160] 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체 및/또는 본 발명의 약제는 활성 성분을 포함하는 약학 조성물의 형태로, 선택적으로, 무독성 유기, 또는 무기 산 또는 염기, 부가염의 형태로, 약학적으로 허용되는 투여량 형태로, 일반적으로 경구 투여되거나 어느 비경구 경로에 의해 투여될 것이다. 치료할 질병 및 환자뿐만 아니라, 투여 경로에 따라, 상기 조성물은 다양한 투여량으로 투여될 수 있다.

[0161] 인간 치료에 있어서, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 단독으로 투여될 수 있으나, 일반적으로 의도된 투여 경로 및 표준 약리학적 실행과 관련되어 선택된 적절한 약학적 부형제, 희석제 또는 담체와 함께 투여될 것이다.

[0162] 예를 들어, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 즉시 방출, 지속 방출 또는 제어 방출용으로, 향료 또는 착색제를 함유할 수 있는 정제, 캡슐, 질좌약, 엘릭시르, 용액 또는 서스펜션의 형태로 경구, 구강 또는 설하 투여될 수 있다. 또한, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 음경 해면체 주입을 통해 투여될 수 있다.

[0163] 이러한 정제는 마이크로크리스탈린 셀룰로즈, 락토즈, 소듐 시트레이트, 칼슘 카보네이트, 2염기성 칼슘 포스페이트 및 글리신과 같은 부형제, 전분(바람직하게 옥수수, 감자 또는 타피오카 전분), 소듐 전분 글리콜레이트, 크로스카멜로즈 소듐 및 특정 복합 실리케이트와 같은 붕괴제, 및 폴리비닐피롤리돈, 히드록시프로필메틸셀룰로즈(HPMC), 히드록시-프로필셀룰로즈(HPC), 수크로즈, 젤라틴 및 아카시아와 같은 과립 바인더를 함유할 수 있다. 또한, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산, 글리세릴 베헤네이트 및 탈크와 같은 윤활제가 포함될 수 있다.

[0164] 또한, 유사한 타입의 고정 조성물이 젤라틴 캡슐에 필러로서 이용될 수 있다. 이와 관련된 바람직한 부형제는

락토즈, 전분, 셀룰로즈, 유당 또는 고분자량 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 수성 서스펜션 및/또는 엘릭시르에 대해 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 용합체, 유도체 또는 변이체, 본 발명의 약제 및 약학 조성물은 다양한 감미료 또는 향료, 착색물 또는 염료와 함께, 유화제 및/또는 서스펜딩제와 함께 그리고 물, 에탄올, 프로필렌 글리콜 및 글리세린과 같은 희석제와 함께, 그리고 이들의 조합과 함께 혼합될 수 있다.

[0165] 또한, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 용합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는, 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 척주관내, 심장내, 흉골내, 두개골내, 근육내 또는 피하와 같이 비경구적으로 투여될 수 있으며, 또는 주입 기술(infusion technique)에 의해 투여될 수 있다. 이는 예를 들어, 혈액과 등장성인 용액을 형성하기에 충분한 염 또는 글루코즈와 같은 다른 물질들을 함유할 수 있는 멸균 수용액의 형태로 잘 사용된다. 상기 수용액은 필요에 따라 적절히 완충(바람직하게 pH 3 ~ 9) 되어야 한다. 멸균 조건하에서 적절한 비경구 제형의 제조는 통상의 기술자에게 잘 알려진 표준 약학 기술에 의해 용이하게 수행된다.

[0166] 비경구 투여용으로 적절한 약제 및 약학 조성물은 항산화제, 버퍼, 세균 발육 저지제 및 제형에 의도된 수용자의 혈액과 등장성을 부여하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사액; 및 서스펜딩제 및 증점 안정제(thickening agent)를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 서스펜션을 포함한다. 상기 약제 및 약학 조성물은 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 바이알과 같은 단위 투여량 또는 멀티-도즈 용기에 제공될 수 있으며, 예를 들어, 사용 직전에 물과 같은 멸균 액체 담체의 첨가만을 요구하는 동결-건조 조건에 보관될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 서스펜션이 멸균 분말, 과립 및 전술된 다양한 종류의 정제들로부터 제조될 수 있다.

[0167] 또한, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 용합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 비강내 또는 흡입에 의해 투여될 수 있으며, 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로-에탄, 1,1,1,2-테트라플루오로에탄(HFA134A3 또는 1,1,1,2,3,3,3-헵타플루오로프로판(HFA 227EA3)와 같은 하이드로플루오로알칸, 이산화탄소 또는 다른 적절한 기체와 같이 적절한 추진제를 사용하여 가압 용기, 펌프, 스프레이 또는 연무기로부터 건조 분말 흡입기 또는 에어로졸 스프레이 방식의 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우에, 투여량 단위는 칭량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 측정될 수 있다. 가압 용기, 펌프, 스프레이 또는 연무기는 예를 들어, 용매로서 에탄올과 추진제의 혼합물을 사용하여 활성 성분의 용액 또는 서스펜션을 함유할 수 있으며, 이는 예를 들어, 소르비탄 트리올레이트와 같은 윤활제를 부가적으로 함유할 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용되는 (예를 들어, 젤라틴으로 제조된) 캡슐 및 카트리지가 본 발명의 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 용합체, 유도체 또는 변이체와 락토즈 또는 전분과 같은 적절한 분말 베이스의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화될 수 있다.

[0168] 에어로졸 또는 건조 분말 제형은 바람직하게, 각 칭량된 투여량 또는 "퍼프(puff)"가 환자에게 전달될 유효량의 본 발명의 제제 또는 폴리뉴클레오타이드를 함유하도록 마련된다. 에어로졸로 투여되는 총 일일 투여량은 환자마다 달라지며, 단독으로 투여되거나, 보통 하루에 걸쳐 나누어 투여될 수 있다.

[0169] 변형적으로, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 용합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 좌약 또는 패서리의 형태로 투여될 수 있으며, 또는 로션, 용액, 크림, 겔, 연고 또는 살포제(dusting powder)의 형태로 국소적으로 적용될 수 있다. 또한, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 용합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 예를 들어, 피부 패치를 사용하여 경피 투여될 수 있다. 이는 또한 특히 눈 질환을 치료하기 위해 안구 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0170] 안과용으로, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 용합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 등장성의 pH 조절된 멸균 염수에 미분화된 서스펜션으로 또는 바람직하게 등장성의 pH 조절된 멸균 염수에 용액으로, 선택적으로 벤질알코늄 클로라이드와 같은 보존제와 함께 제형화될 수 있다. 변형적으로, 이는 바셀린과 같은 연고에 제형화될 수 있다.

- [0171] 피부에 경피 적용을 위해, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 예를 들어, 미네랄 오일, 액체 바셀린, 백색 바셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 제제, 유화 왁스(emulsifying wax) 및 물 중 하나 이상과의 혼합물에 현탁되거나 용해된 활성제를 함유하는 적절한 연고로서 제형화될 수 있다. 변형적으로, 이는 예를 들어, 미네랄 오일, 소르비탄 모노스테아레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 액체 파라핀, 폴리소르베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도데카놀, 벤질 알코올 및 물 중 하나 이상과의 혼합물에 현탁되거나 용해된 적절한 로션 또는 크림으로 제형화될 수 있다.
- [0172] 구강 내의 경피 투여에 적절한 제형은 향 베이스, 보통 수크로즈 및 아카시아 또는 트라가칸트에 활성 성분을 포함하는 로젠즈(lozenge); 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로즈 및 아카시아와 같은 비활성 베이스에 활성 성분을 포함하는 패스틸(pastille); 및 적절한 액체 담체에 활성 성분을 포함하는 구강 청결제를 포함한다.
- [0173] 일반적으로, 인간에서, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 본 발명의 약제 및 약학 조성물의 경구 또는 비경구 투여가 바람직한 경로이며, 가장 편리하다.
- [0174] 가축용으로, 상기 항체, 항원-바인딩 프래그먼트, 및/또는 이의 융합체, 유도체 또는 변이체, 및 본 발명의 약제는 일반적인 수의학 지침에 따라 적절히 허용되는 제형으로 투여되며, 수의학 외과 의사는 특정 동물에 대해 가장 적절한 투여 방법 및 경로를 결정할 것이다.
- [0175] 상기 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트, 또는 이의 변이체, 융합체 또는 유도체는 수반된 실시예에 기재된 바와 같이 제형화될 수 있다.
- [0176] 상술한 바와 같이, 본 발명의 방법 및 용도에 따라 투여될 경우, 상기 항체 및/또는 항원-바인딩 프래그먼트 및/또는 변이체, 융합체 또는 유도체는, (CD20-양성 및 CD20-음성 다발성 골수종 암세포 및 종양과 같은) 암 및/또는 종양 세포에 대해 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)의 세포사멸을 유도하고, 그리고/또는 지시할 수 있다. 또한, 상기 항체 및/또는 항원-바인딩 프래그먼트 및/또는 변이체, 융합체 또는 유도체는 가용성 세포간 부착 분자 1(sICAM-1)에 바인딩할 수 있어, 이에 따라 면역 감시로부터 혈관형성, 세포-부착 매개 약물-내성 및 종양-세포-이스케이프(tumour-cell-escape)를 억제할 수 있다.
- [0177] 하기의 실시예는 본 명세서에 기재된 예시적인 항체(BI-505로도 알려진 항체 "B11")가 본 발명의 방법 및 용도에 따라 투여될 경우 현저한 생체내 및 시험관내 항-종양(항암) 활성을 갖는 것을 입증한다. 이의 현저한 직접적인 항-골수종 활성에 부가적으로, B11은 또한 혈관형성-유도된 종양 성장을 억제하고 면역 감시로부터 종양 이스케이프에 대항하도록 작용할 수 있다.
- [0178] 본 명세서에 사용된, 단수형 "하나의(a)", "및(and)" 및 "그(the)"는 다른 언급이 없는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "항체(antibody)"에 대한 언급은 복수의 이러한 항체를 포함하며, "투여량(the dosage)"에 대한 언급은 하나 이상의 투여량 및 통상의 기술자에게 알려진 이의 당량을 포함한다.
- [0179] **실시예**
- [0180] 하기의 실시예는 본 발명의 다양한 견지들을 구현한다. 실시예에 사용된 특정 항체는 본 발명의 원리를 설명하

기 위해 제공된 것이며, 이로 한정하려는 것은 아니다.

[0181] 하기 실시예는 첨부된 도면을 참조하여 설명된다.

[0182] **실시예 1 - 본 발명에 사용된 재료 및 방법**

[0183]

[0184] *시약, 세포 및 동물*

[0185] 여러 배치의 IgG₁ B11이 CHO 세포로부터 안정하게 발현되거나 HEK293 세포에서 일시적으로 발현되었다. IgG₄ B11 및 297Q B11은 HEK293 세포에서 일시적으로 발현되었다. 대조구 항체 IgG₁CT17 또는 IgG₁FITC-8GA는 HEK293 세포에서 일시적으로 발현되었다. 항체의 내독소 수준은 LAL-아메보사이트(Amoebocyte) 시험에 의해 측정시 0.1 IU/mL 미만인 것으로 발견되었다. 리톡시맵(Roche), 보르테조밍(Janssen-Cilag), 레날리도마이드(celgene), 멜팔란(GlaxoSmithKline) 및 텍사메타손(Mylan)은 지방 약국(스웨덴의 룬드 및 프랑스의 디종)에서 구입하였다. ARH-77, RPMI-8226 및 Daudi 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)(스웨덴)으로부터 구입하였으며, NCI-H929, EJM 및 OPM-2 세포주는 DSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)(독일)로부터 구입하였다. 모든 세포들은 공급자에 의해 제시된 배지에서 유지되었다. 이중이식을 위해 세포를 수거하기 전에 세포의 대수 성장을 확인하였다. CT.17 백그라운드 상의 암컷 *scid* 마우스는 Taconic(덴마크)로부터 구입하였으며, 7-8주령에 후속적인 시험에 사용하였다. 동물 실험은 동물 실험의 윤리 지침에 따라 수행하였으며, 동물을 이용한 모든 절차는 Lund/Malmö 지방 윤리 위원회에 의해 검토 및 승인되었다.

[0186] *다발성 골수종 환자 세포 ICAM-1 발현의 분석*

[0187] 스코네 대학 병원(룬드)의 혈액학과에서 다발성 골수종 또는 관련 질병(형질 세포종, 형질 세포성 백혈병, 아밀로이드 경색 아밀로이드증)에 대해 검사받은 18명의 환자로부터 정보 동의를 받고 지방 윤리 위원회로부터 승인 받은 후에, 이들 환자로부터 얻은 골수 체액을 4개의 항체 패널 인식 형질 세포(실시예 2 참조)를 이용하여 플로우 사이토메트리로 분석하였다. 임상 데이터는 환자 차트로부터 구하였다(도 4a).

[0188] *프로그램 세포사(PCD) 어세이*

[0189] 표적 세포를 2×10^6 cells/mL 배지의 밀도로 96-웰 배양 플레이트에 시딩하였다. IgG₁ B11 또는 다른 음성 및 양성 대조구 항체의 적정 농도를 가교를 위한 항-인간 Fab 프래그먼트(Jackson ImmunoResearch)의 존재 또는 부재하에서 세포에 첨가하였다. 그 다음, 그 세포들을 5% CO₂의 습 분위기, 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 세포들을 수거하고, Annexin V-488/ Propidium Iodide(Invitrogen, Sweden)으로 염색하고 플로우 사이토미터(FACS Calibur, BD Bioscience)를 이용하여 분석하였다.

[0190] *항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)*

[0191] 인간 도너로부터 얻은 버피 코트(Blodcentralen, Lund)를 말초 혈액 단핵구 세포(PBMCs)를 분리하고, 후속적으로 NK 세포를 분리하는데 사용하였다. 간략히, 말초 혈액 성분을 LeucoSep 튜브(Greiner Bio-One)에서 Ficoll Paque PLUS(Amersham Biosciences, Sweden)를 사용하여 분리하였다. PBMC 분획을 제거하고, 아이스-콜드

DPBS(Invitrogen)에서 완전히 세정한 다음, 양성 또는 음성 NK 세포 분리 키트 및 MACS LS 컬럼(Milteny Biotec)을 이용하여 NK 세포 집단을 자기 레이블링하고 분리하였다. 획득된 NK 세포 분획의 순도를 α -CD56 항체(BD Biosciences)로 염색한 후에 플로우 사이토메트리로 분석하였다. 표적 세포를 수거하고, 얼음 상에서 60분간 각각의 항체($2\mu\text{g/mL}$)와 함께 또는 항체 없이 배지에서 배양하였다. 그 후, 세포들을 수거하고, 냉 배지에 재현탁시키고, FACS 튜브에 분배하였다. 후속적으로, 분리된 NK 세포를 ADCC 배지에 희석하고, 다양한 작용/표적 세포비로(40:1, 20:1, 5:1 및 1:1) 각각의 항체-코팅된 표적 세포와 함께 분배하였다. 모든 실험은 3회 수행하였다. 배양 완료 후에, ToPo-Pro-3 염료 및 카운팅 비드(Invitrogen)를 첨가하고, 플로우 사이토메트리를 이용하여 막 투과성에 대해 세포들을 분석하였다.

[0192] 보체-의존적 세포독성(CDC)

[0193] 표적 세포를 수거하고, 얼음 상에서 60분간 $5\mu\text{g/mL}$ 의 항체 또는 0.01 - $100\mu\text{g/mL}$ 의 적정 농도의 항체와 함께 RPMI 배지에서 배양하였다. 그 후, 세포들을 세정하고 냉 배지에 재현탁한 다음, 플로우 사이토메트리 튜브에 분배하였다. 처리는 3회 수행하였다. 정상적인 혹은 열-불활성된 인간 혈청(Sigma, Sweden)을 튜브에 첨가하고, 그 시료를 37°C 에서 2시간 배양하였다. 배양 완료 후에, ToPo-Pro-3을 $0.3\mu\text{M}$ 의 최종 농도로 첨가하고, 플로우 사이토메트리를 이용하여 막 투과성에 대해 세포들을 분석하였다.

[0194] $\text{Fc}\gamma\text{R}$ 에 대한 BI-505 아이소타입 변이체 바인딩

[0195] His-표지 인간 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 또는 마우스 $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ 는 부착성 HEK293E 세포에서 일시적으로 발현되었으며, Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 정제하고, SDS-PAGE 및/또는 Biacore를 이용하여 특성화되었다. Biacore 3000 기기를 이용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR) 측정을 수행하였다. 염소 α -인간-F(ab)'₂ F(ab)'₂ 프래그먼트(Jackson laboratories)를 표준 아민 결합법을 이용하여 CM-5 칩으로 고정하였다. IgG₁ B11, IgG₄ B11 또는 297Q B11을 각각 15 및 $60\mu\text{g/mL}$ 로 희석하고, 3분간 $10\mu\text{L/분}$ 으로 표면에 첨가하였다. His-표지 인간 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 또는 마우스 $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ 를 2:1 몰비로 α -HIS 항체(R&D Systems)와 함께 예비-배양하고, 그 다음 칩 표면에 1분간 $30\mu\text{L/분}$ 으로 첨가하였다. 각 사이클 후, 표면은 글리신 버퍼(pH 1.7)로 2회 재생되었다.

[0196] 종양 성장

[0197] 피하 이식:

[0198] 세보플루란과 산소의 혼합물로 마우스를 마취시키고, 골수 세포를 접종한 다음, 1 - 5×10^6 골수 세포를 좌측면에 $100\mu\text{L}$ 의 용량으로 피하 주사하였다. 복강내(i.p.) 주사에 의한 항체 치료는 세포 접종 후 다음 날에(예방 모델) 또는 종양이 약 100mm^3 의 크기에 도달할 때에(확립된 모델) 시작하였다. 항체는 $200\mu\text{L}$ 의 총량으로 PBS에 투여하였다. PBS 또는 아이소타입 대조구 처리는 대조구로서 사용되었다. 종양은 디지털 캘리퍼로 측정하였으며, 종양 크기는 너비² x 길이 x 0.52에 따라 산출하였다. 동물들은 종양 크기가 1.5cm의 윤리적 한계에 도달하였을 때에 희생되었다. 최대 5개월 후에 살아있는 마우스들을 희생시켰다. 대정맥으로부터 수집한 혈액 시료를 2500g에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 그 시료를 -20°C 에 보관하였다. 면역 화학 조직 검사를 위해 종양을 제거하고, 급 동결시키고, -85°C 에 보관하였다.

[0199] 다발성 골수종의 산재성 모델:

- [0200] BI-505의 항-골수종 효과를 다발성 골수종의 산재성 모델에서 조사하였다. 초기 및 진전된 다발성 골수종의 산재성 모델은 온코디자인(Oncodesign)(디종, 프랑스)에서 수행되었다. 간략히, 200 μ L의 RPMI 1640에 담긴 1×10^6 (초기) 또는 5×10^6 (진전된) ARH-77 종양 세포를 암컷 scid 마우스(D0)의 미정맥에 정맥내 주사하였다(D0). 종양 세포 주사는 마우스의 전신 조사(1.8Gy, ^{60}Co , INRA, BRETENNIERES) 후 24시간 내지 48시간에 수행하였다.
- [0201] 처리는 알케란만 D10에서 시작한 것을 제외하고, D5(RPMI-8226 모델) 또는 D7(ARG-77 모델)에서 시작하였다. BII 또는 대조구 mAb는 8주 동안 1주일에 2회 2mg/kg, 보르테조미드는 8주 동안 1주일에 1회 1mg/kg으로 정맥내 투여하고, 처리 5일 및 위시 아웃 2일로 구성된 2 사이클 동안 레날리도마이드를 2mg/kg으로 경구(p.o.) 투여하고, 8주 동안 1주일에 1회 3mg/kg으로 멜팔란을 그리고 2주 연속으로 6mg/kg으로 텍사메타손을 정맥내 주사로 투여하였다.
- [0202] 통계학적 분석
- [0203] 종양 성장 억제의 통계학적 분석은 도면의 설명에 기재한 바와 같이 던즈 다중 비교 검정(Dunn's Multiple Comparisons Test) 또는 맨 휘트니 비모수 분석으로 크루스칼-월리스 검정(Nonparametric ANOVA)을 사용하여 대조구 항체 처리군에 대해 산출되었다. 항체 매개 마우스 생존률의 통계학적 분석은 로그 순위 검정(log-rank test) 및 Graphpad Prism 소프트웨어를 사용하여 산출하였다. 통계학적 유의성은 $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ 및 $^{***}p<0.001$ 로 고려되었다.
- [0204] **실시예 2: 콤바인 디퍼렌셜 바이오패닝(combined differential biopanning) 및 프로그램 세포사 스크리닝에 의해 분리된 새로운 ICAM-1 항체는 생체내에서 CD20-발현 종양에 대해 경쟁적인 항-종양 활성을 갖는다.**
- [0205]
- [0206] 도 1에 요약한 바와 같이, 시험관내 CDR 서플(shuffled) 고유의 인간 항체 라이브러리 n-CoDeR(Biolvent)로부터 다른 종양 세포 관련 표면 리셉터를 표적하는 다발성 B 세포 림프종 프로그램 세포사(PCD)-유도 항체를 분리하기 위해, 연속 디퍼렌셜 바이오패닝 및 고 처리량 프로그램 세포사 스크리닝을 적용하였다. 분리된 항체 중에서, 이전에는 항체와 관련되지 않은 리셉터인 ICAM-1에 특이적인 항체들이 종양 PCD를 유도하는 것을 확인하였다. 항-ICAM-1 항체는 CD20을 발현하며 CD20 음성인 종양 세포주 모두에서 PCD를 유도하였으며, 이는 광범위한 치료 적용성을 나타낸다. ICAM-1에 대한 IgG B11의 높은 특이성 및 Daudi 림프종 세포를 발현하는 ICAM-1에서 이의 투여량 의존적 PCD-유도를 도 1에 나타내었다.
- [0207] PCD-유도 ICAM-1 항체의 치료 잠재력을 더욱 조사하기 위해, 2가지의 잘 특성화된 CD20-발현 B 세포 악성 세포주, ARH-77 또는 Daudi 중 하나로 이식된 면역결핍 scid 마우스를 포함하는 종양 모델에서 IgG B11의 생체내 항-종양 활성을 평가하였다(도 1, 패널 IV). 이러한 세포주는 각각, 다양한 다발성 골수종 모델(24-48) 및 비-호지킨림프종(non-Hodgkin lymphoma)(49, 50)에서 약물 효과 및 효능을 조사 및 특성화하는데 광범위하게 이용된다. 두 세포주는 임상적으로 입증된 CD20-특이적 항체 리툭시맵과 항-종양 효과 및 효능의 비교를 가능케 하는 CD20 항원을 발현한다.
- [0208] ARH-77 세포의 피하 주사는 종양 세포 주사 후 12일 및 14일 사이에 쉽게 감지될 수 있는 종양을 가진 scid 마우스에서 종양 세포의 빠른 확립 및 성장을 일으킨다. 일주일에 2회 IgG B11 20mg/kg의 투여량을 주사한 것은, 종양 세포 접종 후 1일에 시작하였으며, 이는 이종이식된 마우스에서 종양 성장을 완전히 억제하는 것으로 나타났다(도 2a, 좌측 패널). 또한, CD20-특이 양성 대조구 mAb 리툭시맵은 IgG B11과 비교하여 비록 상당히 덜 효과적이더라도 현저한 항-종양 활성을 부여하였다. 더욱이, IgG B11은 리툭시맵과 비교하여 10배 더 낮은 투여량(2mg/kg)으로 투여될 경우에도 완전한 생존을 부여하였다(도 2a 및 2b, 좌측 패널). 따라서, 이러한 공격적인 모델의 CD20 양성 B 세포 악성 종양에서, IgG B11은 리툭시맵과 비교하여 항-종양 활성 및 생존률 면에서 보

다 효과적이고 보다 강력하였다.

[0209] Daudi 비-호지킨림프종(non-Hodgkin lymphoma) 이종 이식에 대해 IgG B11의 생체 내 항-종양 활성을 조사하였다. 또한, 이러한 모델에서, IgG B11은 현저히 그리고 리톡시맵과 비교하여 동등하게 종양 성장을 억제하였으며, 종양을 가진 마우스의 생존률을 연장시켰다(도 2a 및 b, 우측 패널). IgG B11의 증가된 항-종양 활성은 리톡시맵 에피토프와 비교하여 보다 많은 수의 B11을 발현하는 종양 세포로부터 일어나지 않았다. 이와 반대로, 플로우 사이토메트리 분석은 ARH-77 및 Daudi 세포 모두가 리톡시맵 에피토프에 비해 현저히 적게 ICAM-1을 발현하였다(도 2c, 좌측 및 우측 패널). 이러한 결과는 IgG B11이 잘 확립된 두 가지의 다른 CD20-발현 종양 세포주에 대해 생체내 항-종양 활성을 갖는다는 것을 보여준다.

[0210] 그 다음, scid/ARH-77 모델 시스템을 사용하여 IgG B11 생체내 효능 및 최대 항-종양 활성을 달성하는 최소 투여량을 확립하기 위한 투여량-적정 실험을 수행하였다. IgG B11은 적정가능한 항-종양 활성을 나타내었고, 이는 시그모이드 곡선이 뒤따르며, 2mg/kg 투여량에서 피크를 나타내고, 0.2mg/kg의 투여량에서 거의 최대를 유지하였다(도 3a). 농도에 따른 마우스 혈청 항체는 실험 마지막에 ELISA에 의해 측정하였다. 그 다음, 항체 농도에 따른 생체내 최대 항-종양 활성 퍼센트 및 시험관내에서 이에 상응하는 항체 농도에서 최대 ICAM-1 리셉터 점유율 퍼센트와 종양 세포 PCD 퍼센트를 도시하였다(도 3c, 3d, 3e, 3f 및 3g). 현저히, 시험관내 종양 세포 PCD 및 생체내 항-종양 활성에서, 항체 농도와 시험관내 종양 세포 리셉터 점유율 사이에 거의 완전한 상관성이 관찰되었으며, 이는 ICAM-1이 직접적으로 세포 독성에 의존적인 것과 부합하며, 생체내 항-종양 활성의 기저를 이루는 것이다.

[0211] IgG B11의 높은 효과 및 효능은 보다 진전된 scid/ARH-77 이종 이식 모델을 제외한 유사체에서 확인되었다(도 8a). 감지가능한 ARJ-77 종양을 가진 scid 마우스를 다양한 투여량의 IgG B11, 리톡시맵 또는 대조구 항체로 처리하였다. 이러한 모델에서, 리톡시맵은 종양 성장을 감소시키는 것이 불가능하거나 동물 생존을 돕는 것이 불가능하였다($p>0.05$). 이와 대조적으로, IgG B11은, 리톡시맵-처리와 비교하여, 100배 더 낮은 투여량(0.2mg/kg)으로 투여된 경우에도 현저히 종양 성장을 억제하고 동물 생존률(도 8a)을 연장시켰다. 진전된 종양 모델에서 리톡시맵 항-종양 효과가 없는 것은 종양 회피 또는 하향 조절 항원 발현의 결과가 아니다. 실험 종결시 항체 및 대조구 처리된 마우스로부터 수거된 종양 조직의 면역조직화학 분석은, 종양이 실험 기간에 걸쳐 유사한 그리고 현저한 양의 CD20 및 ICAM-1 항체-표적 에피토프를 발현시킨 것을 보여주었다(도 9).

[0212] **실시예 3: ICAM-1 및 B11 에피토프는 다발성 골수종을 포함하는 림프증식성 질환에서 광범위하게 발현된다.**

[0213]

[0214] ICAM-1 B11 IgG의 고 효율 및 효능의 시험관내 및 생체내 항-종양 활성을 다양한 림프증식성 질환에서 ICAM-1 발현을 광범위하게 평가하였다. 우선, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 난포 세포 림프종(FCL), 맨틀 세포 림프종(MCL), 및 미만성거대 B세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma)에서 ICAM-1은 조직 마이크로 어레이 면역조직 분석에 의해 측정되었다(표 1).

[0215] 림프종에서 ICAM-1 발현

표 1

[0216] 림프종 MTA에서 ICAM-1 발현

	CLL	FCL	MCL	DLCBL
ICAM-1 발현 조직	27%(9/33)	95%(40/42)	89%(8/9)	98%(47/48)
양성 조직에서 % 양성 세포	23	56	23	81
상대적 강도 스케일 0-3	0.8	1.4	1.0	1.3

- [0217] ICAM-1은 양성 편도선 조직과 비교한 강한 강도에 대해 평균적으로 27%의 CLL, 95%의 FCL, 89%의 MCL 및 98%의 DLBCL에서 발현되었다(표 1).
- [0218] 이전 보고에는 골수종 자체에서 고 발현되며, 화학치료에 난치성인 진전된 질병 및 다발성 골수종(MM) 환자에서 상향조절되는 ICAM-1을 가진 다발성 골수종 질병 진행과 ICAM-1의 강한 연관성에 대해 기술하였다(14, 22, 51).
- [0219] 이러한 관찰에 근거하여, 다발성 골수종 환자 및 관련 질병들(형질세포종, 형질 세포성 백혈병, 아밀로이드 경쇄 아밀로이드증)에서 골수 세포에서의 ICAM-1 B11 에피토프 발현을 플로우 사이토메트리에 의해 평가하였다(도 4). 골수종 세포는 다발성 골수종 지침에서 멀티파라미터 플로우 사이토메트리상에서 European Network에 따라 CD38/CD138/CD45 및 CD56의 발현에 기초하여 확인하였다(Rawstron et al Haematologica(2008), 93, pp431-8).
- [0220] *플로우 사이토메트리 염색 패널*
- [0221] 스코네 대학 병원의 혈액학과에서 현지의 통상적인 절차에 따라 국소 마취로 장골능(iliaca crest)으로부터 골수 채취 약 5-7ml를 취하였다. 적혈구를 제조자 지침에 따라 FACSlysis(Becton Dickinson, Stockholm, Sweden)에 의해 골수 세포로부터 제거한 다음, 표 A(도 10)에 나타난 바와 같이 4개의 항체 패널로 염색하였다. 패널 4에서, Perm Fix, BD를 이용한 투과에 의해 표면 염색을 하고, 다발성 골수종 세포의 단클론성을 확인하기 위해 카파 및 람다 경쇄에 대해 내부 염색을 하였다.
- [0222] *다발성 골수종 환자의 골수에서 골수 세포의 분석*
- [0223] 염색된 골수 세포를 FACS Canto II를 이용하여 플로우 사이토메트리에 의해 분석하였다. 골수 세포를 고 발현의 CD138 및 CD38에 기초하여 모으고, 고 CD56 발현 및 CD45의 상실에 의해 추가 확인하였다. 또한, 세포내 염색을 사용하여 카파 및 람다 염색에 의한 모노클로날 발현을 확인하였다. B11 에피토프 발현은 #8, #7 및 #10 환자에 대해 각각, (+), (++) 및 (+++)으로 히스토그램(우측 포지션)에 나타난 바와 같이 분류되었다. B11 음성 세포(-)는 #8 환자의 B-세포이다(도 10b).
- [0224] *다발성 골수종을 가진 환자에서 질병 진행 중에 골수 세포에서 B11 에피토프 발현*
- [0225] 골수 형질 세포를 다발성 골수종을 가진 79세 노인의 진단시 취하였다(골수 No. 1). 치료는 주요 반응을 갖는 연속 탈리도마이드와 함께 경구용 멜팔란 및 텍사메타손 펄스(6 사이클)로 시작하였다. 그러나, 치료 마지막 후 2개월에 환자는 재발되었다(골수 No. 2). 이 시점에, 환자에게 2 사이클의 시클로포스파미드 및 텍사메타손 펄스를 주고, 그 다음 골수를 새로 평가하였다(골수 No. 3). 골수 세포에서 평균 BI-505 발현은 1차 재발 후 2배 증가하였다(히스토그램, 우측)(도 10).
- [0226] 모든 골수종 환자는 골수 세포에서 ICAM-1 B11 에피토프를 발현하였다. ICAM-1 B11 발현 수준은 일반적으로 골수 세포에서 매우 높았으며, 평균 발현 수준은 환자의 정상 B 세포에 비해 17배 더 높았다(도 4). 또한, ICAM-1 B11 에피토프는 다른 치료방법을 받은 재발한 환자에서 골수 세포상에 고 발현되는 것으로 보여진다.
- [0227] ICAM-1은 FCL 및 DLBCL을 포함하는 여러 림프 증식성 질병에서 강하게 발현되며, ICAM-1 B11 에피토프는 다발성

골수종 혈장 세포에 의해 강하게 발현되는 것으로 결론지었다.

[0228] **실시예 4: IgG B11은 생체내에서 광범위한 항-골수종 활성을 갖는다.**

[0229] 다발성 골수종에서 B11 에피토프의 고 발현 관찰, 이전에 보고된 ICAM-1과 다발성 골수종의 관련성 및 현재 이용가능한 치료에 대한 내성, 및 CD20-발현 악성 B 세포 종양에 대한 B11의 분명히 현저한 생체내 항-종양 활성에 근거하여, 4가지의 다른 잘 특성화된 다발성 골수종 세포주를 포함하는 scid/이종 이식 모델에서 IgG B11 생체내 항-골수종 활성을 평가하였다. 이러한 세포주는 골수 마커 CD38 및 CD138을 발현하지만, CD20을 발현하지 못한다. 2mg/kg의 IgG B11을 일주일에 2회 투여한 경우, ICAM-1 발현 세포주 EJM, RPMI-8226 및 NCI-H929로 이종 이식된 마우스에서 골수 종양을 각각, 98%, 96% 및 99% 감소시켰다(도 5a 및 b, $p_{EJM} < 0.000009$, $p_{RPMI-8226} < 0.0037$, $p_{NCI-H929} < 0.0002$). 이와 반대로, IgG B11은 ICAM-1 음성 세포주 OPM-2로 이종 이식된 마우스에서 종양 성장에 영향을 미치지 않았다(도 5a 및 b, $p_{OPM-2} > 0.05$). 종합하면, 이러한 시험은 IgG B11의 고 효율의 광범위한, 그리고 ICAM-1 의존적 생체내 항-골수종 활성을 입증하였다.

[0230] **실시예 5: IgG B11은 진전된 다발성 골수종의 산재성 실험 모델에서 현재 사용되는 치료법과 비교하여 증가된 생존률을 부여한다.**

[0231] scid/ARH-77의 산재성 모델은 다수의 견지에서 인간 다발성 골수종 질병 진행 및 질병 징후와 닮은 잘 확립된 실험 모델이다(33). 이 모델을 사용하여 IgG B11 항-골수종 활성을 더욱 특성화하였다(도 6a). 방사선 조사된 scid 마우스에 1×10^6 ARH-77 세포를 정맥내 주사한 경우에, 마우스 골수에서 이들의 산재성 및 확립을 일으키고, 골 용해성 골 병변 및 고칼슘혈증을 일으키는 것으로 이전에 나타났으며, 최종적으로 동물의 마비 또는 호흡 곤란을 일으키며, 이 시기에 동물을 즉시 희생시켰다.

[0232] 골수 세포 정맥내 주사 후 7일에 시작하여, 동물들에게 프로테아좀 억제제 보르테오미드("벨캐이드(Velcade)"), IgG B11, ctrl IgG 또는 염수로 4 연속 처리를 수행하였다. 종양 세포 주사 후 22일에, 대조군-처리된 동물들은 현저한 체중 감소(3일간 15% 미만) 또는 마비를 보이기 시작하였고, 희생되었다(도 6a). 대조군-처리된 마우스는 점진적으로 다발성 골수종의 증상이 발달되었고, 종양 세포 주사 후 39일 지나 사망하였다. 프로테아좀 억제제 약물 보르테오미드(벨캐이드)로 처리한 경우, 질병 개시를 미미하게 지연시켰으며, 대조군-처리군에 비해 동물 생존률을 현저히 증가시키지 못하였다($p_{BZB \text{ VS } \text{염수}} < 0.554$, $p_{BZB \text{ VS } \text{대조군 IgG}} < 0.2509$). 이와 반대로, IgG B11로 처리한 경우, 극적인 항-종양 효과를 나타내었으며, 대조군- 또는 벨캐이드-처리군에 비해 증상적인 질병 개시에 이르는 시간이 2배 걸렸으며, 평균 생존 기간을 증가시켰다($(p_{BZB \text{ VS } \text{염수}} < 0.0001, p_{BZB \text{ VS } \text{대조군 IgG}} < 0.0001)$). 이러한 p값은 처리군들 사이에 생존 동물의 종양 성장에 있어서 통계학적으로 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

[0233] 현재 사용되는 치료와 비교한 IgG B11의 항-골수종 활성을 RPMI-8226 골수 세포를 포함하는 유사한 진전 산재성 다발성 골수종 모델에서 추가 조사하였다(도 6b). 이 모델에서, IgG B11로 처리한 경우에, 보르테오미드로 처리한 경우에 비하여, 그리고 텍사메타손으로 처리한 경우에 비하여 생존률을 현저히 증가시키고, 질병 개시를 지연시켰다. 한편, 상기 보르테오미드 및 텍사메타손 모두 최대의 생체내 치료 효능을 보이지만 뚜렷한 독성을 나타내지 않는 임상적으로 관련된 투여량으로 투여되었다. 또한, 면역조절 약물 레블리마이드(revlimid)로 처리된 마우스와 비교하여 IgG B11 처리된 마우스에서 향상된 생존률을 나타내는 경향이 있었다.

[0234] 인간 세포에서 ICAM-1 수준을 조사하기 위해, 다양한 기관들로부터 얻은 세포들을 염색하고, CD38+/mCD45-/BI-505+에 대해 게이트(gate) 처리하였다. 도 6c는 CD38+/mCD45 집단에서 BI-505 양성 세포의 퍼센트 및 상기 양성 세포의 평균 형광 강도를 보여준다.

[0235] 골수종 세포에서 ICAM-1 발현의 검출

[0236] FACS 분석을 위한 기관들은 마우스 희생시 수집하였으며, 조직의 세포들은 기계적 분리 및 디스파제/콜라겐 분해효소 효소 분해(Gibco, France)에 의해 마련되었다. 세포들을 항-인간 CD38 항체(PerCP-Cy5, Becton Dickinson), 항-마우스 CD45(PE, Becton Dickinson) 및 인간 ICAM-1(BI-505 IgG1 AF647, BioInvent)으로 염색하고, 실온에서 15분간 어둠 속에서 배양하였다. 배양 후, 세포들을 2회 세정하고, 세포의 표면 형광을 버건디 대학의 플로우 사이토메트리 기관의 플로우 사이토메트리 장치(LSRII)로 분석하였다.

[0237] **실시예 6: IgG B11 생체내 및 시험관내 항-종양 활성은 Fc-의존적이며, 마우스 및 인간 Fc 감마 리셉터에 대한 바인딩과 관련이 있다.**

[0238] 종래의 연구들은 광범위한 패널의 B 세포 악성 세포주에서 IgG B11의 광범위하고 강력한 PCD-유도 특성을 입증하였다(10). 그러나, 이의 세포성 작용 기전을 참여하게 하는 능력에 대해서는 종래에 조사되지 않았다. B11 IgG의 높은 효능 및 효과적인 생체내 항-종양 활성, 및 리톡시맵을 포함하는 임상적으로 입증된 암 mAbs의 임상 및 생체내 치료 활성을 위한 Fc γ R-매개 항-종양 메커니즘의 결정적인 중요성을 고려해 볼 때(52) (53) (54), 본 발명자들은 그 다음, IgG B11 치료 활성에 대한 항체 Fc: 숙주 Fc γ R-의존적 메커니즘의 기여를 다루었다.

[0239] 이 때문에, 인간 Fc γ Rs에 대해 입증된 부분 친화성을 가지며(55), 그리고 인간 Fc γ R-의존적 항-종양 활성을 참여하게 하는 부분 능력을 갖는(56), 인간 IgG1, IgG4 및 Fc γ R-바인딩 결핍 돌연변이 IgG1(N297Q IgG1) 아이소타입 스위치 변이체를 생성하고, 이들의 Fc γ R-바인딩 특성과 관련된 각각의 생체내 치료 효과를 조사하였다. 생성된 아이소타입 스위치 변이체의 표적 항원에 대한 친화력 보유성은 재조합 또는 세포 표면 발현 표적 단백질 바인딩에 대해 거의 동일한 EC₅₀ 값을 나타냄으로써 입증되었다(도 11).

[0240] 현저히, IgG1 B11 아이소타입 스위치 변이체의 항-종양 활성은, 생체내에서 항체 매개 세포성 세포독성을 부여하는 인간 Fc γ RIIIa와 주요 뮤린 Fc γ R의 구조 및 기능적 동족체인 m Fc γ RIV에 대한 바인딩과 완전히 관련이 있었으며, IgG1_{N297Q} < IgG4 < IgG1의 순서로 증가하였다(도 7a 및 b, 상위 패널). 중요하게도, B11의 IgG₁, IgG₄ 또는 IgG₁ N_{297Q} 변이체 항체로 처리된 마우스는 실험 마지막에 유사한 혈청 항체 타이터를 가졌으며(표 2), 이는 이러한 다양한 항체 변이체들이 유사한 생체내 반감기를 갖는다는 것을 나타내며, 또한 차별적인 항-종양 활성이 약물동력학적 차이로부터 일어나지 않았음을 입증한다.

표 3

[0241] IgG1, IgG4 또는 N297Q-돌연변이로 처리된 마우스의 혈청 항체 타이터

투여량 (mg/kg)	생체내 IgG 수준(μg/mL)		
	IgG1	IgG4	N297Q-돌연변이
2	20±2.9	13±3.1	9.6±3
0.2	1.2±0.4	NDA	NDA
0.02	0.06±0.02	NDA	NDA

[0242] NDA = 이용가능한 데이터가 없음(No data available)

- [0243] 또한, 종양 조직의 면역조직화학 검사는 대조구 IgG 처리된 마우스 및 미처리된 마우스에 비해, 그리고 흥미롭 게도, 리툭시맵-처리 마우스에 비해 IgG B11 처리된 마우스에서 F4/80+ 숙주 작동 세포의 거대한 유입을 입증하 였다(도 7e). 이러한 발견은 Fc:Fc γ R-의존적 숙주 작동 세포-매개 메커니즘이 현저히 생체내에서 IgG B11 항- 종양 활성화에 기여하였음을 나타낸다.
- [0244] IgG B11 항-종양 활성화에 있어서, Fc:Fc γ R-의존적 메커니즘에 대한 역할을 확인하기 위해, 인간 표적 종양 세포 의 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC)에 대한 능력을 조사하였다. 기대한 바와 같이, IgG B11 IgG₁은 인간 Fc γ RIIIa에 바인딩하였으며, 그리고 인간 자연 살세포 작동 세포의 존재하에서 표적 종양 세포의 ADCC를 매개 하였다(도 7c). 이와 대조적으로, B11 IgG4 및 IgG1_{N297Q} 변이체는 인간 Fc γ RIIIa에 바인딩하지 않았으며, 표 적 종양 세포의 ADCC를 매개하지 않았다. 따라서, 생체내 환경과 유사한, 시험관내 IgG B11 매개 ADCC는 Fc-의 존적이며, 주요 인간 ADCC-매개 리셉터 Fc γ RIIIa에 대한 바인딩과 관련이 있었다(도 7d). 암 mAb Fc-의존적 항-종양 활성화는 Fc:Fc γ R-의존적 항-종양 메커니즘 뿐만 아니라, 소위 보체-의존적 세포독성(CDC)이라고 불리는 보체 캐스케이드(complement cascade)의 활성화로부터 일어날 수 있다. 따라서, ICAM-1 발현 종양 세포주의 패 널에서 IgG B11의 CDC 유도 능력을 조사하였다. IgG B11은 모니터링된 종양 세포주 어디에서도 CDC를 유도하지 못하였다. 이와 대조적으로, 그리고 종래에 보고된 바와 같이, 양성 대조구 리툭시맵으로 처리된 경우에는 CDC 를 효과적으로 유도하였다(57-59).
- [0245] **실시예 7: IgG B11은 시험관내에서 정상 ICAM-1 발현 세포에 대해 세포독성적이지 않다.**
- [0246] 정상적인 생리적 환경하에서, ICAM-1은 내피 세포층, 내피 세포, 섬유아세포, 케라티노사이트, 백혈구에서 뿐만 아니라 통상적인 항원 제공 세포(APC)에서 저수준으로 구성적으로 발현된다(60). 그러나, ICAM-1 발현은 여러 사이토카인 및 IFN- γ , TNF- α 를 포함하는 전-염증제(pro-inflammatory agents), 리포폴리사카라이드(LPS), 산 소 라디칼 및 외상이나 염증 반응에 반응하여 방출된 저산소증에 의해 상향조절되며, IgG B11과 같은 항-ICAM-1 항체를 이용한 치료와 관련된 안전성 문제를 일으킨다.
- [0247] 프로그램 세포사 및 악성 B 세포의 ADCC를 부여하는 IgG B11의 문헌적으로 입증된 능력 및 항체 내성에 관련된 보체 활성화에 대한 제시된 일반적인 부정적 역할(Lim et al, 2010, Haematologica 95, pp135-143)에 근거하여, ICAM-1을 발현하는 정상(형질변형되지 않은) 인간 말초혈액 B 세포 및 내피 세포에서 IgG B11의 프로그 램 세포사를 유도하는 ADCC 또는 CDC 효과를 조사하였다(도 12). HUVEC(Human Umbilical Vein Endothelial Cells) 및 HMVEC(Human Dermal Microvascular Endothelial Cell)는 현저한 ICAM-1 발현을 나타내었으며, 이는 플로우-사이토메트리 분석에 의한 검출시 IFN- γ 자극에 반응하여 더욱 상향조절되었다.
- [0248] 그러나, IgG B11은 조사된 휴면 또는 활성화된 정상 ICAM-1 발현 세포 타입 중 어디에서도 PCD를 유도하지 못하 였다(도 12). 이와 상반적으로, 그리고 예측된 바와 같이, 파클리탁셀을 이용한 내피 세포의 처리 및 양성 대 조구 항-HLA-DR 또는 항-CD20 항체를 이용한 B 세포의 처리는, 각각 현저한 내피세포 및 B 세포 프로그램 세포 사를 유도하였다. 마찬가지로, IgG B11은 HUVEC, HMVEC 또는 말초혈액 B 세포의 ADCC 또는 CDC를 부여하지 못 하였다(도 12).
- [0249] **실시예 8: IgG B11은 말초 혈액 단핵구 세포(Peripheral Blood Mononuclear Cell)(PBMC) 사이토카인 방출 또는 시험관내 T 세포 증식을 조절하지 못한다.**
- [0250] 그 다음, PBMC 사이토카인 방출 및 세포 증식에 미치는 IgG B11 영향을 평가하였다. IgG B11의 어떠한 PBMC 길 향 특성을 확인하는 기회를 최대화하기 위해, 항체가 종래에 기술된 바와 같이 극도로 가교되는 2개의 다른 항 체 코팅-프로토콜을 사용하였다(62). 어떠한 프로토콜에 의해 고정된 IgG B11은 Daudi 림프종 세포의 프로그램

세포사를 유도하였으며, 이는 고정화 후에 생물학적 활성이 유지되었으나, IgG B11은 PBMC 사이토카인 방출을 유도하지 못하였고, 고정화 프로토콜에 의해, 또는 가교제의 존재 또는 부재하에서 용액에 첨가될 경우에 세포 증식을 유도하지 못하였음을 나타낸다(도 12).

[0251] 이와 대조적으로, 그리고 예상한 바와 같이, 고정화된 양성 대조구 항-CD3 항체와 함께 PBMCs를 배양한 경우에 IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α 및 INF- γ 의 현저한 PBMC 방출을 일으켰다(도 12). 유사한 실험은 용액에 첨가된 IgG B11이 휴면 또는 리포폴리사카라이드 예비-자극된(pre-stimulated) PBMCs로부터 사이토카인 방출을 유도하지 못하거나 사이토카인 방출을 증가시키지 못하고, 세포 증식을 유도하지 못한 것으로 나타났다(도 12).

[0252] **실시예 9 - 항-ICAM-1 항체는 표준 치료에 비해 생체내에서 산재성 골수종에 우수한 효과를 가지며, ICAM-1 발현 자체는 이러한 표준 치료에 의해 영향을 받지 않는다.**

[0253] 세포주

[0254] RPMI 8226은 Pharmacell(France)로부터 구입하였으며, ARH-77은 ATCC로부터 구입하였다. 종양 세포는 가슴 분 위기(5% CO₂, 95% 공기)에서 37℃에서 서스펜션으로 성장시켰다. 두 세포주 모두에 대해 배지는 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum)이 보충된 2mM L-글루타민을 함유하는 RPMI 1640이었다. 또한, ARH-77에 대해서는 25mM HEPES, 1mM 소듐 피루베이트 및 글루코스를 4.5g/L의 최종 농도로 보충하였다. 시험관내 종양 시험을 위해, 세포들은 증식 상태에 있을 때 수거하였으며, 생존율을 0.25% 트리판 블루 엑스클루션을 이용하여 검사하였다.

[0255] 동물

[0256] 암컷 CB-17 SCID *scid/scid* 마우스(6-8주령)를 CHARLES RIVER(L'Arbresles, France) 또는 Taconic(Denmark)로부터 구입하고, 음식 및 물을 자유로이 섭취할 수 있는 SPF 시설에 수용하였다. 모든 동물 실험은 윤리 지침에 따라 수행하였다. 마우스를 실험 시작 전 최대 7일간 관찰하였다.

[0257] 산재성 RPMI-8226 생체내 모델

[0258] 10x10⁶의 RPMI 8226 종양 세포를 함유하는 200 μ l를 암컷 SCID 마우스의 미정맥에 정맥내 주사하였다. 세포 주사 전 24 내지 72시간에 마우스를 전신 조사하였다(1.8 Gy, ⁶⁰Co, BioMEP). D1에, 종양 주사 받은 마우스를 이들의 각 체중에 따라 임의 추출하였다. 모든 처리는 종양 세포 투여 후 5일에 시작하였으며, 다만 ALKERAN®은 10일에 시작하였다. 모든 처리는 10ml/kg/inj의 투여 용량으로 주사하였다. 마우스들은 다음 처리 중 하나를 받았다.

[0259] 모노클로날 항-ICAM mAb 또는 대조구 mAb는 8주 연속 일주일에 2회, 2mg/kg을 함유하는 PBS 용액에 정맥내 투여 받았다.

[0260] VELCADE®(보르테조미, 3.5mg, Janssen-Cilag)을 NaCl 0.9%에 용해한 다음, 분액하고, -20℃에 보관하였다. 1 개의 바이얼을 주사 직전에 해동하고, 폐기하였다. 마우스는 8연속주동안 일주일에 1회, 0.5, 1 또는 2mg/kg을 정맥내 투여받았다.

- [0261] Revlimid®(레날리도마이드, 5mg/capsule, Celgene) 캡슐을 DMSO에 우선 용해한 다음, 5% DMSO, 0.2% HCl 1N(Sigma), 5% Tween 80(Sigma) 및 89.8% NaCl 0.9%의 최종 농도로 희석하였다. 상기 용액을 각 처리일에 새로 준비하였다. 마우스를 처리 5일 및 위시 아웃 2일로 구성된 2사이클동안 1, 2 또는 3mg/kg으로 경구(p.o.) 투여처리하였다.
- [0262] ALKERAN®(멜팔란, 50mg, GlaxoSmithKline)을 공급된 비이클과 50mg의 ALKERAN®을 함유하는 바이얼을 혼합하여 준비한 다음, 분액하고 -20℃에 보관하였다. 각 투여 전에, 1개의 분액을 해동하고, NaCl 0.9%에 희석하고, 8주 연속 일주일에 1회, 3, 6 또는 12mg/kg으로 정맥내 주사하였다.
- [0263] Dexamethasone®(4mg/ml, Mylan)을 NaCl 0.9%에 희석하였다. 매 처리일에 새로운 워킹 용액을 제조하였다. 마우스에 2주 연속, 일주일에 3회 2, 4 및 6mg/kg/inj로 투여하였다.
- [0264]
- [0265] 종료, ICAM-1 발현
- [0266] 마우스의 건강 상태 및 행동을 매일 기록하고, 마우스의 체중을 일주일에 2회 기록하였다. 마우스들은 만일 약액질의 징후, 화합물 독성, 뒷다리 마비 또는 심한 체중 감소를 보이는 경우에 종료되었다. 종료시, 골수, 척수, 부신 및 신장을 수집하고, 종양 세포에서의 ICAM-1 발현에 대해 조사하였다. 인간 기원 세포와 무린 기원 세포를 구별하기 위해, 항-마우스 CD45 mAb가 CD45로 사용되었다. 이에 따라, MM 세포가 CD38⁺/mCD45⁻(Becton Dickinson)으로 정의되었다. 또한, 세포를 AF647 접합 항 ICAM-1 mAb로 염색한 다음, FACS LSRII에서 분석하였다. 골수는 기계적으로 단일 세포 서스펜션으로 분리하고, 부신, 신장 및 척수 세포는 기계적 분리와 디스파아제/콜라게나아제 분해(Gibco, France)의 복합을 사용하여 준비하였다. 실험 전에, 디스파아제 및 콜라게나아제 처리는 MM 세포주에 ICAM-1 수준이 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.
- [0267] 피하주사 확립된 ARH-77 생체내 모델
- [0268] 5×10^6 ARH-77 세포를 함유하는 100 μ l를 암컷 SCID 마우스의 측면에 피하주사하였다. 종양 용적을 종양 주사 후에 그리고 실험기간에 걸쳐 일주일에 3회 측정하였다. 100mm³의 평균값에 이르렀을 때(12일), 마우스들을 종양 용적에 따라 임의 추출하고, 치료를 시작하였다.
- [0269] 마우스에 항-ICAM mAb 또는 Revlimid® 또는 VELCADE®를 투여하였다.
- [0270] 대조구 마우스는 대조구 mAb를 투여받았다.
- [0271] 모노클로날 항-ICAM mAb 또는 대조구 mAb는 실험 기간에 걸쳐 일주일에 2회, 2mg/kg을 함유하는 200 μ l PBS 용액을 복강내(i.p.) 투여하였다.
- [0272] VELCADE®(보르테조미드, 3.5mg, Janssen-Cilag)를 상술한 바와 같이 준비하고, 실험 기간에 걸쳐 일주일에 2회, 0.5 또는 1mg/kg으로 200 μ l를 복강내(i.p.) 투여하였다.

- [0273] Revlimid®(레날리도마이드, 5mg/capsule, Celgene)를 상술한 바와 같이 준비하고, 실험 기간에 걸쳐 일주일에 5회, 1 또는 2mg/kg으로 200 μ l를 경구(p.o.) 투여하였다.
- [0274] 마우스의 건강 상태 및 행동을 매일 기록하였다. 마우스들은 만일 악액질의 징후, 화합물 독성, 심한 체중 감소를 보이거나 또는 종양이 직경 1.5cm의 크기에 도달한 경우에 종료되었다.
- [0275] 결과
- [0276] 산재성 MM 생체내 모델에서 항-ICAM-1의 우수한 효과
- [0277] BI-505 및 4개의 다른 표준 치료(SOC)로 처리된 산재성 이종 이식 모델(다발성 골수종 세포주 RPMI-8226)은 아 이소타입 대조군으로 처리된 그룹에 비해 BI-505 처리시 매우 향상된 생존율을 나타낸다(도 13 참조). 또한, 항 ICAM-1 mAb는 급성 독성이 아닌 투여량으로 치료한 다른 SOC 단독 치료에 비해 더 효과적이다(도 13 참조).
- [0278] 생체내 MM ICAM-1 발현은 다양한 처리에 의해 영향을 받지 않는다.
- [0279] 처리된 마우스로부터 종양 세포를 분리할 경우에, ICAM-1은 여전히 표준 치료(ALKERAN®, Revlimid®, Dexamethasone® 또는 VELCADE®)로 처리된 마우스로부터 수집된 종양 세포에서 변함없는 고 수준으로 발현된다(도 14 참조).
- [0280] 실시예 10 - 바람직한 약학 제형, 및 투여 방식과 투여량
- [0281] 본 발명의 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트는 주사가 가능한 지속-방출 약물 운반 시스템을 이용하여 전달 될 수 있다. 이는 특히 주사 빈도를 줄이도록 디자인된다. 이러한 시스템의 예는 생분해성 마이크로스피어에 재조합 인간 성장 호르몬(rhGH)이 봉지된 Nutropin Depot이며, 이는 한번 주사하면 지속된 기간에 걸쳐 서서히 rhGH를 방출한다.
- [0282] 본 발명의 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트는 필요한 부위에 직접 약물을 방출시키는 외과적으로 이식된 장치에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, Vitrasert는 CMV 망막염을 치료하기 위해 간시클로비르(ganciclovir)를 눈에 직접 방출한다. 이러한 독성제의 질병 부위로의 직접적인 적용은 약물의 현저한 전신성 부작용을 일으키지 않고 효과적인 치료를 달성한다.
- [0283] 또한, 전기 천공법 치료(EPT) 시스템이 투여를 위해 이용될 수 있다. 세포에 펄스 전장을 전달하는 장치는 세포막의 약물 투과성을 증가시켜, 세포내 약물 운반을 현저히 증가시킨다.
- [0284] 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-바인딩 프래그먼트는 일렉트로인코포레이션(electroincorporation)(EI)에 의해 운반될 수 있다. EI는 피부 표면상에 직경이 최대 30미크론인 소입자가, 전기천공에 사용된 것과 동일하거나 유사한 전기 펄스를 받게 될 때에 발생한다. EI에서, 이러한 입자는 각질층을 통해 피부의 보다 깊은 층으로 이동한다. 또한, 이 입자는 약물이나 유전자가 적재되거나 코팅될 수 있으며, 또는 단순히, 약물이 이를 통해 들어갈 수 있도록 피부내에 공극을 생성하는 "발사체(bullets)"로 작용할 수 있다.

- [0285] 다른 투여 방법은 온도 감응성인 ReGel 주사 시스템이다. 체온 미만의 온도에서, ReGel은 주사가 가능한 액체이지만, 체온에서는 즉시 겔 저장소(gel reservoir)를 형성하며, 이는 알려진, 안전하고 생분해성의 폴리머로 서서히 침식 및 용해된다. 활성 약물은 생물 고분자 물질이 용해됨에 따라 시간이 지나면서 전달된다.
- [0286] 본 발명의 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트는 "트로이 썬타이드(Trojan peptides)"에 의해 세포로 도입될 수 있다. 이는 전위 특성을 가지며, 원형질막을 지나 친수성 화합물을 운반할 수 있는 페너트라틴이라 불리는 폴리펩타이드 부류이다. 이 시스템은 세포질 및 핵에 항체 또는 이의 항원 바인딩 프래그먼트를 직접 표적할 수 있도록 하며, 비-세포 타입 특이적이며 고 효율적이다(Derossi et al. (1998), Trends Cell Biol 8, 84-87).
- [0287] 바람직하게, 본 발명의 약학 제형은 활성 성분의 일일 투여량 또는 단위, 일일 부-투여량(sub-dose) 또는 이의 적절한 분획을 함유하는 단위 정량이다.
- [0288] 본 발명의 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트는 활성 성분을 포함하는 약학 제형의 형태로, 선택적으로, 무독성 유기산, 또는 무기산 또는 염기, 부가염의 형태로, 약학적으로 허용되는 투여량 형태로, 어떠한 경구 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 치료할 질병 및 환자뿐만 아니라, 투여 경로에 따라, 상기 조성물은 다양한 투여량으로 투여될 수 있다.
- [0289] 인간 치료에 있어서, 본 발명의 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트는 단독으로 투여될 수 있으나, 일반적으로 의도된 투여 경로 및 표준 약리학적 실험과 관련하여 선택된 적절한 약학적 부형제, 희석제 또는 담체와 함께 투여될 것이다.
- [0290] 또한, 본 발명의 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트는, 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 척추관내, 심장내, 흉골내, 두개골내, 근육내 또는 피부와 같이 비경구적으로 투여될 수 있으며, 또는 주입 기술(infusion technique)에 의해 투여될 수 있다. 이는 예를 들어, 혈액과 등장성인 용액을 형성하기에 충분한 염 또는 글루코즈와 같은 다른 물질들을 함유할 수 있는 멸균 수용액의 형태로 잘 사용된다. 상기 수용액은 필요에 따라 적절히 완충(바람직하게 pH 3 ~ 9) 되어야 한다. 멸균 조건하에서 적절한 비경구 제형의 제조는 통상의 기술자에게 잘 알려진 표준 약학 기술에 의해 용이하게 수행된다.
- [0291] 비경구 투여용으로 적절한 제형은 항산화제, 버퍼, 세균 발육 저지제 및 제형에 의도된 수용자의 혈액과 등장성을 부여하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사액; 및 서스펜딩제 및 증점 안정제(thickening agent)를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 서스펜션을 포함한다. 상기 제형은 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 바이알과 같은 단위 투여량 또는 멀티-도즈 용기에 제공될 수 있으며, 예를 들어, 사용 직전에 물과 같은 멸균 액체 담체의 첨가만을 요구하는 동결-건조 조건에 보관될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 서스펜션이 멸균 분말, 과립 및 전술된 다양한 종류의 정제들로부터 제조될 수 있다.
- [0292] 일반적으로, 인간에서, 본 발명의 항체의 경구 또는 비경구 투여가 바람직한 경로이며 가장 편리하다.
- [0293] 가축용으로, 본 발명의 항체 또는 항원-바인딩 프래그먼트는 일반적인 수의학 지침에 따라 적절히 허용되는 제형으로 투여되며, 수의학 외과 의사는 특정 동물에 대해 가장 적절한 투여 방법 및 경로를 결정할 것이다.
- [0294] 본 발명의 약학 조성물의 제형은 편리하게 단위 투여량 형태로 제공될 수 있으며, 조제 분야에 잘 알려진 어느 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 하나 이상의 부성분을 구성하는 담체와 활성 성분을 결합시키는

단계를 포함한다. 일반적으로, 상기 제형은 활성 성분을 액체 담체 또는 미세하게 분할된 고형 담체 또는 상기 두 액체 및 고형 담체와 균일하게 그리고 친밀히 결합시키고, 그 다음 필요에 따라 그 제품을 성형함으로써 제조된다.

[0295] 바람직한 단위 투여 제형은 활성 성분의 일일 투여량 또는 단위, 일일 부-투여량(sub-dose) 또는 이의 적절한 분획을 함유하는 것이다.

[0296] 본 발명의 바람직한 운반 시스템은 본 발명의 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 및 항체로 침윤된 하이드로겔을 포함할 수 있으며, 이는 바람직하게 질에 삽입될 수 있는 탐폰에 운반되고, 적절한 자궁경부 숙화(cervical ripening) 또는 여성 생식기관에 대한 다른 바람직한 영향이 생성되면 철회된다.

[0297] 특히 상기한 바와 같은 성분들에 부가적으로, 본 발명의 제형은 해당 제형의 타입과 관련되어 통상적인 다른 제제들을 포함할 수 있다.

[0298] 실시예 11 - 예시적인 약학 제형

[0299] 투여할 본 발명의 항체를 단독으로 하는 것이 가능하지만, 약학 제형으로서 하나 이상의 허용되는 담체와 함께 제공하는 것이 바람직하다. 상기 담체(들)는 본 발명의 화합물과 양립가능하며, 이의 수용자에게 유해하지 않은 점에서 "허용가능(acceptable)"하여야 한다. 전형적으로, 상기 담체는 멸균 상태이며 피로젠(pyrogen)이 함유되지 않은 물 또는 염수일 것이다.

[0300] 하기 실시예는 활성 성분이 본 발명의 화합물인 본 발명에 따른 약학 제형을 설명한다.

[0301] 실시예 11A: 주사 제형

[0302]	활성 성분	0.200g
[0303]	멸균, 피로젠 프리 포스페이트 버퍼(pH 7.0)	10ml까지 채움

[0304] 활성 성분을 과반의 포스페이트 버퍼(35-40℃)에 용해한 다음, 용량을 채우고, 멸균 마이크로포어 여과를 통해 멸균 10ml 앰버 글래스 바이알(타입 1)에 담고, 멸균 마개 및 오버실로 밀봉한다.

[0305] 실시예 11B: 근육내 주사

[0306]	활성 성분	0.20g
[0307]	벤질 알코올	0.10g
[0308]	Glucofurool 75®	1.45g
[0309]	q.s. 주사용 물	3.00ml까지 채움

[0310] 활성 성분을 글리코퓨롤에 용해한다. 그 다음, 벤질 알코올을 첨가하고 용해하고, 물을 3ml까지 첨가한다. 그

다음, 그 혼합물을 멸균 마이크로포어 필터를 통해 여과하고, 멸균 3ml 글래스 바이알(타입 1)에 넣고 밀봉한다.

[0311] 실시예 11C: 정제

[0312]	활성 성분	100mg
[0313]	락토즈	200mg
[0314]	전분	50mg
[0315]	폴리비닐피롤리돈	5mg
[0316]	마그네슘 스테아레이트	4mg
[0317]		359mg

[0318] 상기 성분들을 습식 제립한 다음, 압착하여 정제를 제조한다.

[0319] 참고문헌:

[0320] 1. Weiner, L.M., Surana, R., and Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol 10:317-327.

[0321] 2. McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A.J., Link, B.K., Levy, R., Czuczman, M.S., Williams, M.E., Heyman, M.R., Bence-Bruckler, I., White, C.A., Cabanillas, F., et al. 1998. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. J Clin Oncol 16:2825-2833.

[0322] 3. Davis, T.A., White, C.A., Grillo-Lopez, A.J., Velasquez, W.S., Link, B., Maloney, D.G., Dillman, R.O., Williams, M.E., Mohrbacher, A., Weaver, R., et al. 1999. Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. J Clin Oncol 17:1851-1857.

[0323] 4. Hiddemann, W., Kneba, M., Dreyling, M., Schmitz, N., Lengfelder, E., Schmits, R., Reiser, M., Metzner, B., Harder, H., Hegewisch-Becker, S., et al. 2005. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. Blood 106:3725-3732.

[0324] 5. Herold, M., Haas, A., Srock, S., Naser, S., Al-Ali, K.H., Neubauer, A., Dolken, G., Naumann, R., Knauf, W., Freund, M., et al. 2007. Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. J Clin Oncol 25:1986-1992.

[0325] 6. Marcus, R., Imrie, K., Solal-Celigny, P., Catalano, J.V., Dmoszynska, A., Raposo, J.C., Offner, F.C., Gomez-Codina, J., Belch, A., Cunningham, D., et al. 2008. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. J Clin Oncol 26:4579-4586.

[0326] 7. Coiffier, B. 2007. Rituximab therapy in malignant lymphoma. Oncogene 26:3603-3613.

- [0327] 8. Cheson, B.D., and Leonard, J.P. 2008. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 359:613-626.
- [0328] 9. Smith, M.R. 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22:7359-7368.
- [0329] 10. Fransson, J., Tornberg, U.C., Borrebaeck, C.A., Carlsson, R., and Frendeus, B. 2006. Rapid induction of apoptosis in B-cell lymphoma by functionally isolated human antibodies. *Int J Cancer* 119:349-358.
- [0330] 11. Horst, E., Radaszkiewicz, T., Hooftman-den Otter, A., Pieters, R., van Dongen, J.J., Meijer, C.J., and Pals, S.T. 1991. Expression of the leucocyte integrin LFA-1 (CD11a/CD18) and its ligand ICAM-1 (CD54) in lymphoid malignancies is related to lineage derivation and stage of differentiation but not to tumor grade. *Leukemia* 5:848-853.
- [0331] 12. Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. 2007. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 7:585-598.
- [0332] 13. Huang, Y.W., Richardson, J.A., and Vitetta, E.S. 1995. Anti-CD54 (ICAM-1) has antitumor activity in SCID mice with human myeloma cells. *Cancer Res* 55:610-616.
- [0333] 14. Schmidmaier, R., Morsdorf, K., Baumann, P., Emmerich, B., and Meinhardt, G. 2006. Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo. *Int J Biol Markers* 21:218-222.
- [0334] 15. Johnson, J.P., Stade, B.G., Hupke, U., Holzmann, B., and Riethmuller, G. 1988. The melanoma progression-associated antigen P3.58 is identical to the intercellular adhesion molecule, ICAM-1. *Immunobiology* 178:275-284.
- [0335] 16. Johnson, J.P., Lehmann, J.M., Stade, B.G., Rothbacher, U., Sers, C., and Riethmuller, G. 1989. Functional aspects of three molecules associated with metastasis development in human malignant melanoma. *Invasion Metastasis* 9:338-350.
- [0336] 17. Grothey, A., Heistermann, P., Philippou, S., and Voigtmann, R. 1998. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in patients with non-small-cell lung cancer: correlation with histological expression of ICAM-1 and tumour stage. *Br J Cancer* 77:801-807.
- [0337] 18. Maruo, Y., Gochi, A., Kaihara, A., Shimamura, H., Yamada, T., Tanaka, N., and Orita, K. 2002. ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer. *Int J Cancer* 100:486-490.
- [0338] 19. Roche, Y., Pasquier, D., Rambeaud, J.J., Seigneurin, D., and Duperray, A. 2003. Fibrinogen mediates bladder cancer cell migration in an ICAM-1-dependent pathway. *Thromb Haemost* 89:1089-1097.
- [0339] 20. Rosette, C., Roth, R.B., Oeth, P., Braun, A., Kammerer, S., Ekblom, J., and Denissenko, M.F. 2005. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 26:943-950.
- [0340] 21. Aalinkeel, R., Nair, M.P.N., Sufrin, G., Mahajan, S.D., Chadha, K.C., Chawda, R.P., and Schwartz, S.A. 2004. Gene Expression of Angiogenic Factors Correlates with Metastatic Potential of Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 64:5311-5321.
- [0341] 22. Migkou, M., Terpos, E., Christoulas, M., Gavriatopoulou, M., Boutsikas, M., Gkotsamanidou, M., Iakovaki, M., Kastiritis, M., Papatheodorou, M., and Dimopoulos, M.A. 2009. Increased levels of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) and Inter-Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Correlate with Advanced Disease Features and Poor Survival in Newly Diagnosed Patients with Multiple Myeloma. Reduction Post-Bortezomib- and Lenalidomide-Based Regimens In 51st ASH annual meeting and exposition. New Orleans, LA.

- [0342] 23. Kapoor, P., Greipp, P.T., Morice, W.G., Rajkumar, S.V., Witzig, T.E., and Greipp, P.R. 2008. Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 141:135-148.
- [0343] 24. Tai, Y.-T., Catley, L.P., Mitsiades, C.S., Burger, R., Podar, K., Shringpaure, R., Hideshima, T., Chauhan, D., Hamasaki, M., Ishitsuka, K., et al. 2004. Mechanisms by which SGN-40, a Humanized Anti-CD40 Antibody, Induces Cytotoxicity in Human Multiple Myeloma Cells: Clinical Implications. *Cancer Res* 64:2846-2852.
- [0344] 25. Treon, S.P., Pilarski, L.M., Belch, A.R., Kelliher, A., Preffer, F.I., Shima, Y., Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., Szczepek, A.J., Ellman, L., et al. 2002. CD20-directed serotherapy in patients with multiple myeloma: biologic considerations and therapeutic applications. *J Immunother* 25:72-81.
- [0345] 26. Mitsiades, C.S., Treon, S.P., Mitsiades, N., Shima, Y., Richardson, P., Schlossman, R., Hideshima, T., and Anderson, K.C. 2001. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 98:795-804.
- [0346] 27. Treon, S.P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Young, G., Doss, D., Schlossman, R., and Anderson, K.C. 2001. Tumor Cell Expression of CD59 Is Associated With Resistance to CD20 Serotherapy in Patients With B-Cell Malignancies. *J Immunother* 24:263-271.
- [0347] 28. Ralph, P. 1985. The human B-cell lineage cell line ARH-77. *Cancer* 56:2544-2545.
- [0348] 29. Huang, Y.W., Richardson, J.A., Tong, A.W., Zhang, B.Q., Stone, M.J., and Vitetta, E.S. 1993. Disseminated growth of a human multiple myeloma cell line in mice with severe combined immunodeficiency disease. *Cancer Res* 53:1392-1396.
- [0349] 30. Tong, A.W., Huang, Y.W., Zhang, B.Q., Netto, G., Vitetta, E.S., and Stone, M.J. 1993. Heterotransplantation of human multiple myeloma cell lines in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Anticancer Res* 13:593-597.
- [0350] 31. Lokhorst, H.M., Lamme, T., de Smet, M., Klein, S., de Weger, R.A., van Oers, R., and Bloem, A.C. 1994. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood* 84:2269-2277.
- [0351] 32. Tong, A.W., Zhang, B.Q., Mues, G., Solano, M., Hanson, T., and Stone, M.J. 1994. Anti-CD40 antibody binding modulates human multiple myeloma clonogenicity in vitro. *Blood* 84:3026-3033.
- [0352] 33. Alsina, M., Boyce, B.F., Mundy, G.R., and Roodman, G.D. 1995. An in vivo model of human multiple myeloma bone disease. *Stem Cells* 13 Suppl 2:48-50.
- [0353] 34. Bellamy, W.T., Mendibles, P., Bontje, P., Thompson, F., Richter, L., Weinstein, R.S., and Grogan, T.M. 1996. Development of an orthotopic SCID mouse-human tumor xenograft model displaying the multidrug-resistant phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 37:305-316.
- [0354] 35. Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T.A., and Anderson, K.C. 1996. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87:1104-1112.
- [0355] 36. Urashima, M., Chen, B.P., Chen, S., Pinkus, G.S., Bronson, R.T., Deder, D.A., Hoshi, Y., Teoh, G., Ogata, A., Treon, S.P., et al. 1997. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. *Blood* 90:754-765.
- [0356] 37. Kobune, M., Chiba, H., Kato, J., Kato, K., Nakamura, K., Kawano, Y., Takada, K., Takimoto, R., Takayama, T., Hamada, H., et al. 2007. Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. *Mol Cancer Ther* 6:1774-1784.
- [0357] 38. Nadav, L., Katz, B.Z., Baron, S., Cohen, N., Naparstek, E., and Geiger, B. 2006. The generation and regulation of functional diversity of malignant plasma cells. *Cancer Res* 66:8608-8616.
- [0358] 39. Kawai, S., Yoshimura, Y., Iida, S., Kinoshita, Y., Koishihara, Y., Ozaki, S., Matsumoto, T.,

Kosaka, M., and Yamada-Okabe, H. 2006. Antitumor activity of humanized monoclonal antibody against HM1.24 antigen in human myeloma xenograft models. *Oncol Rep* 15:361-367.

- [0359] 40. Ural, A.U., Yilmaz, M.I., Avcu, F., Pekel, A., Zerman, M., Nevruz, O., Sengul, A., and Yalcin, A. 2003. The bisphosphonate zoledronic acid induces cytotoxicity in human myeloma cell lines with enhancing effects of dexamethasone and thalidomide. *Int J Hematol* 78:443-449.
- [0360] 41. Drucker, L., Uziel, O., Tohami, T., Shapiro, H., Radnay, J., Yarkoni, S., Lahav, M., and Lishner, M. 2003. Thalidomide down-regulates transcript levels of GC-rich promoter genes in multiple myeloma. *Mol Pharmacol* 64:415-420.
- [0361] 42. Choi, S.J., Oba, T., Callander, N.S., Jelinek, D.F., and Roodman, G.D. 2003. AML-1A and AML-1B regulation of MIP-1alpha expression in multiple myeloma. *Blood* 101:3778-3783.
- [0362] 43. Tian, J.Y., Hu, W.X., Tian, E.M., Shi, Y.W., Shen, Q.X., Tang, L.J., and Jiang, Y.S. 2003. Cloning and sequence analysis of tumor-associated gene hMMTAG2 from human multiple myeloma cell line ARH-77. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 35:143-148.
- [0363] 44. Tong, A.W., Seamour, B., Chen, J., Su, D., Ordóñez, G., Frase, L., Netto, G., and Stone, M.J. 2000. CD40 ligand-induced apoptosis is Fas-independent in human multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma* 36:543-558.
- [0364] 45. Feinman, R., Koury, J., Thames, M., Barlogie, B., Epstein, J., and Siegel, D.S. 1999. Role of NF-kappaB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2. *Blood* 93:3044-3052.
- [0365] 46. Thomas, X., Anglaret, B., Magaud, J.P., Epstein, J., and Archimbaud, E. 1998. Interdependence between cytokines and cell adhesion molecules to induce interleukin-6 production by stromal cells in myeloma. *Leuk Lymphoma* 32:107-119.
- [0366] 47. Roodman, G.D. 1997. Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer* 80:1557-1563.
- [0367] 48. Ozaki, S., Kosaka, M., Wakatsuki, S., Abe, M., Koishihara, Y., and Matsumoto, T. 1997. Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24. *Blood* 90:3179-3186.
- [0368] 49. Lopes de Menezes, D.E., Denis-Mize, K., Tang, Y., Ye, H., Kunich, J.C., Garrett, E.N., Peng, J., Cousens, L.S., Gelb, A.B., Heise, C., et al. 2007. Recombinant interleukin-2 significantly augments activity of rituximab in human tumor xenograft models of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Immunother* (1997) 30:64-74.
- [0369] 50. de Bont, E.S., Guikema, J.E., Scherpen, F., Meeuwssen, T., Kamps, W.A., Vellenga, E., and Bos, N.A. 2001. Mobilized human CD34+ hematopoietic stem cells enhance tumor growth in a nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mouse model of human non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 61:7654-7659.
- [0370] 51. Sampaio, M.S., Vettore, A.L., Yamamoto, M., Chauffaille Mde, L., Zago, M.A., and Colleoni, G.W. 2009. Expression of eight genes of nuclear factor-kappa B pathway in multiple myeloma using bone marrow aspirates obtained at diagnosis. *Histol Histopathol* 24:991-997.
- [0371] 52. Weng, W.K., and Levy, R. 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21:3940-3947.
- [0372] 53. Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., et al. 2008. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26:1789-1796.

- [0373] 54. Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443-446.
- [0374] 55. Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daeron, M. 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113:3716-3725.
- [0375] 56. Carter, P.J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6:343-357.
- [0376] 57. Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W., French, R.R., and Glennie, M.J. 2003. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 101:1045-1052.
- [0377] 58. Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.P., Jacob, M.C., Sotto, J.J., Leroux, D., Bensa, J.C., and Plumas, J. 2003. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101:949-954.
- [0378] 59. Cragg, M.S., and Glennie, M.J. 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103:2738-2743.
- [0379] 60. Smith, M.E., and Thomas, J.A. 1990. Cellular expression of lymphocyte function associated antigens and the intercellular adhesion molecule-1 in normal tissue. *J Clin Pathol* 43:893-900.
- [0380] 61. Roebuck, K.A., and Finnegan, A. 1999. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 66:876-888.
- [0381] 62. Stebbings, R., Findlay, L., Edwards, C., Eastwood, D., Bird, C., North, D., Mistry, Y., Dilger, P., Liefoghe, E., Cludts, I., et al. 2007. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol* 179:3325-3331.
- [0382] 63. Davis, T.A., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., McLaughlin, P., Czuczman, M.S., Link, B.K., Maloney, D.G., Weaver, R.L., Rosenberg, J., and Levy, R. 2000. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol* 18:3135-3143.
- [0383] 64. Kyle, R.A., and Rajkumar, S.V. 2004. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 351:1860-1873.
- [0384] 65. Zhang, W., Gordon, M., Schultheis, A.M., Yang, D.Y., Nagashima, F., Azuma, M., Chang, H.M., Borucka, E., Lurje, G., Sherrod, A.E., et al. 2007. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 25:3712-3718.
- [0385] 66. Lejeune, J., Thibault, G., Ternant, D., Cartron, G., Watier, H., and Ohresser, M. 2008. Evidence for linkage disequilibrium between Fcγ RIIa-V158F and Fcγ RIIa-H131R polymorphisms in white patients, and for an Fcγ RIIa-restricted influence on the response to therapeutic antibodies. *J Clin Oncol* 26:5489-5491; author reply 5491-5482.
- [0386] 67. Bibeau, F., Lopez-Crapez, E., Di Fiore, F., Thezenas, S., Ychou, M., Blanchard, F., Lamy, A., Penault-Llorca, F., Frebourg, T., Michel, P., et al. 2009. Impact of Fc{γ}RIIa-Fc{γ}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol* 27:1122-1129.
- [0387] 68. Schmidmaier, R., Baumann, P., Simsek, M., Dayyani, F., Emmerich, B., and Meinhardt, G. 2004. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood* 104:1825-1832.
- [0388] 69. Urashima, M., Chauhan, D., Hatziyanni, M., Ogata, A., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., and Anderson, K.C. 1996. CD40 ligand triggers interleukin-6 mediated B cell differentiation. *Leuk Res*

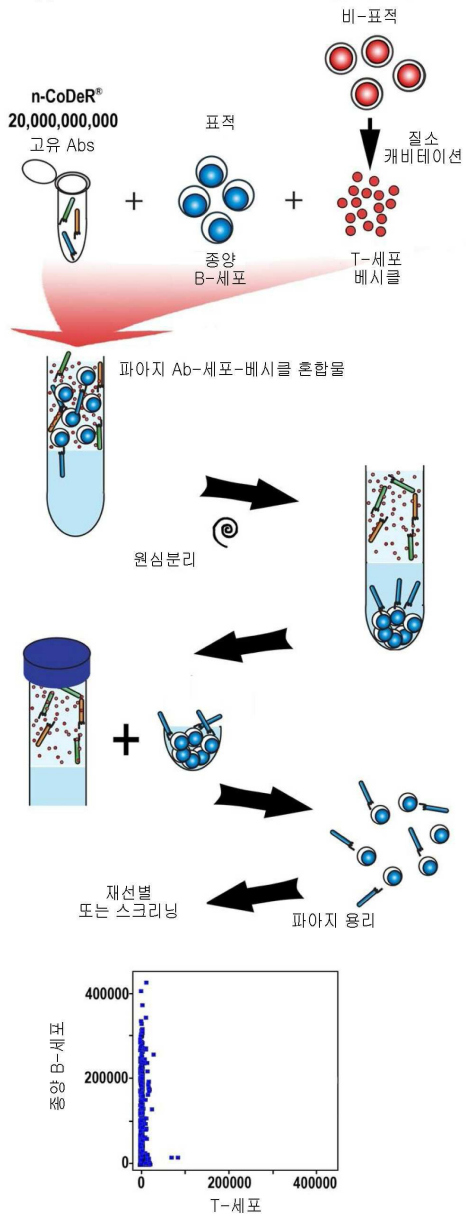
20:507-515.

- [0389] 70. Yaccoby, S., Barlogie, B., and Epstein, J. 1998. Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations. *Blood* 92:2908-2913.
- [0390] 71. Yaccoby, S., Wezeman, M.J., Henderson, A., Cottler-Fox, M., Yi, Q., Barlogie, B., and Epstein, J. 2004. Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer Res* 64:2016-2023.
- [0391] 72. Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Richardson, P.G., Hideshima, T., Munshi, N.C., Treon, S.P., and Anderson, K.C. 2002. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* 99:4525-4530.
- [0392] 73. Chauhan, D., Pandey, P., Hideshima, T., Treon, S., Raje, N., Davies, F.E., Shima, Y., Tai, Y.T., Rosen, S., Avraham, S., et al. 2000. SHP2 mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 275:27845-27850.
- [0393] 74. Hideshima, T., Chauhan, D., Shima, Y., Raje, N., Davies, F.E., Tai, Y.T., Treon, S.P., Lin, B., Schlossman, R.L., Richardson, P., et al. 2000. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood* 96:2943-2950.
- [0394] 75. Schneider, D., Berrouscht, J., Brandt, T., Hacke, W., Ferbert, A., Norris, S.H., Polmar, S.H., and Schafer, E. 1998. Safety, pharmacokinetics and biological activity of enlimomab (anti-ICAM-1 antibody): an open-label, dose escalation study in patients hospitalized for acute stroke. *Eur Neurol* 40:78-83.
- [0395] 76. Salmela, K., Wramner, L., Ekberg, H., Hauser, I., Bentsdal, O., Lins, L.E., Isoniemi, H., Backman, L., Persson, N., Neumayer, H.H., et al. 1999. A randomized multicenter trial of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab) for the prevention of acute rejection and delayed onset of graft function in cadaveric renal transplantation: a report of the European Anti-ICAM-1 Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 67:729-736.
- [0396] 77. Mileski, W.J., Burkhart, D., Hunt, J.L., Kagan, R.J., Saffle, J.R., Herndon, D.N., Heimbach, D.M., Luteran, A., Yurt, R.W., Goodwin, C.W., et al. 2003. Clinical effects of inhibiting leukocyte adhesion with monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 (enlimomab) in the treatment of partial-thickness burn injury. *J Trauma* 54:950-958.
- [0397] 78. Kavanaugh, A.F., Davis, L.S., Nichols, L.A., Norris, S.H., Rothlein, R., Scharschmidt, L.A., and Lipsky, P.E. 1994. Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum* 37:992-999.
- [0398] 79. Kavanaugh, A.F., Davis, L.S., Jain, R.I., Nichols, L.A., Norris, S.H., and Lipsky, P.E. 1996. A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23:1338-1344.
- [0399] 80. Kavanaugh, A.F., Schulze-Koops, H., Davis, L.S., and Lipsky, P.E. 1997. Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecule 1 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum* 40:849-853.

도면

도면1a

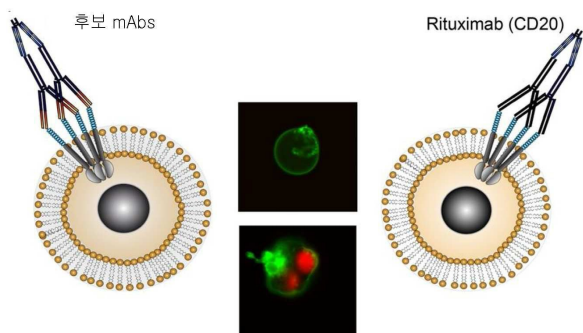
(I)



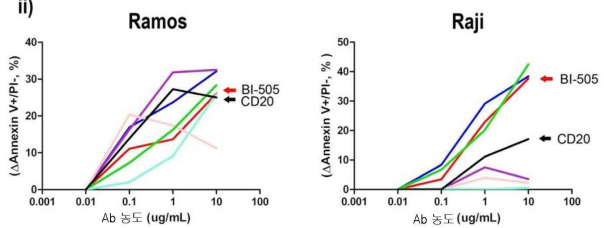
도면1b

(II)

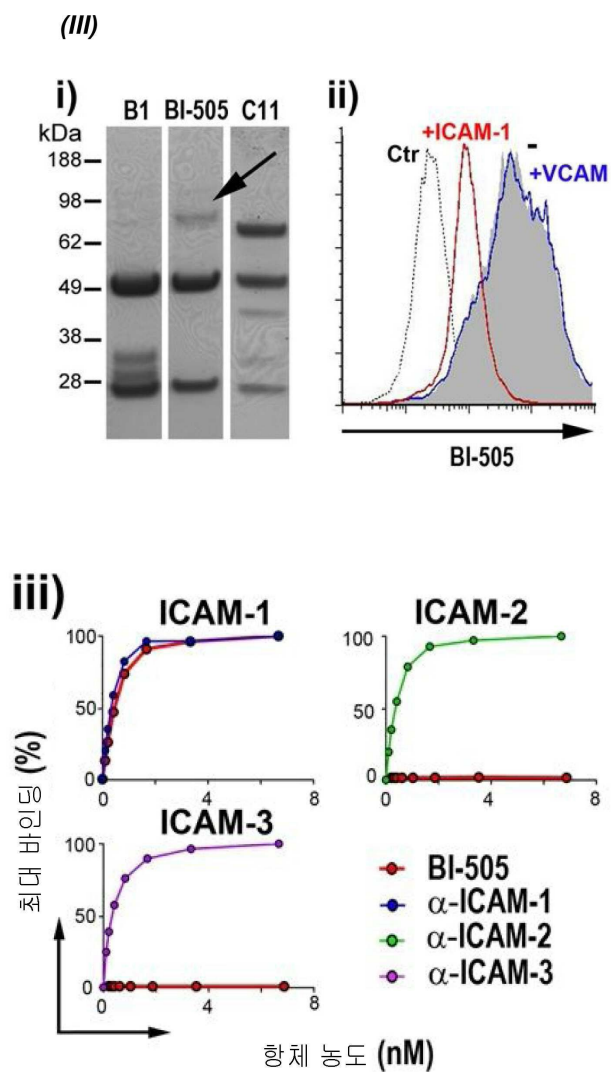
i)



ii)

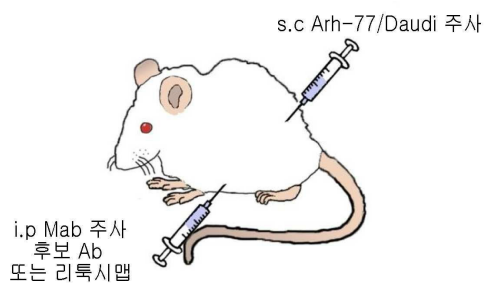


도면1c

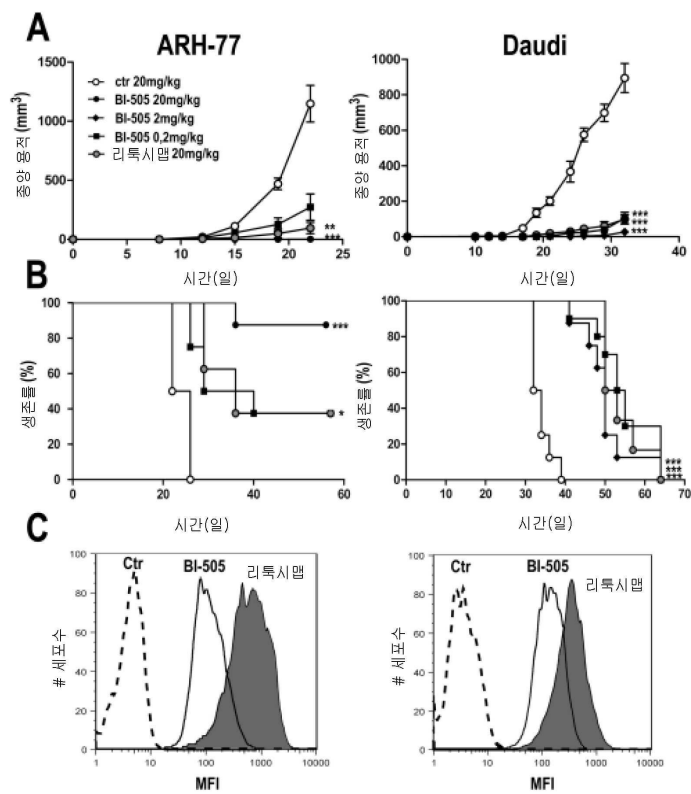


도면1d

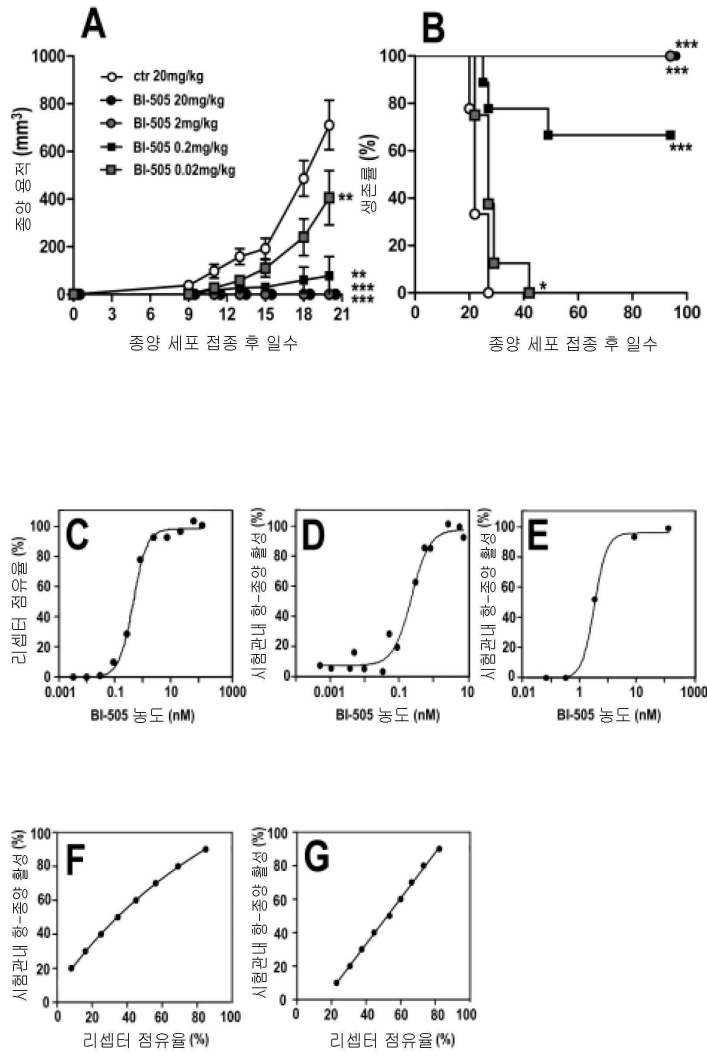
(IV)



도면2



도면3

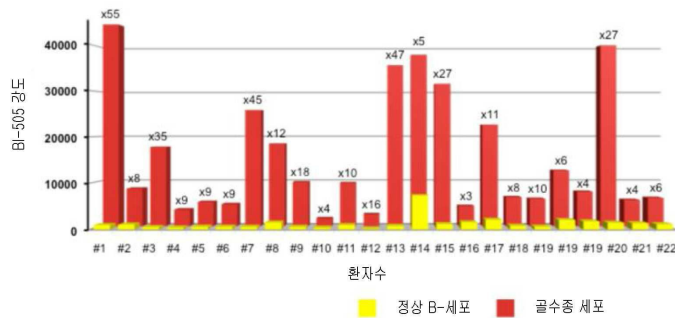


도면4

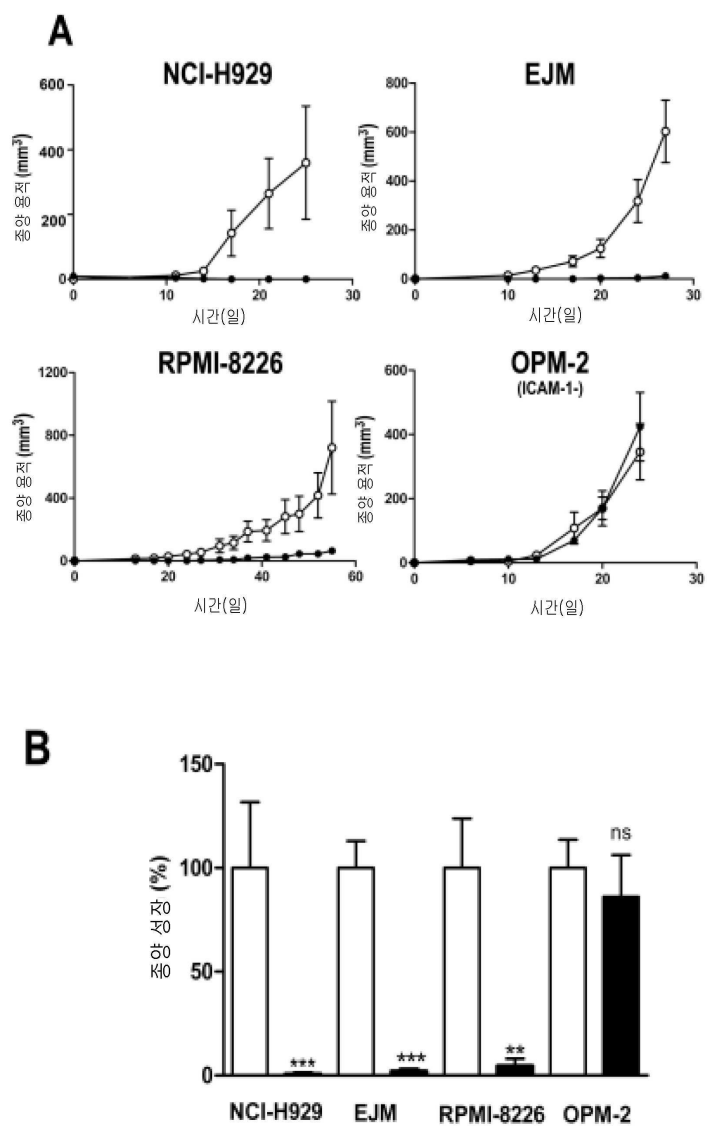
A

No.	나이	성별	Ig	M (g/L)	골 파괴	형질세포 morph	세포 (%) FACS	BI-505	ISS	T	진단
#1	38	M	G	10	0	14	2	+++	I	0	MM
#2	46	M	G	38	0	34	20	+++	II	0	MM
#3	53	F	G	14	>10	6	22	+++/>++	I	0	MM
#4	54	M	-	0	3	22	5	+++	III	2	비분비성 MM
#5	59	M	G	32	>10	29	7	++	I	0	MM
#6	60	F	G	4	3	2	0.1	+++	II	1	MM
#7	60	F	A	26	1	10	2	+++	I	0	MM
#8	61	M	G	28	0	23	9	+++	II	0	MM
#9	62	M	G	69	>10	30	10	++	II	0	MM
#10	62	F	G	70	>10	80	35	+	III	1	MM
#11	68	M	A	36	>10	60	6	+++	I	0	MM
#12	69	M	-	-	3	50	2	+++/>+	I	1	비분비성 MM
#13	71	M	G	26	0	30	11	+++	I	0	MM
#14	72	M	G	13	0	29	10	+++	I	0	MM
#15	74	M	G	20	0	23	7	+++	I	0	MM
#16	75	M	A	40	0	78	77	++	II	0	MM
#17	77	M	G	45	0	34	13	+++	II	0	MM
#18	79	F	G	23	0	16	6	+++	I	0	MM
#19	79	M	G	24	7	50	24	+++	III	0	MM
#19	79	M	G	3	ND	ND	5	+++		1	MM
#19	80	M	G	3	ND	16	6	+++		2	MM
#20	82	M	A	29	0	44	20	+++	III	0	MM
#21	83	F	G	39	0	89	64	+++	III	0	MM
#22	84	M	A	17	0	38	22	+++	III	0	MM
#23	61	M	A	7	2	24	15	++		0	AL
#24	64	F	-	-	-	6	0.3	+++		0	AL
#25	72	F	-	-	0			+++		0	LCDD/MM
#26	61	F	A	42	99	80	78	+++		4	형질세포성 백혈병
#27	75	M	G	18	>10	8	30	+		4	형질세포성 백혈병
#28	52	M	G	1	1	5	0.4	+++		1	PC
#29	60	F	G	4	1	2	0.1	+++		1	PC

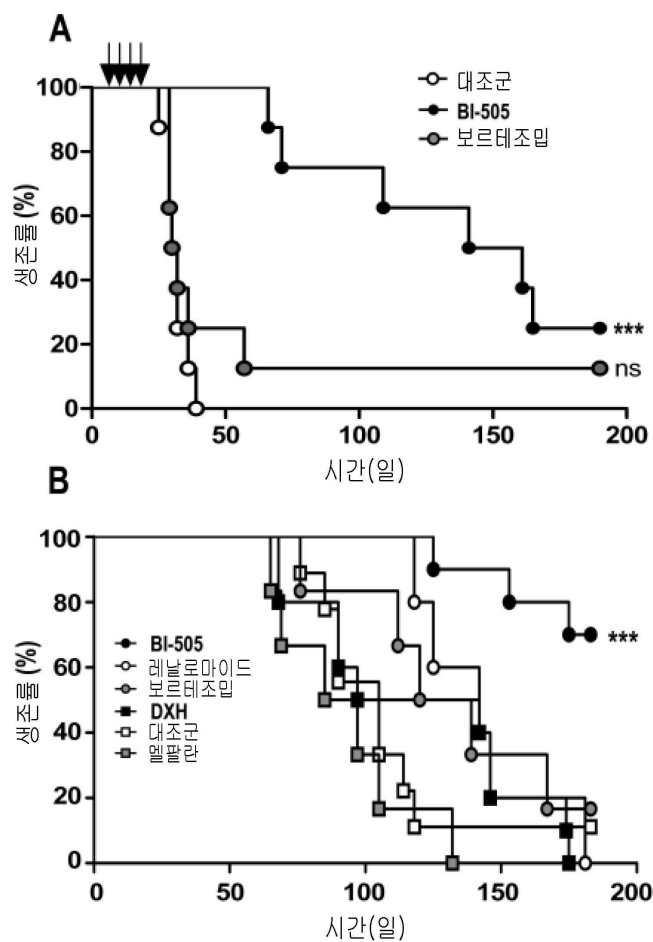
B



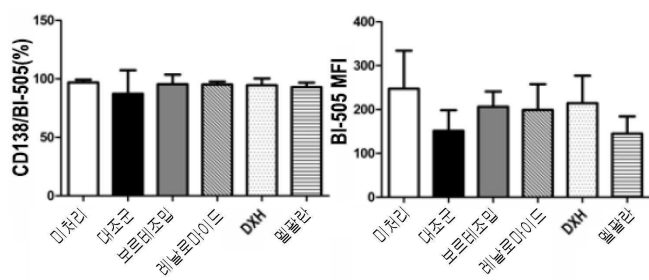
도면5



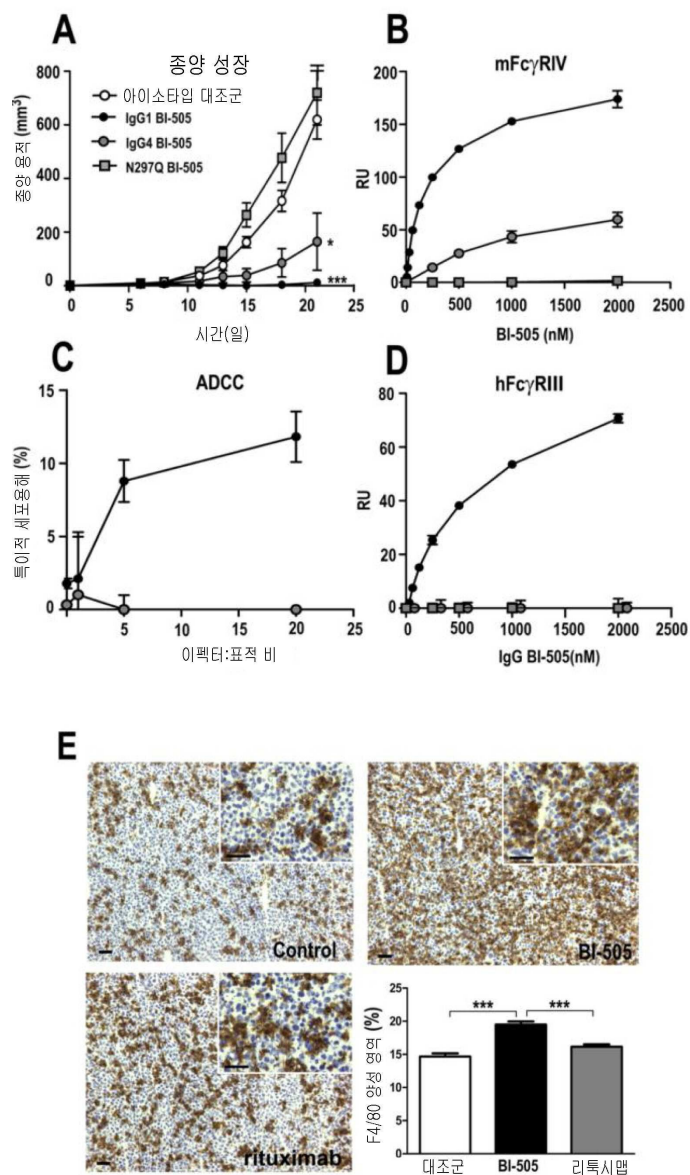
도면6a



도면6b



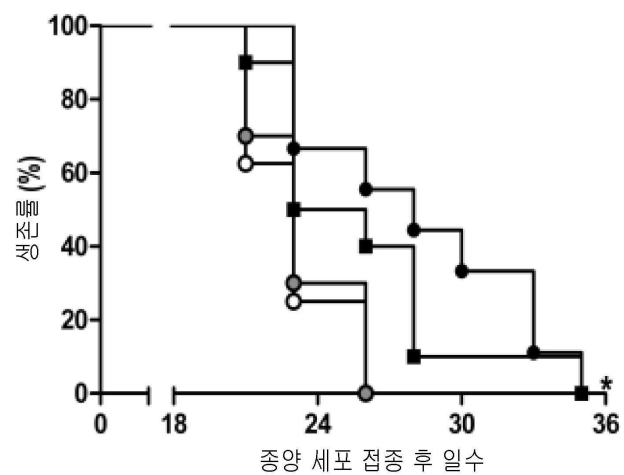
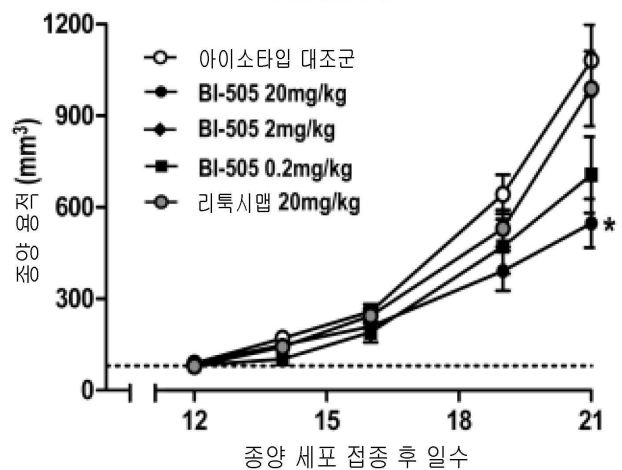
도면7



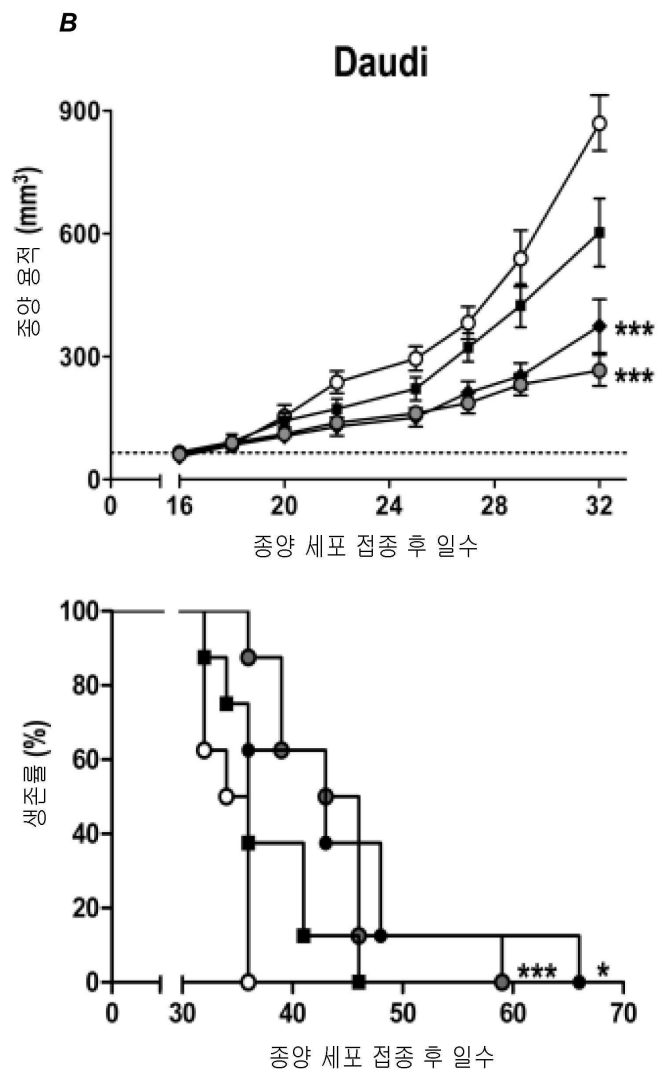
도면8a

A

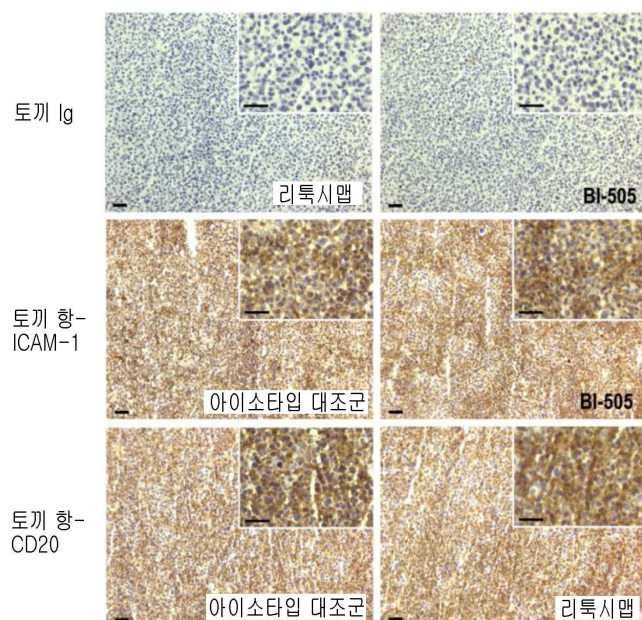
ARH-77



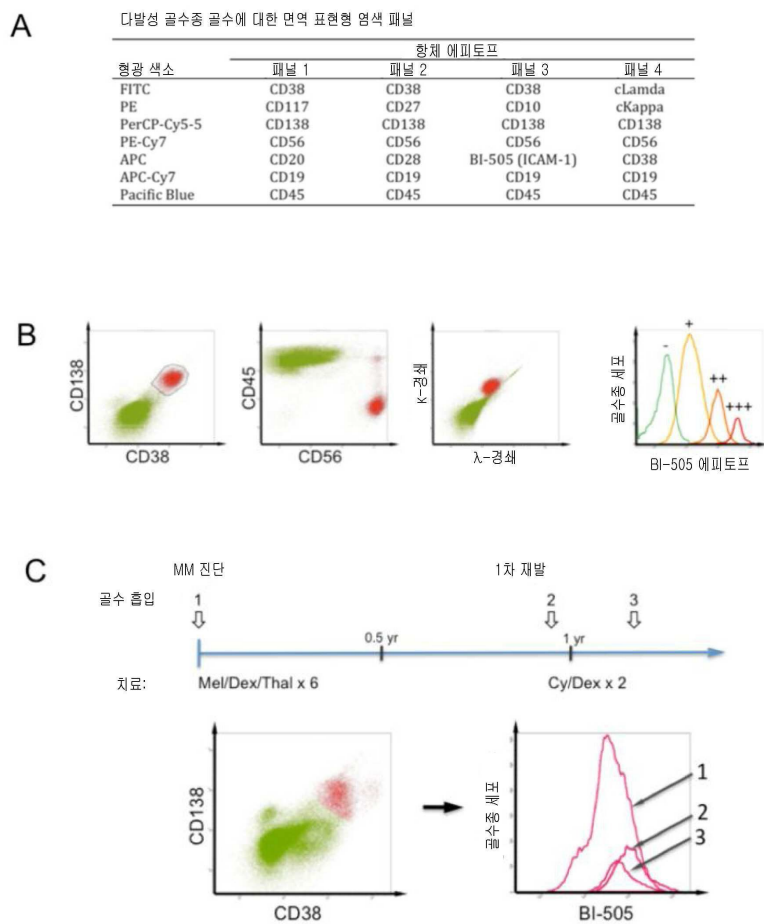
도면8b



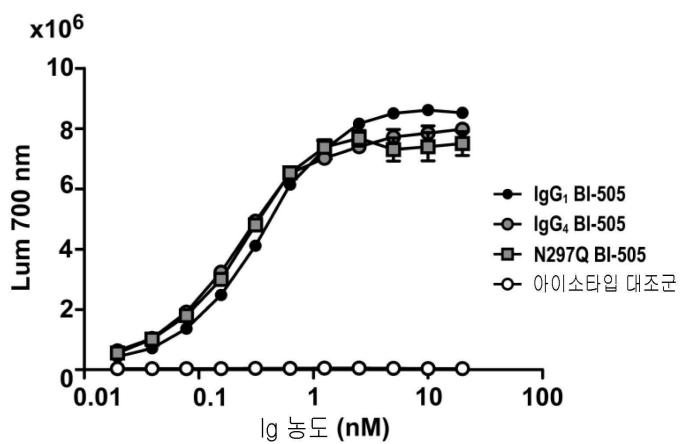
도면9



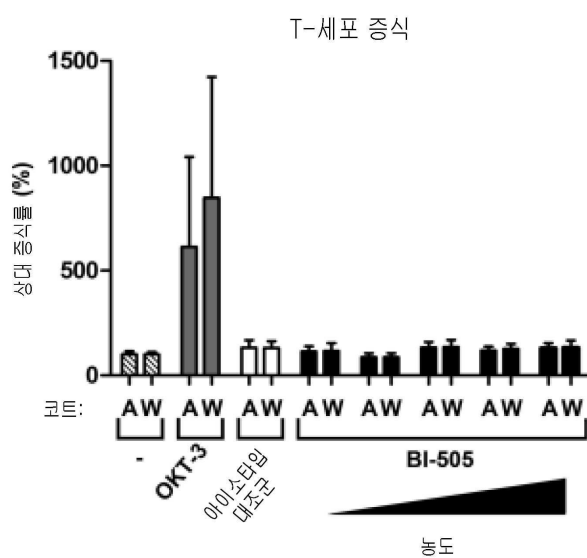
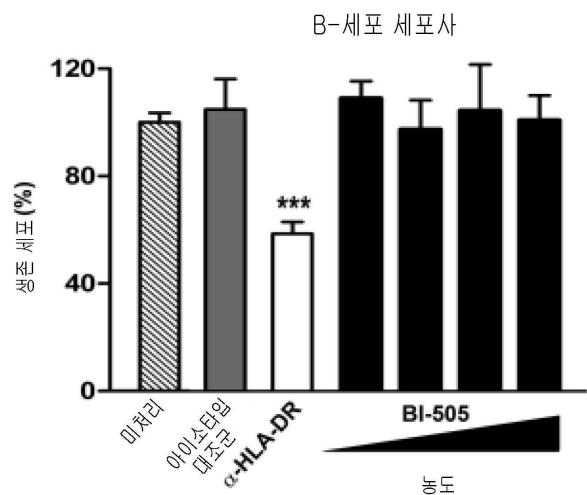
도면10



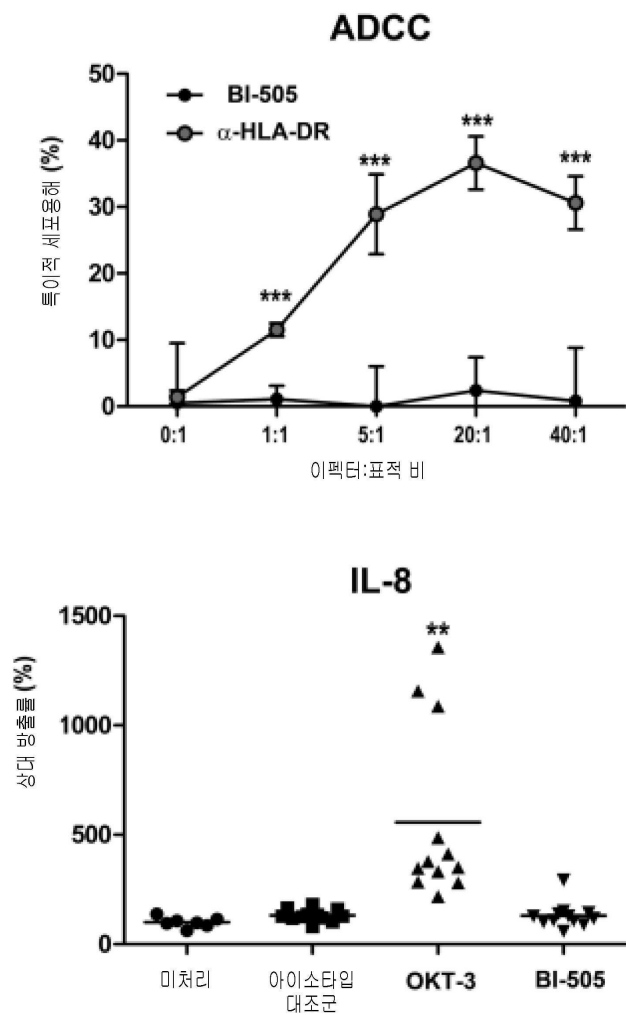
도면11



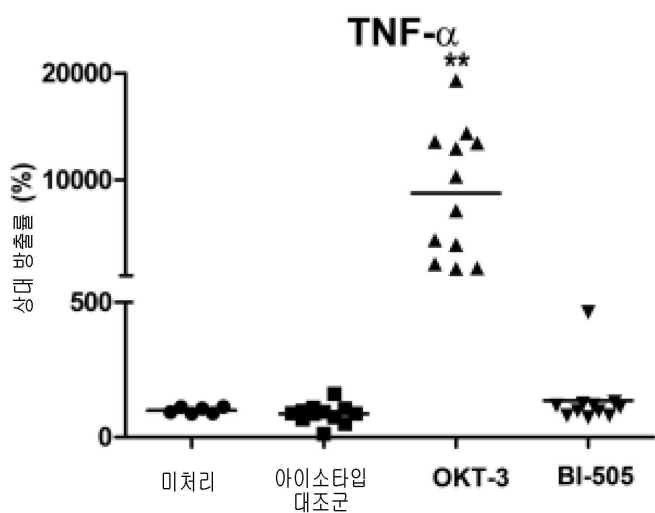
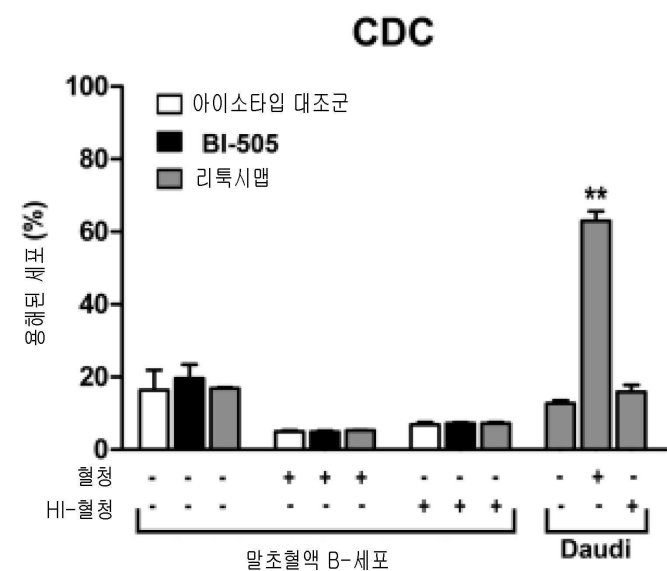
도면12a



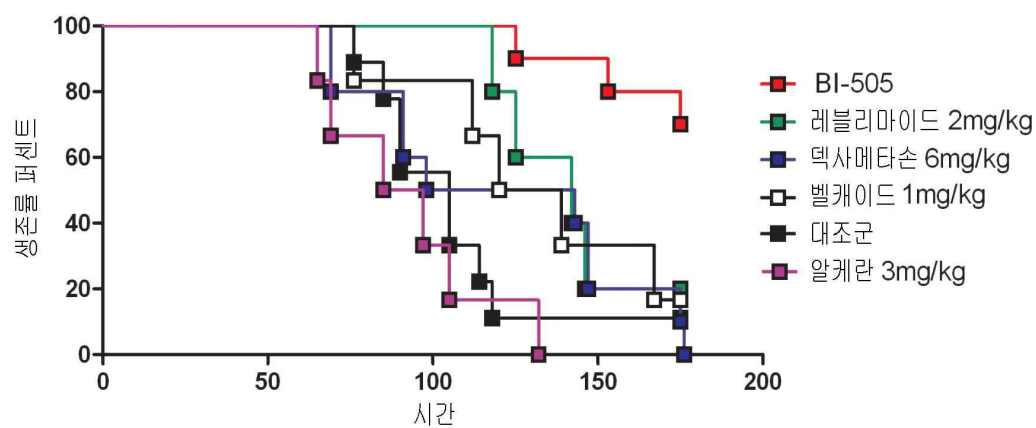
도면12b



도면12c

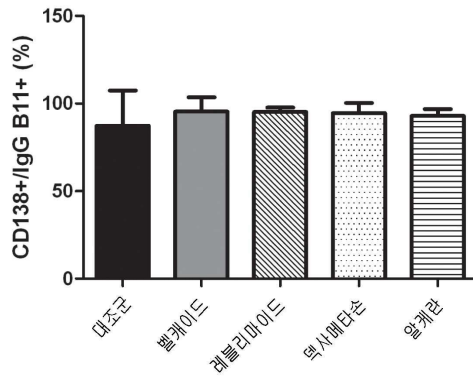


도면13

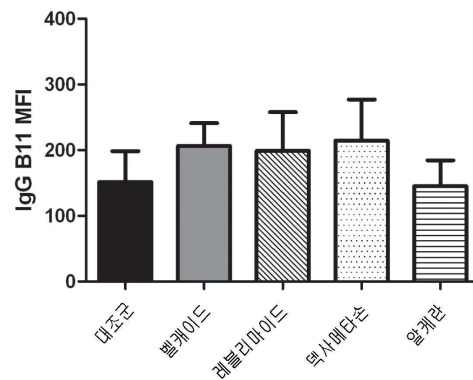


도면14

A



B



도면15a

B11-VH

뉴클레오타이드 서열:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC
AGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAGTGGGTGGCATTATATGGTATGATGGAAGTAATA
AATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGATACAGTG
GCTGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGT
GAGCTCA

아미노산 서열:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGK
GLEWVAFIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCARYSGWYFDYWGQGLTVTVSS

도면15b

B11-VL

뉴클레오타이드 서열:

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCG
GGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACAT
CGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGA
ACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGATAACAACAATCGGCCCT
CAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTC
AGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCT
GATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTCAGTGCTTGGC
TGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

아미노산 서열:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTA
PKLLIYDNNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQ
SYDSSLAWLFGGGTKLTVLG