

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2019년 5월 31일 (31.05.2019) WIPO | PCT

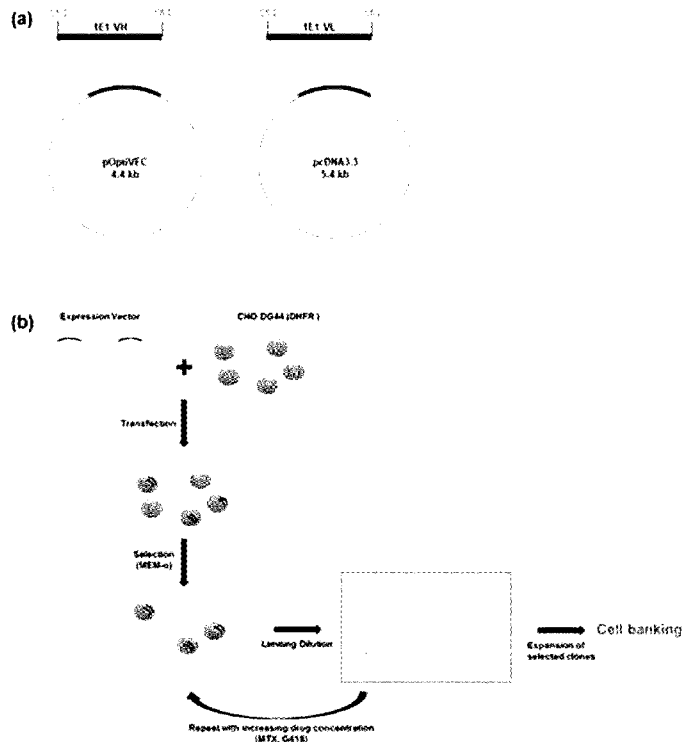


(10) 국제공개번호  
WO 2019/103531 A1

- (51) 국제특허분류: G01N 33/574 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)  
G01N 33/68 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)  
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/014540
- (22) 국제출원일: 2018년 11월 23일 (23.11.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0157865 2017년 11월 24일 (24.11.2017) KR  
10-2018-0145969 2018년 11월 23일 (23.11.2018) KR
- (71) 출원인: 충북대학교 산학협력단 (CHUNGBUK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 28644 충청북도 청주시 서원구 충대로 1, Chungcheongbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 송형근 (SONG, Hyung-Guen); 06601 서울시 서초구 서초중앙로 200, 10동 905, Seoul (KR). 김민영 (KIM, Min-Young); 28147 충청북도 청주시 청원구 내수읍 비중2길 25, Chungcheongbuk-do (KR). 선성규 (SEON, Seong-Gyu); 28110 충청북도 청주시 흥덕구 옥산면 오산5길 13, 101동 1207호, Chungcheongbuk-do (KR). 박보름 (PARK, Bo-Reum); 17422 경기도 이천시 장호원읍 서동대로 8844-15, 102동 1705호, Gyeonggi-do (KR). 이지예 (YI, Ji-Ye); 12275 경기도 남양주시 와부읍 덕소로 270, 120동 1603호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

(54) Title: ANTI-ICAM4 ANTIBODY AND COMPOSITION FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ICAM4 EXPRESSION CELL-ASSOCIATED DISEASE

(54) 발명의 명칭: 항-ICAM4 항체 및 ICAM4 발현 세포와 관련된 질병의 진단 및 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to an improved anti-ICAM4 antibody and a use thereof as a diagnostic and therapeutic agent for ICAM4 expression cell-associated disease and, more particularly, to a chimeric antibody of an anti-ICMA4 mouse monoclonal antibody IE1, a cell strain producing the same, a humanized antibody, and an anti-ICMA4 antibody-drug complex. The anti-ICAM4 chimeric antibody according to the present invention recognizes the same epitope as that of IE1 and exhibits similar affinity for the antigen. The antibody-drug complex using the antibody was found to exhibit efficacy higher than preexisting antibody-drug complexes. Hence, the improved antibodies of the present invention can be useful for the diagnosis and treatment of ICAM4-associated diseases.



WO 2019/103531 A1

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 개량된 항-ICAM4 항체 및 이의 ICAM4 발현 세포와 관련된 질병의 진단 및 치료제로서의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 항-ICMA4 마우스 단클론 항체 IE1의 키메릭 항체 및 이를 생산하는 세포주, 인간화항체 및 항-ICMA4 항체-약물 복합체 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항-ICAM4 키메릭 항체는 IE1과 동일한 항원결정부위를 인지하며 유사한 항원 친화도를 보였고, 상기 항체를 이용한 항체-약물 복합체는 기존의 항체-약물 복합체보다 우수한 효능을 나타내는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 개량된 항체들은 ICAM4와 관련된 질병의 진단 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 항-ICAM4 항체 및 ICAM4 발현 세포와 관련된 질병의 진단 및 치료용 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 개량된 항-ICAM4 항체 및 이의 ICAM4 발현 세포와 관련된 질병의 진단 및 치료제로서의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 항-ICMA4 단일클론항체 1E1의 키메라 항체 및 이를 생산하는 세포주, 인간화항체 및 항-ICMA4 항체-약물 복합체 등에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 암에 대한 항체 기반 치료는 과거 20년 전부터 현재까지 혈액암 및 고형암 환자를 치료하는 가장 성공적이고 중요한 방법 중 하나이다[Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. Nat Rev Cancer. 2012;12(4):278-87]. 항체 치료제의 성공적인 개발을 위해서 전임상 단계에서 항체의 물리·화학적 특성 확인, 정상조직과 악성조직 패널을 이용한 항원 발현 분석, 항체의 신호경로 및 면역효과기 기능에 관한 연구, 항체 키메라화 및 인간화 그리고 *in vivo*에서 항체 단독 또는 약물 결합체의 치료활성 관찰 등에 대한 과정이 수반되어야 한다. 현재까지 다양한 혈액암 및 고형암의 치료를 위해 12개의 항체치료제가 미국 식품의약국(FDA)으로부터 승인받았으며, 현재 다수의 추가 항체 치료제가 임상 시험 중에 있다.
- [3] 인간화항체란 인간이 아닌 종의 항체 서열을 인간에게서 자연적으로 생산된 항체와 유사성을 높이기 위해 변형시킨 항체를 의미한다(Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. Nature. 1988;332(6162):323-7; 및 Queen C, et al. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(24):10029-33). 키메라 항체도 인간 항체와 유사성을 높이기 위해 마우스 항체의 불변부위 서열을 인간항체 불변부위 서열로 대체한다는 점에서 인간화항체와 유사하지만 가변부위의 상보성결정부위(CDR)를 제외한 서열들이 여전히 마우스 서열이라는 점에서 인간화항체와 구별된다(Brekke OH, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. Nat Rev Drug Discov. 2003;2(1):52-62). 인간화항체를 제작하는 방법으로는 CDR 이식 방법과 다양한 디스플레이를 이용한 방법이 주로 이용된다. 먼저 CDR 이식이란 마우스 단클론 항체의 가변부위 서열을 암호화 하는 DNA를 분리하고 유전자 클로닝을 통하여 CDR 서열을 확보한 다음 *in silico* 상으로 적합한 인간항체 서열 안으로 CDR 서열을 이식하여 만드는 방법이다(Hou S, et al. Humanization of an anti-CD34 monoclonal antibody by complementarity-determining region grafting based on computer-assisted molecular modelling. J Biochem. 2008;144(1):115-20; 및

Kashmiri SV, De Pascalis R, Gonzales NR, Schlom J. SDR grafting--a new approach to antibody humanization. *Methods*. 2005;36(1):25-34. 고속으로 적합한 유전자를 선별할 수 있는 디스플레이를 이용한 항체 서열 인간화 방법은 마우스 또는 인간이 아닌 다른 포유동물을 사용하지 않고 인간 치료용 항체를 만들기 위해 고안된 방법으로 파지 디스플레이법이 가장 많이 이용되고 있다. 류마티스 관절염 치료제 휴미라 가 이 기법을 이용하여 최초로 승인된 항체이며, 현재 시장 점유율이 가장 높은 항체 의약품이다.

- [4] 항체-약물 복합체(ADC)는 암의 표적 치료에서 가장 진보된 접근법 중 하나이다[15]. 항체-약물 복합체는 항체의 표적 특이적인 반응을 이용해 종양 조직에 직접적으로 약물을 전달할 수 있다(Sochaj AM, widerska KW, Otlewski J. *Current methods for the synthesis of homogeneous antibody-drug conjugates. Biotechnol Adv.* 2015;33(6 Pt 1):775-84; 및 Teicher BA, Doroshow JH. *The promise of antibody-drug conjugates. N Engl J Med.* 2012;367(19):1847-8). 항체가 표적 항원에 결합하면 항체-약물 복합체는 세포 내부로 내재화(internalization)되면서 약물이 방출되고 결국 세포 사멸이 일어난다[Kovtun YV, Goldmacher VS. *Cell killing by antibody-drug conjugates. Cancer Lett.* 2007;255(2):232-40]. 현재까지 브렌독시맙-베도틴과 트라스투주맙-엠탄신 항체-약물 복합체가 미국식품의약국(FDA) 승인을 받았고, 지난 10년간 항체-약물 복합체를 개선하기 위한 많은 노력이 있었으며 최근 60가지가 넘는 새로운 항체-약물 복합체가 임상 시험 중에 있다.

- [5] 본 발명자들은 이전 연구를 통해 인간 적혈구 표면항원 ICAM4에 대한 마우스 단클론 항체 1E1을 확보하였다(김민영. 적백혈병에 대한 새로운 치료용 단클론 항체의 개발. 충북대학교 의학석사학위논문. 2014). ICAM4 (intercellular adhesion molecule 4)는 인간 적혈구 막에 발현되어 있는 시알산(sialic acid) 잔기가 붙은 당단백질로, 적혈구 외에 적혈구 및 일부 T 세포와 B 세포와 같은 다른 혈액세포의 전구체에서 발현된다. ICAM4에 대한 기능은 잘 알려져 있지 않지만, 인간 적혈구의 핵이 제거되는 성숙단계에서 인접한 적혈구의 VLA-4와 대식세포의  $\alpha$ v 인테그린과 결합하여 적혈구를 안정화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그 밖에 겸형 적혈구증 환자들에서의 ICAM4 항원의 인산화 차이나 ICAM4에 결합하는 다양한 인테그린 간의 상호작용에 관한 연구가 진행되고 있으나, 항체치료제의 표적물질로서의 연구는 알려진바 없다.

- [6] 이에 본 발명자들은 ICAM4에 대한 제조합 항체치료제를 개발하고자 하였고, 이를 위해서 항-ICAM4 마우스 단일클론항체 1E1을 기본으로 하는 키메릭 항체, 인간화항체, 항체-약물 복합체 및 이중특이성 항체 등 다양한 형태의 항-ICAM4 항체치료제를 개발하고, 특히 특정 질환에 대하여 진단 또는 치료 효과를 가지는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

### 발명의 상세한 설명

## 기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 항-ICAM4 단일클론 항체를 이용한 키메라 항체, 인간화항체, 이중특이성 항체 및 항체-약물 복합체를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체를 이용하여 ICAM4와 관련된 질병의 진단을 위한 조성물, 키트, 진단을 위한 정보 제공방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또다른 목적은 상기 항체를 이용하여 ICAM4와 관련된 질병의 치료용 조성물 및 치료방법을 제공하는 것이다.

## 과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항-ICAM4 단일클론 항체를 이용한 키메라 항체, 인간화항체, 이중특이성 항체 및 항체-약물 복합체를 제공한다.
- [11] 본 발명자들은 이전 연구를 통해 인간 적혈구 표면 항원 ICAM4에 대한 마우스 단일클론 항체 1E1을 확보하였으며, 이에 대해 대한민국 등록특허 제10-1627020호로 특허등록을 받았다. 상기 등록특허는 그 전체가 본 명세서에 참조로 삽입된다.
- [12] 본 발명의 항 ICAM4 항체는 상기 항 ICAM4 단일클론항체 1E1에 대한 키메라 항체, 인간화 항체, 이중특이성 항체 또는 항체-약물 전달체 중 하나로서, 적용되는 형태에 따라 항체의 형태가 달라질 수 있으나, 공통적인 서열을 함께 포함한다.
- [13] 즉, 본 발명의 상기 항 ICAM4 항체는, 서열번호 1 내지 서열번호 5의 아미노산 서열 중에 선택된 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR)의 중쇄 영역; 및 서열번호 6 내지 서열번호 9의 아미노산 서열 중 선택된 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR)의 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다. 보다 구체적으로 상기 CDR 영역은, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 CDR H1; 서열번호 2 내지 서열번호 4의 아미노산 서열 중 선택된 하나의 서열로 이루어진 CDR H2; 및 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 CDR H3를 포함하는 CDR 중쇄 영역과, 서열번호 6 또는 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 CDR L1; 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 CDR L2; 및 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 CDR L3를 포함하는 CDR 경쇄 영역을 포함하는 것이다.
- [14] 일 양태로서, 본 발명은 상기 항-ICAM4 항체의 가변부위와 인간 항체 불변부위가 함께 발현되도록 제작된 키메라(chimeric) 항체를 제공한다.
- [15] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 키메라 항체는, 항 ICAM4 항체의 상보성 결정 영역(CDR) 및 구조영역(FR)과 인간 항체의 경쇄 및 중쇄 불변부위를 포함한다.
- [16] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항-ICAM4 항체의 인간화 항체를 제공한다.
- [17] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항-ICAM4 항체의 인간화항체 중쇄 영역은 11의 아미노산 서열로 이루어진 VH1A; 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 VH1B; 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진 VH1C; 서열번호

- 14의 아미노산 서열로 이루어진 VH1D; 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어진 VH2A; 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 VH2B; 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 VH2C; 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 VH2D; 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어진 VH2E; 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어진 VH3A; 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어진 VH3B; 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 VH3C; 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진 VH3D로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고,
- [18] 항-ICAM4 항체의 인간화 항체의 경쇄 영역은 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어진 VL1A; 서열번호 25의 아미노산 서열로 이루어진 VL1B; 서열번호 26의 아미노산 서열로 이루어진 VL1C; 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어진 VL1D; 서열번호 28의 아미노산 서열로 이루어진 VL2A; 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 VL2B; 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어진 VL2C; 서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어진 VL2D로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [19]
- [20] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 항-ICAM4 항체를 포함하는 이중특이성 항체를 제공한다.
- [21] 본 발명의 일 실시예에서 상기 이중특이성 항체는 항-ICAM4 항체; 및 다른 항원에 특이적인 항체가 링커에 의하여 결합된 형태이며, 본 발명의 상기 다른 항원에 특이적인 항체는 CEACAM 패밀리에 속하는 CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8, CEACAM21, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20, 및 MDSC 마커인 CD33, CD11b 중에서 제한없이 선택하여 포함될 수 있고, 바람직하게는 CEACAM8 또는 CEACAM6일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 항CEACAM6(CD66c) 항체를 포함하는 이중특이성 항체를 제작하여 효과를 확인하였으며, 이러한 이중특이성 항체는 항체 의존성 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)이 증강된 특징을 가진다. 상기 항 CD66c 항체는 CD66c에 특이적인 결합을 이루는 펩타이드가 제한 없이 포함될 수 있으며, 상기 링커는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어져 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [22]
- [23] 또 다른 측면으로 본 발명은, 상기 항-ICAM4 항체를 포함하는 항체-약물 복합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC)를 제공한다.
- [24] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 약물은 항암 활성을 나타내는 약물로서, 체내에서 독성을 일으키는 물질일 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 약물은 사포린(saporin), 엠탄신(emtansine), 독소루비신 (Doxorubicin), 카보플라틴(Carboplatin), 시스플라틴 (Cisplatin), 시클로포스파미드 (Cyclophosphamide), 이포스파미드(Ifosfamide), 니드란 (Nidran), 질소머스타드 (메클로에타민 염산염)[Nitrogen mustar(MechlorethamineHCL)], 블레오마이신

(Bleomycin), , 미토마이신 C (Mitomycin C), 시타라빈 (Cytarabine), 플루로우라실(Flurouracil), 겐시타빈 (Gemcitabine), 트리메트렉세이트 (Trimetrexate), 메토크렉세이트 (Methotrexate), 에토포시드 (Etoposide), 빈블라스틴 (Vinblastine), 비노렐빈 (vinorelbine), 알림타 (Alimta), 알트레타민 (Altretamine), 프로카바진 (Procarbazine), 탁솔 (Taxol), 탁소텔 (Taxotere), 토포테칸 (Topotecan) 및 이리노테칸 (Irinotecan)으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 약물 일 수 있으며, 바람직하게는 사포린(Saporin) 또는 엠탄신(Emtansine)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[25]

[26] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 5의 아미노산 서열 중 선택된 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR)의 중쇄 영역; 및 서열번호 6 내지 서열번호 9의 아미노산 서열 중 선택된 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR)의 경쇄 영역을 포함하는 항 ICAM4 항체를 포함하는, ICAM4를 발현하는 세포와 관련된 질병의 진단용 조성물을 제공한다.

[27] 상기 진단은 상기 조성물을 통하여 ICAM4 발현 질환에서의 항원-항체 반응을 통하여 진단할 수 있으며, 상기 진단용 조성물 및 이를 포함하는 진단용 키트를 이용할 수 있다.

[28]

[29] 다른 양태로서, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 5의 아미노산 서열 중 선택된 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR)의 중쇄 영역; 및 서열번호 6 내지 서열번호 9의 아미노산 서열 중 선택된 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR)의 경쇄 영역을 포함하는 항 ICAM4 항체를 포함하는, ICAM4를 발현하는 세포와 관련된 질병의 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 질병은 백혈병, 간암, 담관암 또는 골수형성이상증후군(MDS)일 수 있다.

[30] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물일 수 있다.

[31]

[32] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항-ICAM4 항체의 키메라 항체; 인간화 항체; 이중특이성 항체; 또는 이들 항체에 약물이 결합된 항체-약물 복합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC)를 포함하는 골수유래 면역억제세포(Myeloid-derived suppressor cells, MDSC)의 감별용 조성물을 제공한다.

[33] 골수유래 면역억제세포(Myeloid-derived suppressor cells, MDSC)는 골수성 세포 중에서 면역억제 작용을 가진 세포들로서, 매우 광범위한 미분화 골수성 세포를 포함하는 세포군으로, 종양이나 염증의 발생 상태에서 증가하게 되며, 일반적으로 세포-세포 사이의 접촉을 통하여 면역 억제 작용을 한다고 알려져 있다. 즉, MDSC를 감별함으로써, 종양 또는 염증 발생 여부를 판단할 수 있으며, 본 발명의 항 ICAM4 단일클론 항체 1E1은, MDSC에 결합하는 마커로서 작용할

수 있다.

- [34] 따라서, 본 발명의 ICAM4 단일클론항체 및 이의 키메릭 항체; 인간화 항체; 이중특이성 항체; 또는 이들 항체에 약물이 결합된 항체-약물 복합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC)는 MDSC에 대한 마커로서 활용가능하며, 이를 진단함으로 인하여 MDSC가 발현되는 질병에 대한 진단이 가능하다.
- [35]
- [36] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항-ICAM4의 단일클론항체 및 이의 키메릭 항체; 인간화 항체; 이중특이성 항체; 또는 이들 항체에 약물이 결합된 항체-약물 복합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC)를 포함하는 골수유래 면역억제세포(Myeloid-derived suppressor cells, MDSC)의 활성 억제용 조성물을 제공한다.
- [37]
- [38] 본 발명은 상기 항-ICAM4 항체의 키메릭 항체; 인간화항체; 이중특이성 항체; 또는 이들 항체에 약물이 결합된 항체-약물 복합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC)를 이용하는, ICAM4를 발현하는 세포와 관련된 질병의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [39] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 방법은 1) 개체로부터 수득한 생물학적 시료에 상기 항체를 접촉시키는 단계; 2) 상기 항체에 결합된 ICAM4를 검출하는 단계; 및 3) 상기 단계 2)에서 검출된 ICAM4의 발현 정도를 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함한다.
- [40] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 ICAM4를 발현하는 세포와 관련된 질병은 암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 ICAM4를 발현하는 세포와 관련된 질병은 백혈병, 간암, 담관암 또는 골수형성이상증후군(MDS)이다.

### 발명의 효과

- [41] 본 발명에 따른 항-ICAM4 항체의 키메릭 항체; 인간화 항체; 이중특이성 항체 및 항체-약물 복합체는 항-ICAM4 항체의 단일클론항체인 1E1과 동일한 항원결정부위를 인지하며 유사한 항원 친화도를 보였고, 특히 항체-약물 복합체는 기존의 항체-약물 복합체보다 우수한 효능을 나타내는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 개량된 항체들은 ICAM4와 관련된 질병의 진단 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [42] 도 1은 본 발명에 따른 항-ICAM4 키메릭 1E1 항체 (*chi1E1*) 생산용 세포주의 제작 과정을 나타낸 그림이다. (a) 사람 IgG의 constant regions을 포함하는 키메릭 1E1 항체 발현 벡터의 제작. (b) 키메릭 1E1 항체 생산을 위한 안정한 세포주 개발의 과정.
- [43] 도 2는 백혈병 세포주에서 키메릭 1E1 항체의 사람 ICAM4에 대한 결합친화도를 유세포분석으로 측정된 결과이다. (a) 키메릭 1E1 항체에 의해

인식되는 에피토프 부위의 식별. 마우스 1E1 항체 block의 부존재(흑색) 및 존재(적색) 하에서 키메릭 1E1 항체로 염색한 K562 세포. (b) 항체 친화성을 측정하기 위해, ICAM4 양성 세포주(K562, HEL) 및 ICAM4 음성 세포주(786-O)에 대해 키메릭 1E1 항체의 희석액을 조사하였다. 간접 염색을 통해 측정된 키메릭 1E1 항체의 포화 농도는 마우스 항체 1E1 (약 5  $\mu\text{g/mL}$ , 데이터 미기재)과 유사한 결합도를 나타내었다. 염색을 위해 FITC-표지된 항-사람 IgG 항체를 사용하였다.

- [44] 도 3은 마우스 1E1 항체의 3차원 구조를 분자 모델링으로 나타낸 것이다. 표시된 부분은 모든 CDRs 부분을 나타낸다. 설계된 인간화 항체 서열의 일부는 CDRs에 구조적 변화를 야기한다(Kabat positions H48 및 H78).
- [45] 도 4는 최적의 인간화된 1E1 항체 구조물(construct)의 선별 결과를 나타낸다. (a) 104개의 인간화 항체 조합을 293T 세포에서 일시적으로 발현시키고, K562 세포에서 결합 특성을 비교하였다. (\* 표시는 선택된 인간화 항체를 나타낸다.) (b) 1E1 인간화 항체에 의해 인식되는 에피토프의 식별. 마우스 1E1 항체 block의 부존재(흑색) 및 존재(적색) 하에서 1E1 인간화 항체로 염색한 K562 세포.
- [46] 도 5는 인간화 항체의 1E1 항원 결합 친화도를 측정한 결과이다. 일부 인간화 항체의 경우, 키메릭 항체에 비해 1E1에 결합 친화도가 높아지는 경향을 보이고 있다.
- [47] 도 6은 두 종류의 항-ICAM4-약물 복합체의 개발 과정을 나타낸 것이다. (a) 사포린(saporin)이 결합된 마우스 1E1 항체(m1E1-SAP)의 개발. 1E1-SAP는 화학적으로 이황화 결합(disulfide bond)에 의해 사포린에 연결된다. (b) 엠탄신(emtansine)이 결합된 키메릭 1E1 항체(r1E1-DM1)의 구조. r1E1-DM1은 SMCC 링커를 이용하여 설계되었다. DM1: thiol-containing maytansinoid; SMCC: succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate.
- [48] 도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 두 종류의 항-ICAM4-약물 복합체의 효능을 실험한 결과이다. (a) 항-ICAM4 m1E1-SAP의 *in vitro*상 효능. K562 세포에 다른 농도의 m1E1-SAP를 3일간 처리하였다. 실험은 3반복으로 수행하였고 Ez-cytox로 분석하였다. (b) 항-ICAM4 chi1E1-DM1의 *in vitro*상 효능. HEL 세포에 다른 농도의 chi1E1-DM1를 3일간 처리하였다. 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 유세포분석(flow cytometry)으로 측정하였다.
- [49] 도 8은 이종이식(xenotransplanted) 마우스 모델에서 항-ICAM4-DM1 복합체의 효능을 실험한 결과이다. HEL tumor xenografts에서 항-ICAM4 chi1E1-DM1의 *in vivo* 효능을 측정하였다. HEL 종양을 갖고 있는 SCID 마우스에 4 mg/kg의 chi 1E1-DM1을 단일, 정맥내 주사하였다.
- [50] 도 9는 정상 RBC 및 백혈병 종양 세포에서 ICAM4의 다른 sialylation을 다양한 농도의 뉴라민가수분해효소(neuraminidase) 처리에 의해 측정된 것이다. (a) 뉴라민가수분해효소를 농도별로 종양세포주(K562)와 적혈구에 처리하여 이들에 결합하는 키메릭 1E1 항체의 결합력을 비교한 것이다. (b) 1000 unit의

뉴라민가수분해효소를 종양세포주와 적혈구에 처리하여 이들에 결합하는 키메릭 1E1 항체의 결합력을 비교한 것이다. (c) 종양 세포와 적혈구가 혼합되었을 때 세포 표면의 시알릭산의 차이에 따른 항체 반응성을 비교한 것이다.

- [51] 도 10은 ICAM4와 CD66c에 대한 이중특이적 항체의 제조 방법(a) 및 제조된 항체의 항체의존적세포독성(ADCC) 기능을 확인한 결과(b, c)를 나타낸 것이다.
- [52] 도 11은 사람 태아 조직의 파라핀 포매된 섹션에서 ICAM4의 발현을 나타낸 것이다. 면역조직화학 염색을 위해 사람 태아 조직의 파라핀 조직 섹션에 항-ICAM4 1E1 항체(10 µg/mL) 및 HRP-표지된 이차 항체(1/1000 dilution)를 연속적으로 처리하고, DAB를 기질로 하였다. 염색 결과, 골수 외 적혈구 생성(extramedullary erythropoiesis)이 나타나는 간(b)을 제외하고 다른 모든 조직들(a)에 대해 교차 반응성이 나타나지 않았다.
- [53] 도 12는 MDS 및 간암 환자의 종양 조직에서 ICMA4의 발현을 나타낸다. 말초 혈액 샘플에서 ICAM4 항원은 적혈구 세포를 제외하고는 정상 조건 하에서 발현되지 않는다. 임상 환자 샘플을 분석한 결과, (a) MDS & HCC 및 (b) MDS 환자에서 CD45<sup>low</sup>/CD11b<sup>+</sup>/ICAM4<sup>+</sup> 개체군을 발견하였다. MDS: myelodysplastic syndrome; HCC: hepato cellular cacinoma.
- [54] 도 13은 일반 성인 3명과 4기 암환자 11명의 혈액 샘플 중 일부 암환자의 샘플에서 1E1의 항원이 높아져 있는 것을 보여주는 결과이며, 따라서 1E1 항체 타겟이 적백혈병에만 국한되는 것은 아니라는 것을 확인한 것이다.
- [55] 도 14는 골수유래 억제세포(MDSC)에 대한 항 ICAM4 항체의 발현 효과를 확인한 것으로서, 항 ICAM4 항체가 상기 세포에 대한 마커로 사용될 수 있음을 보여주는 결과이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [56] 본 발명자들은 대한민국 등록특허 제10-1627020호에 개시된 정상적혈구 표면에서 발현하는 ICAM4에 대한 단일클론항체 1E1의 백혈병을 포함한 종양 치료용 항체로의 개발 가능성에 대하여 체계적으로 검증하였다.
- [57] 우선 항-ICAM4 키메릭 항체 1E1을 대량 확보하기 위해서 키메릭 항체를 안정적으로 생산하는 세포주를 만들었다(도 1). 인간 불변부위가 함께 발현되도록 제작된 pOPtiVEC과 pcDNA3.3을 발현벡터로 사용하였고, 호스트 세포주는 CHO DG44를 사용하였다. 생산성을 높이기 위한 약제로 MTX와 G418을 사용하여 7.5 µg/mL의 생산성을 보이는 세포주를 개발하였다. 대량 생산용 세포주에서 생산된 재조합 키메릭 항체 1E1은 마우스 항체 1E1과 동일한 항원결정부위를 인지하며 유사한 항원 친화도를 보였다(도 2).
- [58] 그 다음 단계로 *in silico*로 추정된 104개의 재조합 인간화항체를 생산하여 선별과정을 거쳐 최적의 치료용 항체 후보군을 선정하였다. 마우스 항체의 가변부위와 인간 항체의 불변부위를 재조합한 키메릭 형태의 치료용 항체를

제작하는 것도 효능은 유지하면서 HAMA (human anti-mouse antibody) 반응을 줄이고 특허에 침해받지 않는 등 여러 장점이 있지만, 마우스에서 유래한 항체가 변부위는 여전히 면연반응을 유발할 수 있고 인간화 과정을 통해 항체를 선별하는 과정에서 물성 및 항원 친화도 측면으로 키메라 항체보다 우수한 항체를 획득하기 위해 항-ICAM4 키메라 항체 1E1의 인간화를 진행하였다.

[59] 인간화항체는 CDR 이식 방법을 통하여 진행되었다. CDR 이식이란 실제로 항원을 인지하여 결합하는데 필요한 부위인 CDR 을 제외한 다른 모든 부위를 인간에서 유래한 서열로 바꾸어 주는 항체 인간화 기술이다 [Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 1986;321(6069):522-5].

항-ICAM4 키메라 항체 1E1의 CDR 이식을 위하여 본래 서열과 상동성이 높은 순서로 중쇄 IMGT human germline IGHV4-59\*05 (60.8%), IGHV3-11\*01 (51.6%), IGHV5-51\*01 (45.4%), 경쇄 GKV1-9\*01 (75.8%), IGKV3-11\*01 (67.4%)이 선택되어 CDR 이식이 진행되었고, *in silico*로 항체 구조에 영향을 줄 수 있는 아미노산 서열을 유지하는지 또는 변경하는지에 따라서 A, B, C, D, E 버전으로 중쇄 13개, 경쇄 8개 인간화항체 서열을 얻었다(표 1). 구체적으로, 상기 인간화항체 중, 13개의 항-ICAM4 단일클론항체 1E1의 인간화항체 중쇄 영역은 서열번호 1 내지 서열번호 5의 아미노산 서열에서 선택되는 중쇄 가변부위 및 인간 항체 불변부위를 포함하며, 보다 구체적으로 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 VH1A; 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 VH1B; 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진 VH1C; 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 VH1D; 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어진 VH2A; 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 VH2B; 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 VH2C; 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 VH2D; 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어진 VH2E; 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어진 VH3A; 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어진 VH3B; 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 VH3C; 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진 VH3D이고,

[60] 8개의 항-ICAM4 단일클론항체 1E1의 인간화 항체의 경쇄 영역은 서열번호 6내지 서열번호 9에서 선택되는 경쇄 가변부위 및 인간 항체 불변부위를 포함하며, 보다 구체적으로는 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어진 VL1A; 서열번호 25의 아미노산 서열로 이루어진 VL1B; 서열번호 26의 아미노산 서열로 이루어진 VL1C; 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어진 VL1D; 서열번호 28의 아미노산 서열로 이루어진 VL2A; 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 VL2B; 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어진 VL2C; 서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어진 VL2D이다. 분자 모델링을 이용한 항체 가변부위의 3D 구조를 구축을 통해서 중쇄의 48번(Leu→Val), 78번(Val→Leu) 아미노산의 변화가 인간화항체 가변 부위 구조의 변화를

가져오는 결과를 예측할 수 있었고(도 3), 실제로 3D 구조 변경이 예상되는 24개의 VH2-C, VH2-D, VH2-E 조합 클론들 대부분은 항원 친화도가 없거나 매우 낮았다(도 4).

[61]

[62] 항-ICAM4 항체치료제 1E1의 가장 큰 특성 중 하나는 세포 내재화이다. 이러한 내재화 특성은 항체-약물 복합체 개발의 좋은 후보물질이 될 수 있는 조건인데 이전 연구결과를 보면 1시간 안에 약 70%의 항원-항체 복합체가 세포 안으로 내재화 되고[김민영. 적백혈병에 대한 새로운 치료용 단클론 항체의 개발. 충북대학교 의학석사학위논문. 2014], 이는 기존에 알려진 T-DM1이 위암 세포주에서 확인한 약 10% 항체-약물 복합체가 내재화 되는 것보다 많은 양의 항원-항체 복합체가 내재화되는 것으로 항-ICAM4 항체치료제 1E1이 더 높은 유효성을 갖는 치료제가 될 가능성이 높다는 이론적 근거를 제공해 주고 있다[Wang H, et al. Aberrant intracellular metabolism of T-DM1 confers T-DM1 resistance in human epidermal growth factor receptor 2-positive gastric cancer cells. *Cancer Sci.* 2017 Apr 7. doi: 10.1111/cas.13253].

[63]

본 발명의 일실시예에서는, 항-ICAM4 항체와 사포린 또는 엠탄신 복합체를 제작해 생체내외에서 그 유효성을 검증하였고, 각각  $IC_{50}$  10 ng/mL 및 3.7  $\mu$ g/mL로 비교적 양호한 효능을 보였다(도 7, 8). 사포린은 리보솜 불활성화 단백질로 높은 효소활성을 가지며 물리 화학적으로 안정하고 실험실 수준에서 항체와의 결합이 용이하다는 이점을 가지고 있고[Polito L, Bortolotti M, Mercatelli D, Battelli MG, Bolognesi A. Saporin-S6: a useful tool in cancer therapy. *Toxins (Basel)*. 2013;5(10):1698-722], 엠탄신은 세포 분열을 억제하는 미세소관 형성 저해제로 2013년에 FDA 승인을 받은 HER2 양성 전이성 유방암을 대상으로 하는 T-DM1 (캐싸일라)에 사용된 약물로 그 안전성과 효능이 입증되어 있다[Bender B, Leipold DD, Xu K, Shen BQ, Tibbitts J, Friberg LE. A mechanistic pharmacokinetic model elucidating the disposition of trastuzumab emtansine (T-DM1), an antibody-drug conjugate (ADC) for treatment of metastatic breast cancer. *AAPS J.* 2014;16(5):994-1008].

[64]

백혈병이 진행되면 조혈기능이 저하되고 정상 적혈구의 숫자도 매우 감소하기 때문에 항암치료 초기에는 정상 적혈구에서의 ICAM4 발현이 덜 문제가 되지만, 근본적으로 항-ICAM4 항체치료제를 개발하면서 정상 적혈구와의 반응성 회피 문제가 제기된다. 그래서 먼저 고안한 방법은 항-ICAM4 항체치료제의 시알산 의존적인 항원결정부위를 인지하는 특징을 이용하는 것이다. 종양 세포는 영양 결핍에 의한 비정상적인 에너지 소모를 특징으로 하며 이 과정에서 다양한 유형의 다당류가 급속히 소실되고, 세포 표면의 당화를 유지하기 위해 시알산이 이용되게 된다. 즉 정상 세포보다 종양 세포 표면에 시알산이 더 많이 존재한다. 세포 표면의 시알산을 제거하는 뉴라민가수분해효소를 농도별로 처리하여 종양 세포와 정상 적혈구 표면 ICAM4항원의 시알산화정도의 차이를 만들었고

항-ICAM4 항체가 종양 세포에는 결합하면서 정상 적혈구에는 결합하지 않는 뉴라민가수분해효소 농도를 알아내었다(도 9).

- [65] ICAM4 항원은 조직에서의 극히 제한된 발현을 보이지만 이는 반대로 표적세포 외 세포에서의 교차반응 우려를 줄여 준다. 이를 확인하기 위하여 인간 정상 장기와 8주령 태아 파라핀 포매 조직을 이용하여 발생단계의 정상조직에서 ICAM4의 발현을 검색하였다. 그 결과 태아조직에서는 조혈작용이 왕성한 간 조직에서 적혈구로 분화중인 미성숙 적혈구에서만 발현이 관찰되었고, 성숙 분화된 정상조직과 발생단계의 3개 배엽층의 어떤 조직에서도 ICAM4의 발현이 확인되지 않았다(도 11). 적응증 확대 측면에서 이 결과를 고려해보면 ICAM4가 인간 적혈구 생성 단계의 대부분에 발현하므로 골수성미성숙세포에서 동시 발현되어 많은 백혈병과 골수형성이상증후군(MDS) 세포가 대상이 될 수 있다. 이는 실제 골수형성이상증후군(MDS) 환자의 임상 시료를 분석하여 증명하였다(도 12). 또한 담관암 및 간암 세포주 일부에서 ICAM4가 발현되었다(표 2),

[66]

- [67] 따라서 본 발명은 항-ICAM4 단일클론항체 1E1을 이용한 항체치료제(키메라 항체, 인간화항체, 이중특이성항체 및 항체-약물 복합체를 모두 포함함)를 제공한다.

- [68] 본 발명에서 사용되는 용어 "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 다클론항체 및 단일클론항체를 모두 포함하는 개념이다. 또한, 상기 용어는 키메라 항체(예를 들면, 인간화 무린 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.

- [69] 본 발명에서 사용되는 용어 "키메라(chimeric)" 항체는 재조합 디옥시리보핵산 기법을 사용하여 유도된 것이 가장 바람직한 항체를 의미하며, 인간(면역학적으로 "유관" 중, 예컨대, 침팬지를 포함) 및 비-인간 성분 둘 모두를 포함한다. 따라서 키메라 항체의 불변 영역은 가장 바람직하게는 실질적으로 천연 인간 항체의 불변 영역과 일치하며; 키메라 항체의 가변 영역은 가장 바람직하게는 비-인간 공급원으로부터 유도되며, 대상 항원(ICAM4)에 대한 소망하는 항원 특이성을 보유한다. 비-인간 공급원은 ICAM4 항원에 대한 항체를 생성하기 위하여 사용할 수 있는 모든 척추동물 공급원이 될 수 있다. 이러한 비-인간 공급원은 설치류(예컨대, 토끼, 레트, 마우스, 등; 예를 들면, 미국 등록 특허 번호 4,816,567, 본원에서 참고자료로서 포함됨) 및 비-인간 영장류(예컨대, 구세계 원숭이, 유인원, 등; 예를 들면, 미국 등록 특허 번호 5,750,105 및 5,756,096; 본원에서 참고자료로서 포함됨)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

- [70] 본 발명에서 사용되는 용어 "항체 단편"은 표적 항원, 이 경우 ICAM4 또는 이의 특이적인 부분에 결합할 수 있는 항체의 특정 부분을 말한다. 예를 들어, 항체 단편은 F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fab' 및 Fv 단편을 포함한다. 이들은 통상적으로 재조합 DNA

기술로 제조하거나 파파인 또는 펩신으로 항체 단백질을 분해시키는 전통적인 방법을 사용하여 제조할 수 있다(CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, John Wiley and Sons Coliganet al., eds. (1991-1992)).

- [71] 본 발명에서 사용되는 용어 "단일클론항체"란 당해 분야에 공지된 용어로서 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도의 특이적인 항체를 의미한다. 통상적으로, 상이한 에피토프(항원결정기)들에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론 항체와는 다르게, 단일클론항체는 항원상의 단일 결정기에 대해서 지시된다. 단일클론항체는 항원-항체 결합을 이용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키는 장점이 있으며, 또한 하이브리도마 배양에 의해 합성되기 때문에 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 또 다른 장점을 갖는다. 전형적으로, 면역글로불린은 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역 (상기 부위는 "도메인"으로 또한 알려져 있음)을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은, "상보성 결정 영역"(complementarity determining region, 이하, "CDR"이라 함)이라고 불리는 3개의 가변 영역 및 4개의 "구조 영역" (framework region)을 포함한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.
- [72] 본 발명에서 사용되는 용어 "가변"이란 항체들 간에 특정 영역의 서열이 크게 상이하고 특정 항원에 대해 각각의 특정 항체의 결합 특이성을 나타내는데 사용된다는 것을 일컫기 위해 사용된다. 항체의 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 걸쳐 균일하게 분포하는 것이 아니라 CDR에 집중된다. 단클론 항체의 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 가지며 이들 영역이 ICAM4를 인식함으로써 항원-항체 복합체를 형성한다. 이러한 CDR은 각각의 단일클론항체마다 특징적인 서열을 가지며 하나의 단일클론항체가 특정 에피토프를 인식하기 위해 이들 6개의 CDR의 일부 또는 모두가 상호작용할 수 있다.
- [73] 본 발명의 항-ICAM4 항체는 ICAM4의 항원결정부위에 특이적으로 결합하는 항체로서, 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [74] 보다 구체적으로는 상기 항체의 중쇄 가변부위가 서열번호 1 내지 서열번호 5로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 CDR 영역 내에서 이러한 서열과의 동일성이 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게 95% 이상인 서열을 포함하거나; 또는/ 및 그들의 경쇄 가변부위가 서열번호 6 내지 서열번호 9으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 CDR 영역 내에서 이러한 서열과의 동일성이 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상인 서열을 포함할 수 있다.
- [75] ICAM4에 대해 특이적인 항체는 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있는 융합 방법(fusion method)에 의해 만들어질 수 있다(Kohler 및 Milstein (1976))

European Journal of Immunology 6:511-519 참조). 예를 들어, 본 발명의 항체는 ICAM4를 면역원으로 하여 동물을 면역화시키고, 면역화된 동물의 비장세포를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 생성하고, ICAM4를 선택적으로 인식하는 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 선별하며, 선별한 하이브리도마를 배양하고, 하이브리도마의 배양액으로부터 항체를 분리함으로써 제조할 수 있다. 상기 하이브리도마 세포주는 생체 외(in vitro)에서 배양하거나, 생체 내 주입하여 항체를 분리할 수 있다. 상기한 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체는 정제하지 않고 사용할 수도 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있는 방법에 따라 고순도(예컨대, 95% 이상)로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 정제 기술로는, 예를 들어 겔 전지영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 정제 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액으로부터 분리될 수 있다. 하이브리도마를 이용한 단일클론항체의 생산의 일례로, 마우스의 복강 내에 하이브리도마를 삽입하고 복수로부터 분리, 정제한다. 단일클론항체의 분리 및 정제는 배양 상층액 또는 복수를 이온교환 크로마토그래피(DEAE 또는 DE52 등), 항 면역글로불린 칼럼 또는 단백질 A 칼럼 등의 친화성 크로마토그래피를 이용하여 실시할 수가 있다.

- [76] 본 발명은 또한, 상기 항 ICAM4 항체를 포함하는 ICAM4의 발현 여부나 발현 정도와 관련된 질환 또는 ICAM4 매개되는 질병에 대한 진단용 조성물을 제공한다.
- [77] 본 발명은 또한, 상기한 항 ICAM4 항체를 생물학적 시료와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써, 상기 질병 마커를 검출하는 방법에 관한 것이다. 즉, 본 발명의 개량된 단일클론항체를 생물학적 시료와 반응시키고 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 ICAM4 단백질을 검출할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "생물학적 시료"란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 뇨, 세포 배양 상등액, 파열된 진핵세포 및 세균 발현계 등을 들 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 이들 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태로 본 발명의 항체와 반응시켜 ICAM4 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "항원-항체 복합체"란 시료 중의 ICAM4 단백질 항원과 이를 인지하는 본 발명에 따른 항 ICAM4 항체의 결합물을 의미하며, 이러한 항원-항체 복합체의 형성은 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 그러나 반드시 이들로만 제한되지 않고 다양한 응용과 적용이 가능하다.
- [78] 본 발명에서는 항원-항체 복합체를 검출하기 위하여 여러 가지 표지체를 사용할 수 있다. 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자,

방사성 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있으며, 반드시 이들로만 국한되지는 않는다.

- [79] 바람직하게는, 항원-항체 복합체를 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있다. 효소면역흡착법(ELISA)에는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 상기 단일클론 항체는 검출 표지를 가질 수 있으며, 검출표지를 가지지 않을 경우는 이들 단일클론 항체를 포획할 수 있고 검출 표지를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.
- [80] 본 발명은 또한, 항-ICAM4 항체를 포함하는 골수유래 면역억제세포 (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) 감별용 조성물을 제공한다. 상기 MDSC 감별은 앞서 검토한 바와 같은 질병 진단 혹은 질병 마커 검출 방법을 이용할 수 있다.
- [81] 본 발명은 또한, 상기 항 ICAM4 항체(항 ICAM4 항체의 단일클론항체에 대한 키메릭항체, 인간화항체, 이중특이성 항체 및 항체-약물 복합체를 포함함)를 포함하는 진단용 조성물 또는 진단 키트를 제공한다. 본 발명의 진단용 조성물에 사용되는 항 ICAM4 항체는, 이 항체가 ICAM4를 선별적으로 인지할 수 있는 한, 항 ICAM4 항체의 단편도 사용할 수 있다. 이러한 항체 단편은 F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fab', Fv 단편 등을 포함할 수 있다. 상기 진단키트에는 ICAM4를 선별적으로 인지하는 단일클론항체 또는 이의 단편 및 면역학적 분석에 사용되는 도구/시약이 포함될 수 있다. 면역학적 분석에 사용되는 도구/시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제 등이 포함된다. 또한, 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [82] 본 발명의 검출 방법 및 진단키트에 사용하기 위한 검정 시스템은, 이에 한정되는 것은 아니나, ELISA 플레이트, 덩-스틱 디바이스, 면역크로마토그래피 시험 스트립 및 방사 분할 면역검정 디바이스, 및 플로우-쓰로우(flow-through) 디바이스 등을 포함한다.
- [83] 또한, 본 발명은 상기 항 ICAM4 항체, 이의 키메릭항체, 인간화항체, 이중특이성 항체 또는 항체-약물 복합체를 포함하는, ICAM4의 발현 여부나 발현

정도와 관련된 질환 또는 ICAM4 매개되는 질환 치료용 조성물을 제공한다. 상기 질환은 바람직하게는 암이다. 본 발명의 치료 가능한 암은 본 발명의 항체치료제를 이용하여 선택적으로 사멸시킬 수 있는 암은 제한 없이 포함될 수 있으나, 그 예로 피부, 소화기, 비뇨기, 생식기, 호흡기, 순환기, 뇌 또는 신경계의 암이 있으며, 구체적으로 간암, 담관암, 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 (central nervous system, CNS) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 목적상 ICAM4을 발현하는 암일 수 있다. 또한, 상기 질환은 골수형성이상증후군일 수 있다.

- [84] 또한, 상기 치료용 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다.
- [85] 본 발명의 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 치료용 조성물은 액제, 산제, 에어로졸, 캡슐제, 장용피 정제 또는 캡슐제 또는 좌제의 형태로 투여할 수 있다. 투여 경로는 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하내 투여, 내피 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [86] 상기 조성물이 제형화되는 경우 항-ICAM4 항체가 주어진 시점에서 소망하는 생물학적 활성을 보유하도록 고려된다. 그 시간에서의 소망하는 생물학적 활성은 그 시간 내에 나타나는 소망하는 생물학적 활성의 약 30% 이내, 바람직하게는 약 20% 이내인 경우, 약학적 조성물은 소망하는 생물학적 활성에 대한 적합한 분석에서 측정된바 대로 제조된다. 항-ICAM4 단일클론항체의 소망하는 생물학적 활성을 측정하는 측정법은 본원의 실시예에서 설명된 바와 같이 수행될 수 있다. 문헌 Schultze et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:8200-8204; Denton et al.(1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans et al. (2000) J Immunol. 164:688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17-22; Lederman et al. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-86; Coligan et al. (1991) Current Protocols in Immunology 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) Immunology 79:439-444; 및 미국 등록 특허 번호 5,674,492 및 5,847,082에 설명된 측정법을 참조하며; 본원에서

참고자료로서 포함된다.

- [87] 본 발명의 항-ICAM4 항체는 액체 약학적 제형으로 제형화 될 수 있다. 항-ICAM4 항체는 공지의 모든 방법을 사용하여 제조될 수 있으며, 본 명세서에 개시된 방법을 포함한다. 본 발명의 일 실시예에서, 항-ICAM4 항체는 하이브리도마 세포 세포주 KCLRF-BP-00303 내에서 재조합적으로 생산되었다. 액체 약학적 제형은 상기 단일클론항체의 치료적 유효량을 포함할 수 있다. 제형 내에 존재하는 이들의 항체의 양은 투여 경로 및 소망하는 투여 부피를 고려한다.
- [88] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료 기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [89] 적합한 완충액은 종래의 산 및 이들의 염을 포함하나 이에 한정되지 않으며, 여기서, 짝이온은, 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 마그네슘이 될 수 있다. 약학적 액체 제형의 완충제로 사용될 수 있는 종래의 산 및 이들의 염의 예는, 숙신산 또는 숙신산염, 시트르산 또는 시트르산염, 아세트산 또는 아세트산염, 타르타르산 또는 타르타르산염, 인산 또는 인산염, 글루콘산 또는 글루콘산염, 글루탐산 또는 글루타메이트, 아스파르트산 또는 아스파르트산염, 말레산 또는 말레산염, 및 말산 또는 말산염 완충액을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 제형 내의 완충액 농도는 약 1 mM 내지 약 50 mM가 될 수 있고, 약 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 또는 약 1 mM 내지 약 50 mM의 범위 내의 다른 값을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 제형 내의 완충액 농도는 약 5 mM 내지 약 15 mM이고, 약 5 mM, 6 mM, 7mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 15 mM의 범위 내의 다른 값을 포함할 수 있다.
- [90] 근접 등장성인 액체 약학적 제형이 바람직한 경우, 항-ICAM4 항체 및 완충액을 포함하는 액체 약학적 제형은 제형에 근접 등장성을 부여하기에 충분한 등장제의 양을 추가로 포함할 수 있다. "근접 등장성"은 수성 제형이 약 240 mmol/kg 내지 약 360 mmol/kg, 바람직하게는 약 240 내지 약 340 mmol/kg, 더 바람직하게는 약 250 내지 약 330 mmol/kg, 더 더욱 바람직하게는 약 260 내지 약 320 mmol/kg, 그보다 더 바람직하게는 약 270 내지 약 310 mmol/kg의 삼투질농도(osmolality)를 지니는 것을 의미한다. 용액의 등장성을 결정하는

방법은 당해 기술 분야의 숙련자에게 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌 Setnikar et al. (1959) J Am. Pharm. Assoc. 48:628를 참조할 수 있다.

- [91] 당해 기술 분야의 숙련자는 약학적 조성물 내에 등장성의 제공에 유용한 다양한 약학적으로 허용 가능한 용질을 잘 알고 있다. 등장제는 체액과 동등한 수준으로 본 발명의 액체 약학적 제형의 삼투압을 조절할 수 있는 모든 시약이 될 수 있다. 생리학적으로 허용가능한 등장제를 사용하는 것이 바람직하다. 따라서 치료적 유효량의 항-ICAM4 항체 및 완충액을 포함하는 액체 약학적 제형은 등장성을 제공하기 위하여 사용될 수 있는 성분, 예를 들면, 염화 나트륨; 아미노산 예컨대, 알라닌, 발린, 및 글리신; 글루코스, 텍스트로스, 푸룩토오스, 슈크로오스, 말토오스, 만니톨, 트레할로스, 글리세롤, 소르비톨, 및 자일리톨을 포함하나 이에 한정되지 않는 당 및 당 알콜(폴리올); 아세트산, 다른 유기산 또는 이들의 염, 및 상대적으로 소량의 시트르산염 또는 인산염을 추가로 포함할 수 있다. 당해 기술 분야의 숙련자는 액체 제형의 강직성을 제공하기에 적합한 추가적 약제를 인식하고 있다.
- [92] 또한, 본 발명의 바람직한 일 구체예에서, 항-ICAM4 항체 및 완충액을 포함하는 액체 약학적 제형은 등장제로서 염화나트륨을 추가로 포함할 수 있다. 제형 내의 염화나트륨 농도는 강직성에 대한 다른 성분의 기여도에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 염화나트륨의 농도는 약 50 mM 내지 약 300 mM, 약 50 mM 내지 약 250 mM, 약 50 mM 내지 약 200 mM, 약 50 mM 내지 약 175 mM, 약 50 mM 내지 약 150 mM, 약 75 mM 내지 약 175 mM, 약 75 mM 내지 약 150 mM, 약 100 mM 내지 약 175 mM, 약 100 mM 내지 약 200 mM, 약 100 mM 내지 약 150 mM, 약 125 mM 내지 약 175 mM, 약 125 mM 내지 약 150 mM, 약 130 mM 내지 약 170 mM, 약 130 mM 내지 약 160 mM, 약 135 mM 내지 약 155 mM, 약 140 mM 내지 약 155 mM, 또는 약 145 mM 내지 약 155 mM이다.
- [93] 본 발명의 액체 약학적 제형의 처리과정에서 냉동 해동 또는 기계적 전단에 기한 단백질 분해는 용액-공기 접면에서의 표면 장력을 낮추기 위하여 계면활성제를 제형에 편입시킴으로써 억제될 수 있다. 따라서 본 발명의 일 구체예에서, 액체 약학적 제형은 치료적 유효량의 항-ICAM4 항체, 완충액을 포함하며, 계면활성제를 추가적으로 포함한다. 본 발명의 다른 실시 상태에서, 액체 약학적 제형은 항-ICAM4 항체, 완충액, 등장제를 포함하며, 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다.
- [94] 사용되는 전형적인 계면활성제는 비이온성 계면활성제이며, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 예컨대, 폴리소르베이트 80 (Tween 80) 및 폴리소르베이트 20 (Tween 20); 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 에스테르 예컨대, 플루로닉 F68; 폴리옥시에틸렌 알콜 예컨대, 브리지(Brij) 35; 시메티콘; 폴리에틸렌 글리콜 예컨대, PEG400; 라이소포스파티딜콜린; 및 폴리옥시에틸렌-p-t-옥틸페놀 예컨대, 트리톤 X-100을 포함한다. 계면활성제 또는 에멀전화제에 의한 전통적인 약제의 안정화는, 예를 들면, 문헌 Levine et al. (1991) J Parenteral Sci.

Technol. 45(3):160-165에서 설명하였으며, 본원에서 참고자료로서 포함되어 있다.

[95] 한편, 상기 항체는 치료 효과를 증진시키기 위하여 독성 물질들과 결합되어 융합단백(fusion protein)을 형성할 수 있다. 독소 단백질로는 리신(ricin), 사포린(saporin), 젤로닌(gelonin), 모로딘(momordin), 디프테리아독소, 또는 녹농균독소(pseudomonas toxin)일 수 있으나, 특별히 그 종류를 제한하는 것은 아니다.

[96] 또한, 본 발명은 상기 항체치료제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 ICAM4의 발현 여부나 발현 정도와 관련된 질환 또는 ICAM4 매개되는 질병의 치료 방법을 제공한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "개체"란 포유동물로서 인간, 말, 개, 고양이, 돼지, 염소, 토끼, 햄스터, 원숭이, 기니피그(guinea pigs), 래트, 마우스, 도마뱀, 뱀, 양, 소, 물고기 및 새를 포함하여 임의의 동물(예컨대, 인간)을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명에 따른 항-ICAM4 단일클론항체(이의 개량된 항체를 포함함) 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물의 투여로 상기 질병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.

[97] 본 발명의 항-ICAM4 단일클론항체(이의 개량된 항체를 포함함)는 다양한 목적을 위해 다른 항체, 생물학적 활성을 가지는 제제 또는 물질과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-ICAM4 단일클론항체는 공지의 항암 약물과도 병용하여 사용될 수 있다

[98]

### 발명의 실시를 위한 형태

[99] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[100] 실험 재료 및 방법

[101] 1. 세포주

[102] 실험에 사용된 세포주 K562 (ATTC, #CCL-243), HEL (ATTC, #TIB-180), TF-1 (ATTC, #CRL-2003), PLC/PRF/5 (ATTC, #CRL-8024), Hep3B (ATTC, #HB-8064), SK-HEP-1 (ATTC, #HTB-52), HepG2 (ATTC, #HB-8065), C3A (ATTC, #CRL-10741), 786-O (ATTC, #CRL-1932), Huh-7 (KCLB, #60104), SNU-308 (KCLB, #00308), SNU-601 (KCLB, #00601)은 10% FBS(CORNING, USA)가 포함된 RPMI 배지(Welgene, Korea)에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건으로 배양하였다.

[103] 2. 항체치료제 생산용 세포주 개발

[104] 인간 항체 불변부위가 함께 발현되도록 제작된 pOptiVEC, pcDNA3.3 벡터(DiNonA, Korea)에 항-ICAM4 마우스 항체 1E1의 가변부위를 암호화하고

있는 DNA를 삽입하고, 제작된 재조합 벡터를 디히드로엽산환원효소(DHFR) 음성 세포주인 CHO DG44 (Invitrogen, #A1100001)에 lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) 시약을 사용하여 형질주입 하였다. 형질주입된 세포만 선별하기 위해서 테옥시리보뉴클레오사이드를 포함하지 않는  $\alpha$ MEM배지(Welgene, Korea)에서 계대배양 한 후, 항체 생산 수율을 높이기 위해서 MTX (Sigma, USA)과 G418 (Invitrogen, USA)을 첨가한 PowerCHO (LONZA, Switzerland)배지로 교체 하여 배양하였다. MTX와 G418 첨가 농도를 점진적으로 높여주면서 96 well plate (SPL, Korea)에서 세포 배양액을 well 당 1개 이하의 세포가 들어갈 정도로 희석하여 배양하는 한계희석배양법(limiting dilution)을 진행하여 단일 클론을 확보하였다.

[105]

[106] **3. 유세포 분석**

[107] 다양한 기원의 세포주들을  $5 \times 10^5$ 개씩 준비한 후에 항-ICMA4 키메릭 항체 1E1을  $10 \mu\text{g/mL}$ 로 넣고,  $4^\circ\text{C}$ 에서 30분간 반응시켰다. 그 다음 차가운 PBS로 세척하고 FITC 형광이 결합된 항-인간 면역글로불린(DiNonA, Korea)을  $4^\circ\text{C}$ 에서 20분간 반응시켰다. 다시 차가운 PBS로 세척하고 1% 파라포름알데하이드(Sigma-Aldrich, USA)로 고정한 후에 형광 활성화 유세포 측정기 FACS Calibur (BD, USA)를 이용하여 분석하였다.

[108]

[109] **4. 인간화항체 제작**

[110] 항-ICAM4 마우스 항체 1E1의 가변부위 아미노산 서열의 *in silico* 인간화를 프랑스의 BIOTEM사에 의뢰하였다. BIOTEM사에서 받은 중쇄 13개, 경쇄 8개 아미노산 서열을 코스모진텍(Seoul, Korea)에 코돈최적화를 의뢰하여 각각의 아미노산을 암호화하는 발현 최적의 DNA 서열을 확보하였다. 확보한 DNA 서열을 인간 항체 불변부위가 함께 발현되도록 제작된 pcDNA3.4 발현벡터(DiNonA, Korea)에 삽입하고, 호스트 세포 HEK-293T(ATCC, #CRL-11268)에 형질 주입하여 총 104개 조합의 인간화항체를 발현시켰다. (서열번호 11 내지 서열번호 31)

[111]

[112] **5. 항-ICAM4 마우스 항체 1E1-사포린(m1E1-SAP) 복합체 개발**

[113] 항-ICAM4 마우스 항체 1E1과 사포린(Sigma-Aldrich, USA)의 결합은 관련 논문을 참고하여 진행하였다[Jeon YK, et al. Targeting of a developmentally regulated epitope of CD43 for the treatment of acute leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(12):1697-706]. 간략히 설명하면, 항-ICAM4 마우스 항체 1E1을 N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate (SPDP)로 활성화 시킨 다음 분자량 1대 5 비율로 티올레이트화된 사포린과 결합시켰다. 결합되지 않은 메르캡토기(SH-)를 차단하기 위하여 N-ethylmaleimide를 첨가하였고, 단백질 G 친화성 크로마토그래피로 결합되지 않은 비 결합 사포린을 제거하였다. 결합된

항체-약물 복합체를 ImmunoPure 용출 완충액 (Pierce Biotechnology, USA)로 용출시키고 PBS에 투석하였다. 유리 사포닌에 의한 오염 가능성은 SDS-PAGE으로 확인하였다.

[114] **6. 항체-약물 복합체의 유효성 시험법**

[115] **1) 항-ICAM4 마우스 항체 1E1-사포린(*m1E1-SAP*) 유효성 시험**

[116] 96 well plate에 well 당 적백혈병 세포주 K562  $5 \times 10^4$ 개씩 분주하고 항체-약물 복합체를 농도별로 3개씩 처리하였다. 37°C에서 72시간동안 배양시키고, 세포 생존능 측정은 tetrazolium salt를 이용하여 살아있는 세포의 양을 측정하는 Ey-cytox(DOGEN, Korea)를 이용하였다.

[117]

[118] **2) 항-ICAM4 키메라 항체 1E1-엠탄신(*chi1E1-DM1*) 유효성 시험**

[119] 24 well plate (SPL, Korea)에 well 당 적백혈병 세포주 K562  $1 \times 10^5$ 개씩 분주하고 항체-약물 복합체를 농도별로 처리하였다. 2시간동안 배양시키고, 세포 생존능 측정은 Propidium iodide (PI) staining 한 후에 사멸세포를 유세포 분석을 통하여 진행하였다.

[120] **7. 적백혈병 이종이식 동물모델**

[121] 적백혈병 이종이식 동물모델은 SCID 마우스(중앙실험동물, Korea)에 적백혈병 세포주인 HEL로 확립하였다. 먼저 한 마리당 혈청이 들어있지 않은 RPMI배지 100  $\mu$ L에  $1 \times 10^7$ 으로 준비한 HEL 세포를 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 접종하였다. 이식한 종양의 크기가 100 mm<sup>3</sup>가 되었을 때 항체-약물 복합체의 유효성을 시험하였다. 항체-약물 복합체를 2.5 mg/kg의 용량으로 3일 간격으로 4번 마우스 꼬리 정맥에 투여하였고, 종양의 길이와 너비를 caliper로 3 일에 한 번씩 측정하여 Gutman 등이 제안한 방법의 공식으로 종양의 부피를 산출하였다.

[122]

[123] **8. 뉴라민가수분해효소 처리 농도 구배에 따른 항체 반응성 시험법**

[124] 한 시험당 적백혈병 세포주 K562  $2 \times 10^5$ 개와 정상 적혈구  $4 \times 10^7$ 개에 뉴라민가수분해효소(ELPIS, Korea)를 0, 125, 500, 1000 unit로 처리한 후 37°C에서 40분 동안 반응 시켜서 세포 표면의 시알릴화 정도의 차이를 형성하였다. 시알릴화 정도의 차이는 항-ICAM4 키메라 항체 1E1으로 유세포 분석을 통해 확인하였다.

[125]

[126] **9. 이중특이성 항체 제작**

[127] 이중특이성 항체는 scFv-Fc 형태로 제작되었으며, 항-ICAM4 항체의 가변부위와, 종양과 관련 있는 표적에 대한 항체의 가변부위 DNA를 overlap PCR을 통해 scFv 형태로 제작하였다. 중쇄와 경쇄의 가변부위를 하나로 연결하기 위해 사용된 링커 서열은 G-G-S-S-R-S-S-S-G-G-G-G-S-G-G-G-G-(서열번호 10)이며, PCR은 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 45초 조건에서 30회 진행하였다. 항체 가변부위 scFv를

인간 항체의 불변부위가 함께 발현되도록 제작된 pOptiVEC 발현벡터(DiNonA, Korea)에 삽입하고, 호스트 세포 HEK-293T에 형질주입하여 scFv-Fc 형태의 이중특이성 항체를 발현시켰다.

[128]

[129] **10. 면역조직화학염색**

[130] 시험에 사용된 파라핀 포매조직은 충북대학교 병원에서 제공받았다. 상온에서 자일렌과 에탄올을 이용한 탈파라핀 과정을 통해 파라핀을 제거하고, 마이크로웨이브를 이용해 10mM 구연산 버퍼(sodium citrate, ph 6.0)로 15분간 항원을 재생시켰다. 1차 항체는 10 µg/mL 농도로 200 µL씩 사용하였고, ChemMate Detection kit (Dako, Denmark)를 이용하여 발색하였다.

[131] **실험결과**[132] **1. 항-ICAM4 재조합 항체치료제의 개발**[133] **1) 항-ICAM4 키메라 항체 1E1 (*chi1E1*) 생산용 세포주 개발**

[134] 항-ICAM4 키메라 항체 1E1을 안정적으로 생산하는 세포주를 만들기 위해서 발현벡터는 pOptiVEC과 pcDNA3.3을 사용하였고, 호스트 세포로는 CHO DG44 세포주를 사용하였다(도 1a). 호스트 세포에 1E1 항체치료제의 유전자가 삽입된 발현 벡터를 형질주입(transfection) 한 후 선별배지를 통하여 형질 주입된 세포만을 선별하였고, 생산성 향상을 위하여 MTX와 G418 약제를 사용하였다. 약제의 농도를 높여주면서 한계희석배양법을 진행하였고, 20계대 이상 배양 후 최종적으로 1000 nM MTX와 200 µg/mL G418이 첨가된 PowerCHO2 배지 조건에서 안정적으로 키메라 항체 1E1을 생산하는 세포주를 확보하였다(최종생산농도 7.5 mg/L). 일련의 생산용 세포주 제작 과정을 도 1b에 도식화 하였다.

[135]

[136] **2) 항-ICAM4 키메라 항체 1E1의 세포 반응성 비교분석**

[137] 항-ICAM4 키메라 항체 1E1 생산용 세포주로부터 생산 된 키메라 항체 1E1의 항원결정부위 동정을 위해서 원래의 마우스 항체 1E1로 표적 세포의 항원을 포화시킨 후 항-ICAM4 키메라 항체 1E1 생산용 세포주로부터 생산 된 키메라 항체 1E1의 반응성을 확인한 결과 같은 항원결정부위를 인지하는 것을 확인하였다(도 2a). 또한 키메라 항체 1E1의 항원 친화도 분석을 위하여 ICAM4가 과발현된 세포주와 발현되지 않은 세포주를 대상으로 유세포 분석을 시행하였고, 키메라 1E1 항체치료제의 농도 구배에 따라서 ICAM4 과발현 세포주에서의 반응성이 점차 증가하는 것을 확인하였다. 반대로 ICAM4가 발현되지 않은 세포주에서는 항체의 농도와 상관없이 반응성이 증가하지 않았다(도 2b). K562 세포에서 키메라 1E1 항체치료제의 항원 포화농도는 5 µg/mL로 원래의 마우스 항체 1E1과 유사하였다.

[138]

[139] **3) 항-ICAM4 인간화항체 제작**

[140] 항-ICAM4 키메릭 항체의 면역원성을 줄이기 위해 인간화항체들을 제작하고 선별하였다. 프랑스의 BIOTEM사로부터 *in silico*로 중쇄 가변부위 13개, 경쇄 가변부위 8개 버전 총 104개 조합의 항-ICAM4 인간화항체 서열을 얻었다(표 1).

[141] [표1]

수용체 서열로 사용되는 인간 생식세포 유래의 가변 부위를 갖는 마우스 유전자 또는 그들의 인간화 항체의 동일성 비교(%)

IMGT human germline		Hybridoma	Humanized versions				
			A*	B	C	D	E
<Heavy chain>	IGHV4-59*05	60.8	77.3	79.3	79.3	81.4	
	IGHV3-11*01	51.6	74.5	76.5	77.6	76.5	78.6
	IGHV5-51*01	45.4	73.5	75.5	74.5	76.5	
<Light chain>	IGKV1-9*01	75.8	88.4	90.5	90.5	92.6	
	IGKV3-11*01	67.4	81.1	84.2	85.3	87.4	

[142] \* In framework, the parental mouse residues at Kabat positions H24, H29, H48, H67, H78, L2, L4, L38 and L44 have been retained in version A.

[143] 유전자 클로닝을 통하여 pcDNA3.4 발현벡터에 중쇄 13개, 경쇄 8개 유전자를 각각 삽입하여 104개 재조합 인간화항체를 293T 세포에 임시발현 시켜 기존 키메릭 항체와의 항원친화도를 비교분석 하였다. 항원 발현 세포주에 대한 결합 친화도를 기준으로 기존 재조합 키메릭 항체와 유사한 친화도를 보이는 인간화항체 조합을 4개 선별하였다(도 4a). 키메릭 항체와 마찬가지로 선별된 인간화항체의 항원결정부위를 확인한 결과 원래의 마우스 항체 1E1과 같은 항원결정부위를 인지하는 것을 확인하였다(도 4b). 추가로 분자 모델링에 의한 마우스 항체 1E1 가변부위의 3D 구조를 구축하여 CDR-grafting 과정에서 발생 할 수 있는 항체 가변부위 구조의 변형을 예측할 수 있었다(도 3).

[144] \* In framework, the parental mouse residues at Kabat positions H24, H29, H48, H67, H78, L2, L4, L38 and L44 have been retained in version A.

[145] 유전자 클로닝을 통하여 pcDNA3.4 발현벡터에 중쇄 13개, 경쇄 8개 유전자를 각각 삽입하여 104개 재조합 인간화항체를 293T 세포에 임시발현 시켜 기존 키메릭 항체와의 항원친화도를 비교분석 하였다. 항원 발현 세포주에 대한 결합 친화도를 기준으로 기존 재조합 키메릭 항체와 유사한 친화도를 보이는 인간화항체 조합을 4개 선별하였다(도 4a). 키메릭 항체와 마찬가지로 선별된

인간화항체의 항원결정부위를 확인한 결과 원래의 마우스 항체 1E1과 같은 항원결정부위를 인지하는 것을 확인하였다(도 4b). 추가로 분자 모델링에 의한 마우스 항체 1E1 가변부위의 3D 구조를 구축하여 CDR-grafting 과정에서 발생 할 수 있는 항체 가변부위 구조의 변형을 예측할 수 있었다(도 3).

[146]

[147] **4) 항-ICAM4 인간화항체의 1E1 결합 친화도 확인**

[148] 상기 3)에서의 가변부위 구조적 변형에 대한 예측을 토대로, 실제 인간화항체의 결합친화도에 변화가 있는지 여부를 조사하였다. 키메릭 항체와 인간화항체의 4가지 조합을 비교한 결과, 일부 인간화항체 조합에서 1E1 결합 친화도가 증가하는 클론이 관찰되었다. 이는 특히 VH1A(서열번호 8) 및 VL2A(서열번호 25)의 조합에서 가장 증가되는 경향을 보였고, VH2A(서열번호 12) 및 VL2C(서열번호 27)의 조합에서도 결합친화도가 증가되는 경향을 보였다.(도 5)

[149]

[150] **5) 항-ICAM4 항체-약물 복합체 개발**

[151] 먼저 항-ICAM4 마우스 항체 1E1 사포린 복합체(*m1E1-SAP*)는 마우스 항체 1E1과 사포린에 SDPD와 2-Iminothiolane으로 각각 메르캡토기(SH-)를 붙여주어 항체와 약물을 이황화 결합을 통하여 연결하였고(도 6a), 항-ICAM4 키메릭 항체 1E1 엠탄신 복합체(*chi1E1-DM1*)은 키메릭 항체 1E1에 succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMMC) 링커를 이용해 엠탄신이 3개에서 4개가 연결된 구조로 이루어져 있으며 미국 Creative Biolabs사에 의뢰해서 제작하였다(도 6b).

[152]

[153] **6) 항-ICAM4 항체-약물 복합체의 유효성**

[154] 개발한 항-ICAM4 항체-약물 복합체 *m1E1-SAP*와 *chi1E1-DM1*의 유효성을 검증 해 본 결과, *in vitro*에서 *m1E1-SAP*와 *chi1E1-DM1*을 K562와 HEL 세포주를 대상으로 세포 생존력을 측정하였을 때  $IC_{50}$ 값이 각각 10 ng/mL, 3.7  $\mu$ g/mL로 항체-약물 복합체 농도 의존적으로 세포 생존력이 감소하였도(도 7a, 7b), 적백혈병 세포주 이종이식 SCID 마우스 *in vivo* 모델에서 *chi1E1-DM1*이 약 73%의 종양성장 억제 효능을 보였다(도 8).

[155]

[156] **2. 항-ICAM4 항체치료제의 독성 시험**

[157] **1) 뉴라민가수분해효소 처리 농도 구배에 따른 항-ICAM4 항체의 반응성**

[158] 항-ICAM4 항체치료제가 정상 적혈구에 결합하여 생길 수 있는 부작용을 줄이기 위하여 뉴라민 가수분해효소를 농도별로 종양세포주와 적혈구에 처리하여 항-ICAM4 항체치료제가 암세포주에는 반응하지만 적혈구에는 반응하지 않는 농도를 알아내었다(도 9a). 종양 세포주와 적혈구 표면 ICAM4 항원의 시알산화 정도의 차이를 측정하기 위하여 뉴라민 가수분해효소를 각각

1000 unit 처리한 후, 항-ICAM4 항체치료제의 반응성을 측정한 결과 종양 세포주에서는 거의 변함없이 결합이 유지되었지만, 적혈구에서의 반응성이 소실되었다(도 9b). 실제 혈액암 환자 생체환경과 유사하게 정상 적혈구와 종양 세포가 혼재된 조건에서 뉴라민 가수분해효소를 1000 unit을 처리하여 정상 적혈구에 대한 항-ICAM4 항체의 반응성은 줄어들고 종양 세포에 대한 반응성이 증가함을 확인하였다(도 9c).

[159]

[160] **2) 항-ICAM4 이중특이성 항체 개발**

[161] Acute Myeloid Leukemia에 특이적으로 발현되는 ICAM4 (CD242)와 CEACAM6 (CD66c)를 표적으로 하는 인간화 항체의 서열을 조합하여 새로운 물질인 이중항체를 개발하였다. 이중항체는 ICAM-4를 표적으로 하는 whole IgG1 항체 Fc 부분의 CH3 도메인 말단에 CEACAM6를 표적으로 하는 variable region 중쇄와 경쇄를 특정 서열로 연결시킨 single chain fragment variable(scFV) 부분을 연결시켜서 개발하였다. ICAM-4를 표적으로 하는 중쇄, 경쇄 조합은 pcDNA 3.4 벡터를 이용해 발현시킨 재조합 인간화 서열 104개의 조합 중 중쇄1A-경쇄1A(w1s2H1L3), 중쇄1A-경쇄2A(w1s2H1L4), 중쇄1B-경쇄1A(w1s2H2L3), 중쇄1B-경쇄2A(w1s2H2L4)를 사용하였고 아래 scFV로 사용된 CEAMCAM 6를 표적으로 하는 중쇄, 경쇄 부분은 E3 서열을 사용하였다. 다른 조합으로는 CEACAM6를 표적으로 하는 whole IgG1 항체 Fc 부분의 CH3 도메인 말단에 ICAM-4를 표적으로 하는 항체의 서열을 연결하였다. 이때 사용한 조합은 CEACAM6를 표적으로 하는 E3서열과 ICAM-4를 표적으로 하는 중쇄1A-경쇄1A(w2s1H1L3), 중쇄1B-경쇄2A(w2s1H2L4) 서열을 조합하여 사용하였다. 총 6개 이중항체는 Expi CHO 세포를 이용하여 생산하였고, 정제된 항체를 이용하여 항원 결합까지 모두 확인하였다(도 10a). 이 이중항체는 항체의존 세포 독성실험에서 단일 항체보다 월등한 효과를 나타내었다. 그 중 ICAM-4를 표적으로 하는 항체의 경쇄 1A 서열로 조합된 w1s2H1L3, w1s2H2L3 항체가 가장 좋은 효과를 보였다.(도 10b, 10c)

[162]

[163] **3) 정상 조직에서의 항-ICAM4 항체의 면역 조직 화학적 성상 분석**

[164] 항-ICAM4 항체치료제의 조직교차반응을 확인한 결과 적혈구에 강한 양성 소견을 보였으며, 적혈구를 제외한 파라핀 포매된 태아조직(8주령) 및 성인 간, 신장, 자궁 등 검사를 시행한 모든 조직에 대한 교차반응성은 없었다(도 11). 추가로 동결절편 검사에서 정상의 인체 편도조직 및 정상 장기에서도 교차반응성이 관찰되지 않았다.

[165]

[166] **3. 항-ICAM4 항체치료제의 확대적응증**[167] **1) 다양한 인간 종양 세포주 선별검사**

[168] 다양한 기원의 종양 세포주에 대한 항-ICAM4 키메릭 항체 1E1의 반응성을

유세포 분석법으로 조사한 결과 키메라 항체 1E1은 일부 간암 세포주와 담관암 세포주에서 20-30%의 발현을 확인할 수 있었고(표 2), 말초혈액 세포에서는 적혈구를 제외한 모든 세포에서 반응성이 없는 것을 확인하였다.

[169] [표2]

각종 인간 암 세포주에 대한 키메라 항체 1E1의 면역 반응성.

Cell line	Origin	Reactivity of <i>chi1E1</i>
K562	Erythroleukemia	++++
HEL	Erythroleukemia	++++
TF-1	Erythroleukemia	++++
PLC/PRF/5	Hepatocellular carcinoma	+
Hep3B	Hepatocellular carcinoma	+
SK-HEP-1	Hepatocellular carcinoma	-
HepG2	Hepatocellular carcinoma	+
C3A	Hepatocellular carcinoma	+
Huh-7	Hemochromatotic cell	+
SNU-308	Cholangiocarcinoma	++
HCCC-9810	Cholangiocarcinoma	-
GIST-T1	Gastrointestinal stromal tumors	-
SNU-601	Gastric carcinoma	-
786-O	Renal cell carcinoma	-

(% gated = -; <10%, +; 10-25%, ++; 25-50%, +++; 50-75%, ++++; 75-100%)

[170] 2) 임상시료분석

[171] ICAM4는 건강한 사람의 말초혈액 세포에서는 적혈구를 제외한 모든 세포에서 발현되지 않지만 여러 임상 시료를 선별검사 한 결과, 실제 골수형성이상증후군(MDS) 환자의 골수성미성숙세포(myeloblast)에서 일부 비정상적으로 ICAM4가 발현됨을 알아내었다(도 12).

[172] 이를 확인하기 위하여, 말기 암 환자 혈액 1 mL에 RBC lysis 버퍼 9mL을 넣고 36°C 에서 약 10분간 반응시켜서 적혈구를 제거 한 후, 세포 1×10<sup>6</sup>개에 CD45-APC (BD, USA), 1E1-FITC (DiNonA, Korea)를 4°C에서 30분간 반응시켰다. 그 다음 차가운 PBS로 반응이 끝난 세포를 세척하고 1% 파라포름알데하이드로 고정한 후에 형광 활성화 유세포 측정기 FACS Calibur (BD, USA)를 이용하여 분석하였다.

[173] 그 결과, 일부 암환자 샘플에서 항-ICAM4 항체(1E1)에 대한 항원이 높아져

있는 것을 확인하였다. 이 단핵세포 안에 MDSC가 높아져 있는 것으로 보이며, 이러한 결과는 1E1 항체의 타겟이 적백혈병에 국한되지 않는다는 것을 보여주는 것이다. (도 13)

[174]

[175] 4. 골수유래억제세포의 항-ICAM4 항체 표지 확인

[176] 임상시험 심사위원회(IRPB) 신청에 앞서 파일럿 조사를 위해 시험에 사용된 말초 혈액은 충북대학교 병원에서 제공받았다. 환자의 말초 혈액에서 말초 혈액 단핵구(PBMC)를 분리한 다음 항 ICAM-4 1E1 항체를 넣고 4°C에서 20분간 반응시킨다. 반응 후, 차가운 PBS로 세척한 다음 FITC 형광이 결합된 항-인간면역글로불린(GAH-FITC, DiNonA, Korea)로 처리하여 4°C에서 20분간 반응했다. 상기 반응 후, 차가운 PBS로 세척한 다음 1% 파라포름알데히드 (Sigma-Aldrich, USA)로 고정한 후에 형광 활성 유세포 측정기 FACS Calibur(BD, USA)로 측정하였다.

[177] 현재 가장 많이 쓰이는 골수 유래 억제 세포의 표면 마커는

CD33+CD11b+HLADR-인데, 고형암 환자의 혈액에서 골수 유래 억제 세포의 표면 마커인 CD33+CD11b+가 82.5%가 나왔다. 이 중 HLA DR- 가 70%인 것으로 보아, 고형암 환자의 혈액에는 골수유래억제세포가 존재 하는 것으로 확인할 수 있으며, 이 중 1E1 이 인지하는 ICAM4 항원이 37.85%로 나타났다. 따라서 골수 유래 억제 세포의 표면 마커로 ICAM4를 사용할 수 있음을 항-ICAM4 단일클론 항체 1E1으로 확인하였다. (도 14)

[178]

[179] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

#### 산업상 이용가능성

[180] 본 발명의 항 ICAM4 항체 및 이를 이용한 ICAM4 발현 질환에 대한 진단 또는 치료용 조성물은 기존의 항체와 비교하여 우수한 항원 친화도를 가지고 있으며, 개량된 형태로서 관련 질병에 따라 다양하게 적용가능하여, 해당 질병의 진단 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[181]

[182]

## 청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 내지 서열번호 5의 아미노산 서열 중 선택된 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR)의 중쇄 영역; 및 서열번호 6 내지 서열번호 9의 아미노산 서열 중 선택된 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR)의 경쇄 영역을 포함하는 항 ICAM4 항체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 항체는 키메릭 항체; 인간화 항체; 이중특이성 항체; 및 항체 약물 복합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC)를 이루는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,  
상기 키메릭 항체는 인간 항체 불변부위가 함께 발현되도록 제작된 것을 특징으로 하는 항체.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,  
상기 인간화 항체는 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 VH1A; 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 VH1B; 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진 VH1C; 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 VH1D; 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어진 VH2A; 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 VH2B; 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 VH2C; 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 VH2D; 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어진 VH2E; 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어진 VH3A; 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어진 VH3B; 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 VH3C; 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진 VH3D 로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.
- [청구항 5] 제2항에 있어서,  
상기 인간화 항체는 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어진 VL1A; 서열번호 25의 아미노산 서열로 이루어진 VL1B; 서열번호 26의 아미노산 서열로 이루어진 VL1C; 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어진 VL1D; 서열번호 28의 아미노산 서열로 이루어진 VL2A; 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 VL2B; 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어진 VL2C; 서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어진 VL2D로 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.
- [청구항 6] 제2항에 있어서,  
상기 이중특이성 항체는 상기 제1항의 항체; 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 링커; 및 다른 항원에 특이적인 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,

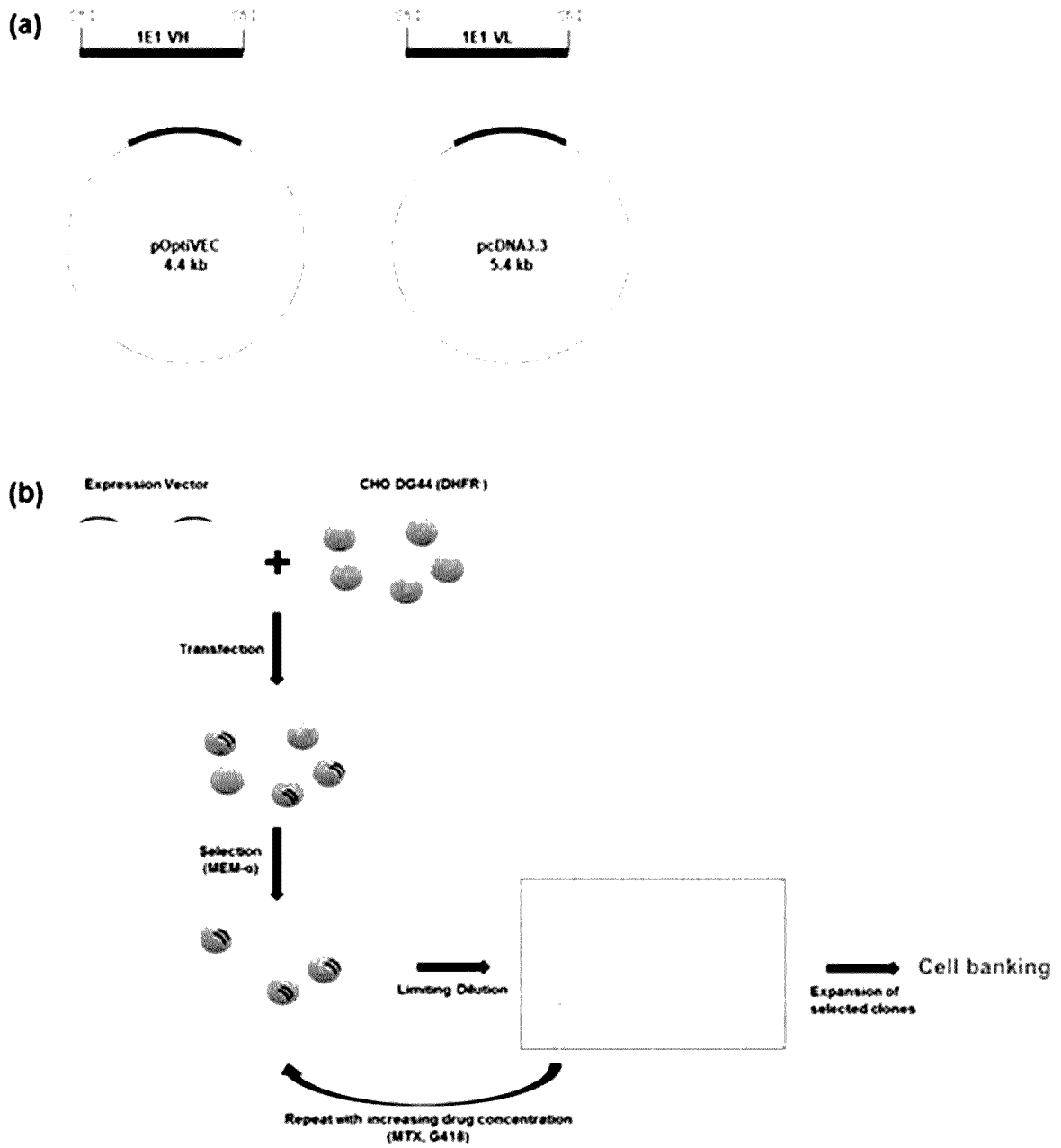
- 상기 이중특이성 항체에 결합된 상기 다른 항원에 특이적인 항체는, 항CEACAM1, 항CEACAM3, 항CEACAM4, 항CEACAM5, 항CEACAM6, 항CEACAM7, 항CEACAM8, 항CEACAM21, 항CEACAM16, 항CEACAM18, 항CEACAM19, 항CEACAM20, 항CD33 및 항CD11b 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체인 것을 특징으로 하는 항체.
- [청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 항체-약물 복합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC)는 제 1항의 항체 및; 사포린(saporin), 엠탄신(emtansine), 독소루비신(Doxorubicin), 카보플라틴(Carboplatin), 시스플라틴(Cisplatin), 시클로포스파미드(Cyclophosphamide), 이포스파미드(Ifosfamide), 니드란(Nidran), 질소머스타드(메클로에타민 염산염)[Nitrogen mustar(MechlorethamineHCL)], 블레오마이신(Bleomycin), , 미토마이신 C(Mitomycin C), 시타라빈(Cytarabine), 플루로우라실(Flurouracil), 겐시타빈(Gemcitabine), 트리메트렉세이트(Trimetrexate), 메토크렉세이트(Methotrexate), 에토포시드(Etoposide), 빈블라스틴(Vinblastine), 비노렐빈(vinorelbine), 알림타(Alimta), 알트레타민(Altretamine), 프로카바진(Procarbazine), 탁솔(Taxol), 탁소텔(Taxotere), 토포테칸(Topotecan) 및 이리노테칸(Irinotecan)으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 약물과 복합체를 형성하는 것을 특징으로 하는 항체.
- [청구항 9] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 ICAM4 관련 질환의 진단용 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 ICAM4 관련 질환은 백혈병, 간암, 담관암 또는 골수형성이상증후군(MDS)인 것을 특징으로 하는 진단용 조성물.
- [청구항 11] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 ICAM4 관련 질환의 치료용 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 ICAM4 관련 질환은 백혈병, 간암, 담관암 또는 골수형성이상증후군(MDS)인 것을 특징으로 하는 치료용 조성물.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물인, 치료용 조성물.
- [청구항 14] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 골수유래면역억제세포(Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) 감별용 조성물.
- [청구항 15] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 골수유래면역억제세포(Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) 활성화억제용 조성물.
- [청구항 16] a) 개체로부터 수득한 생물학적 시료에 제1항의 항체를 접촉시키는 단계;

b) 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체에 결합된 ICAM4 를 검출하는 단계; 및

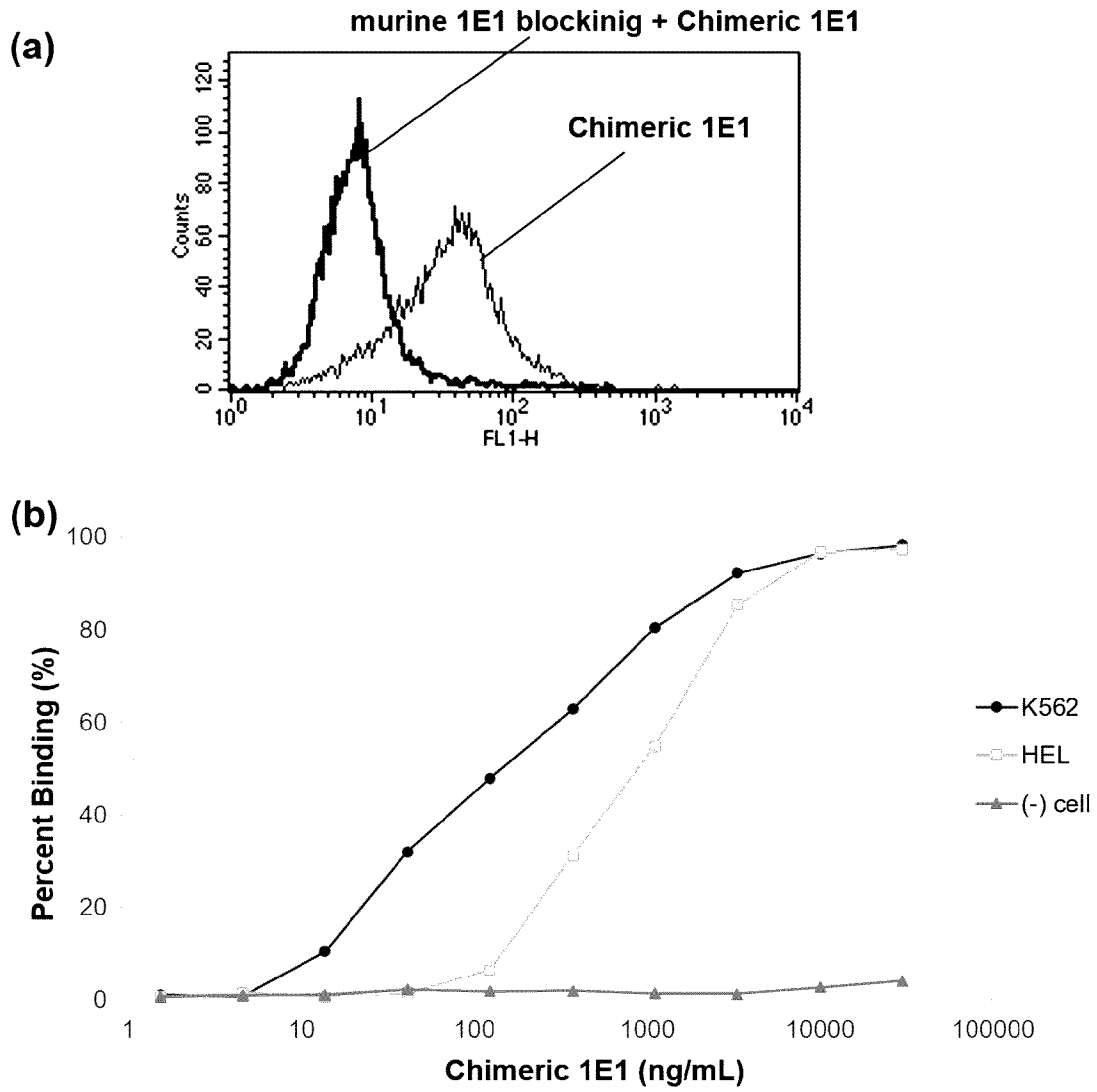
c) 상기 b)에서 검출된 ICAM4의 발현 정도를 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, ICAM4를 발현하는 백혈병, 간암, 담관암 또는 골수형성이상증후군(MDS) 진단을 위한 정보 제공방법.

[청구항 17] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체의 발현 여부를 통하여 ICAM4를 발현하는 백혈병, 간암, 담관암 또는 골수형성이상증후군(MDS)을 진단하는 방법.

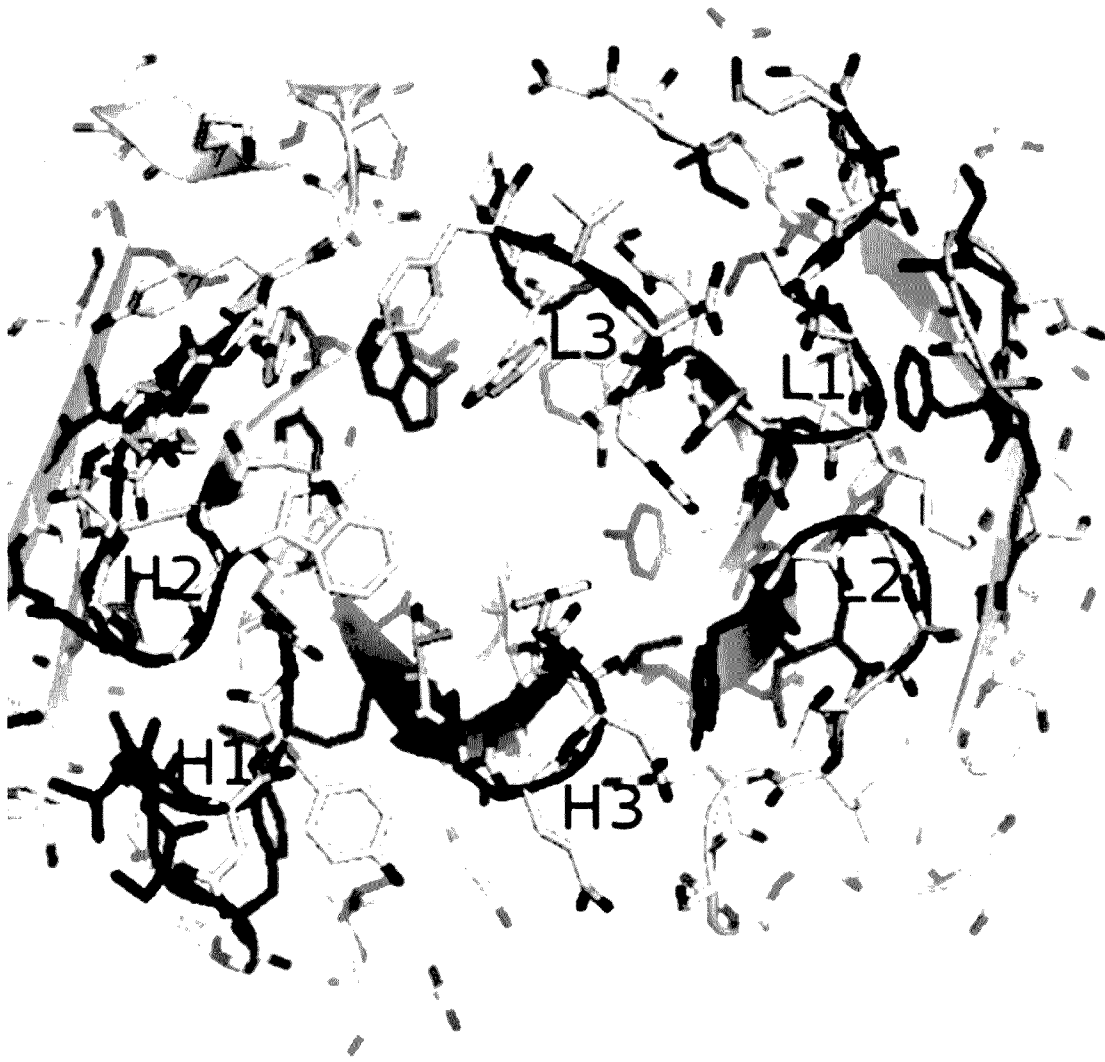
[도 1]



[도2]

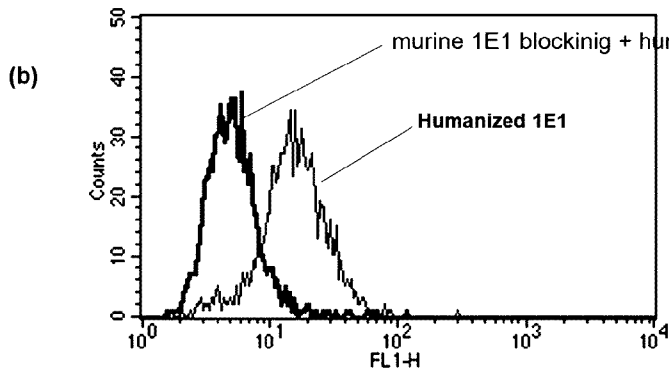
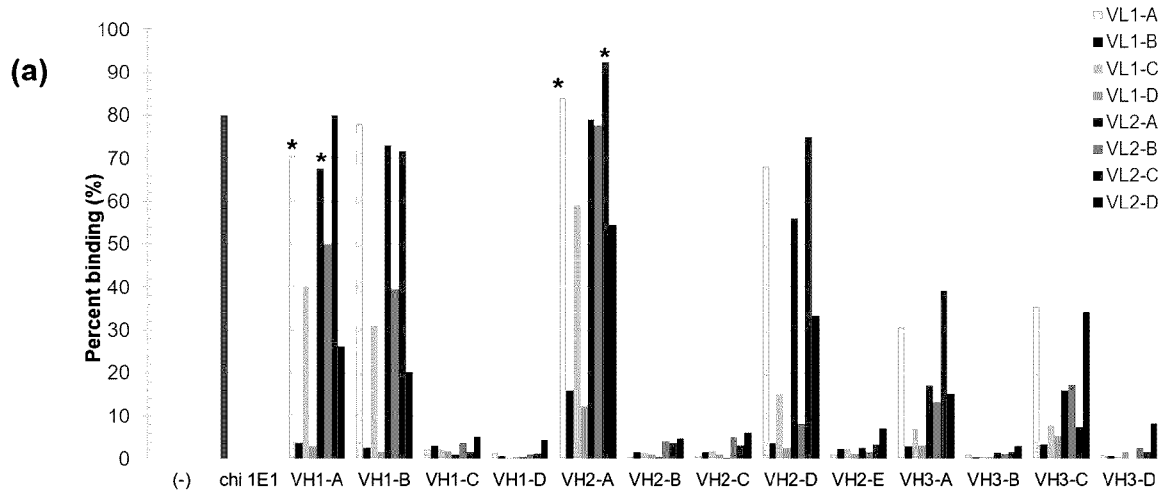


[도3]

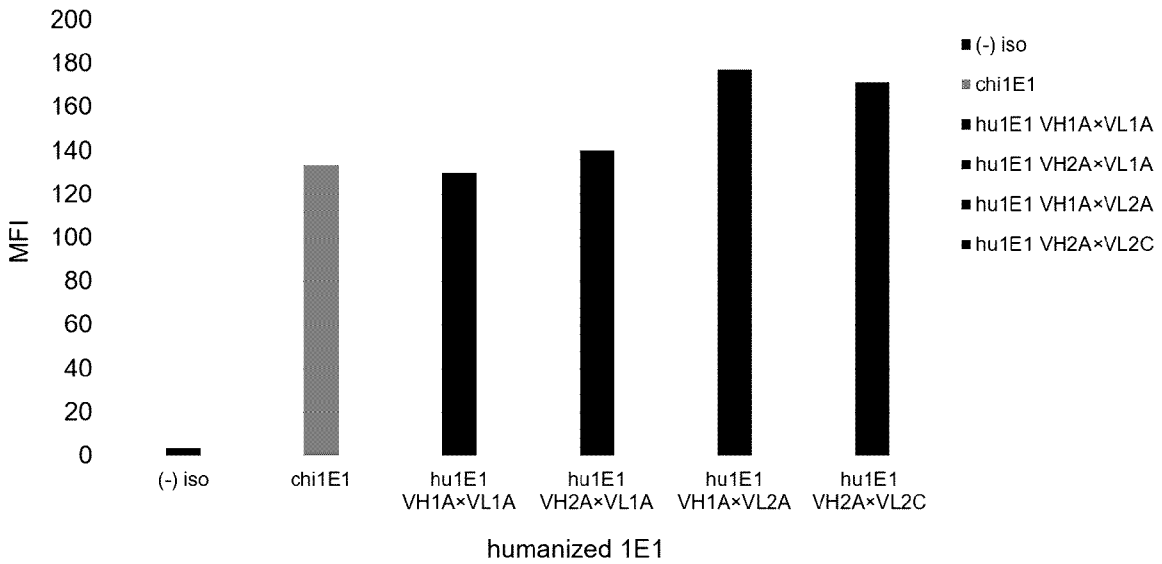


정정용지 (규칙 제91조) RO/KR

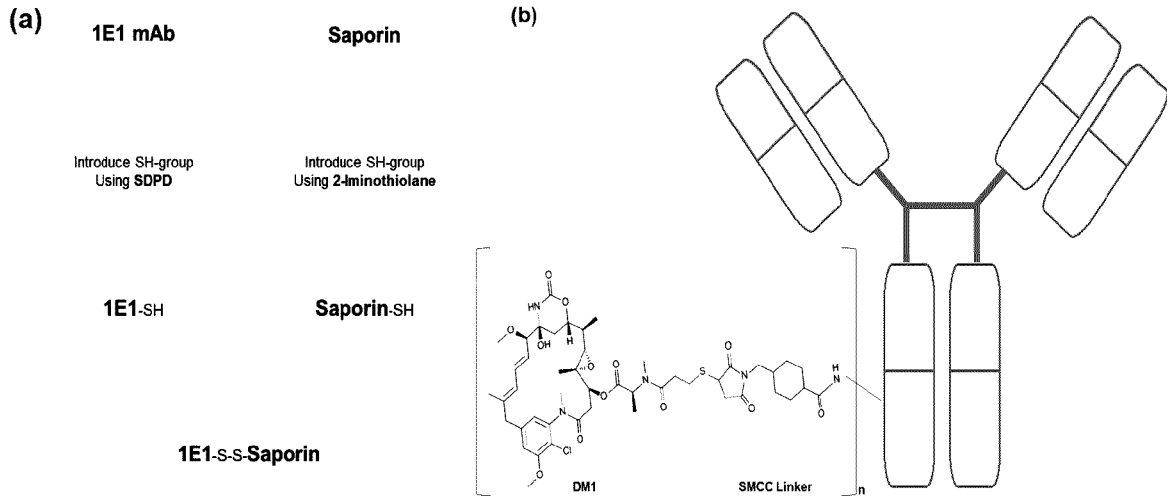
[도4]



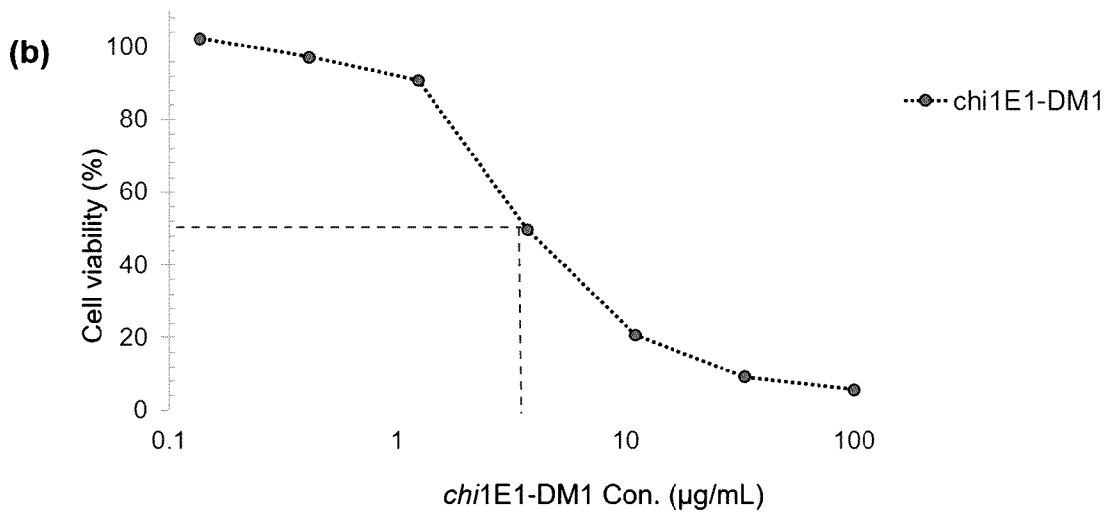
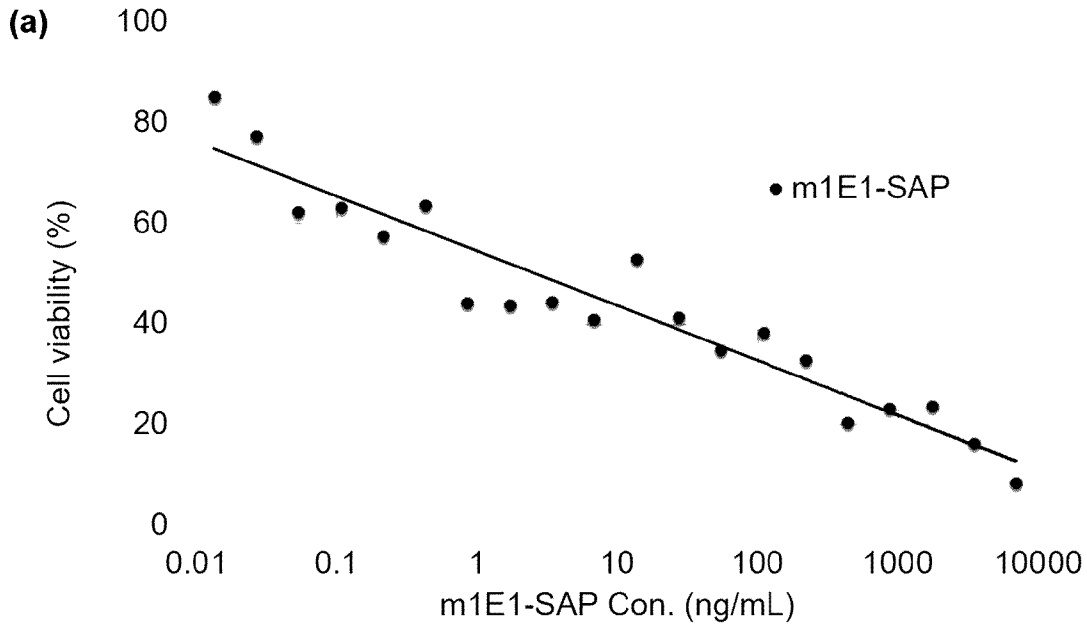
[도5]



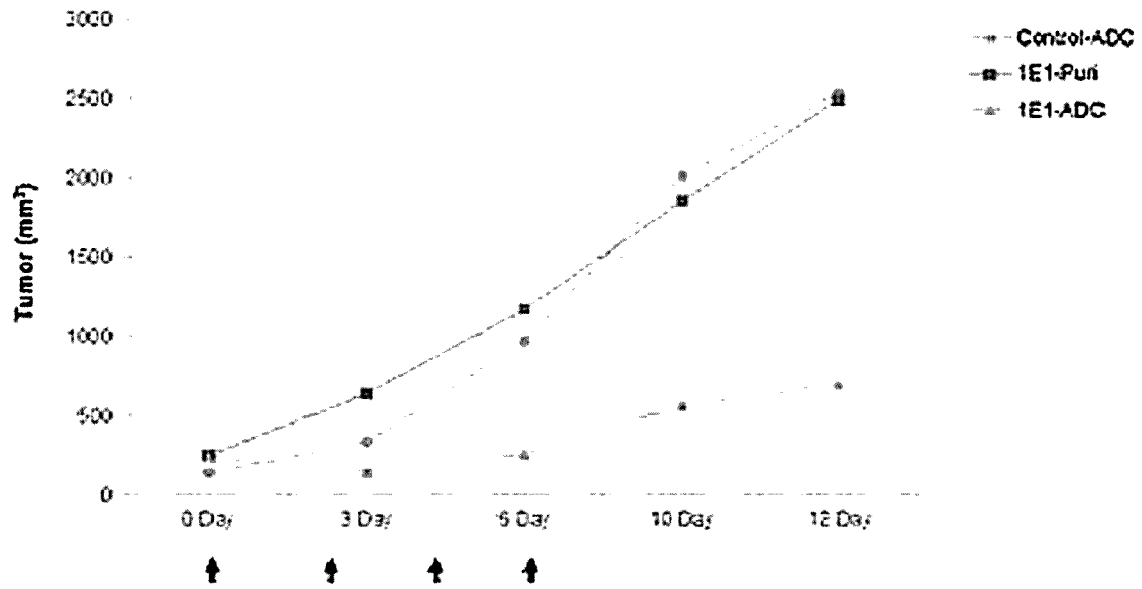
[도6]



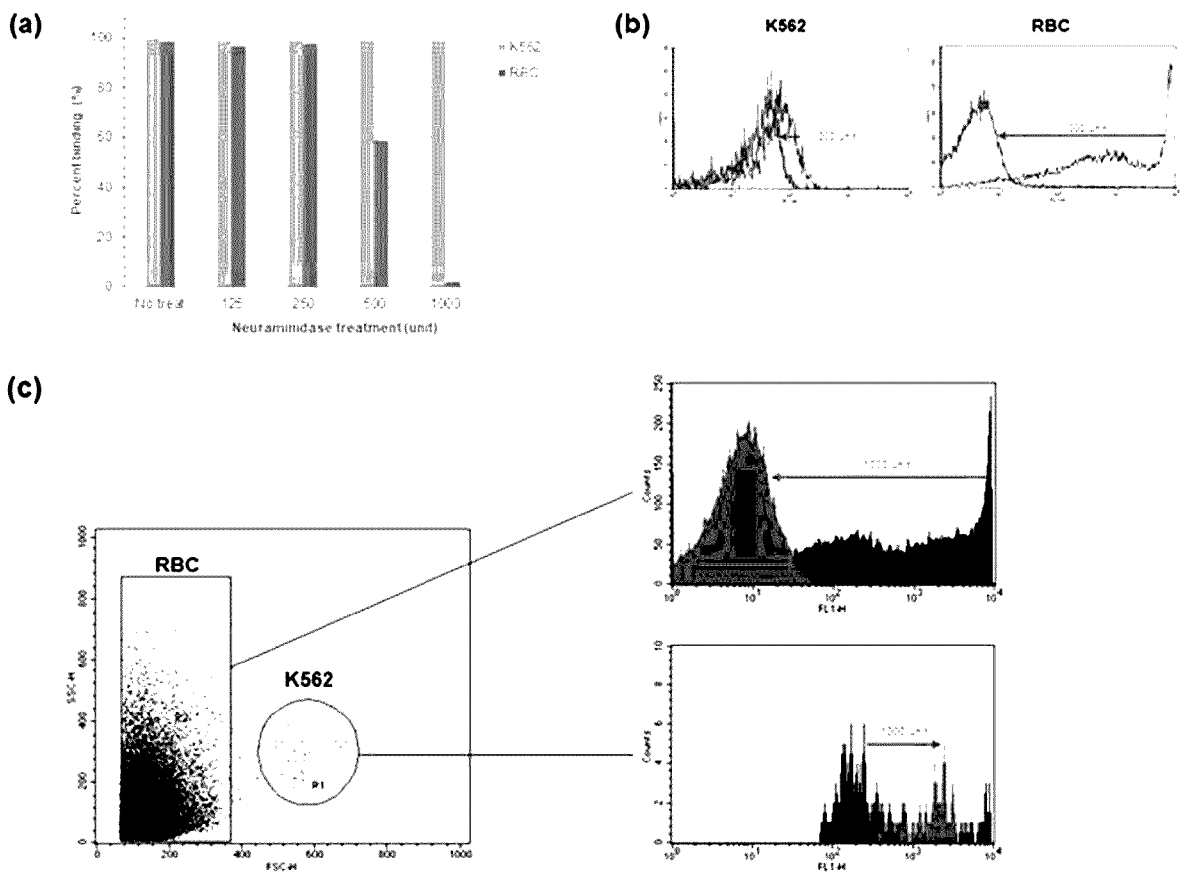
[도7]



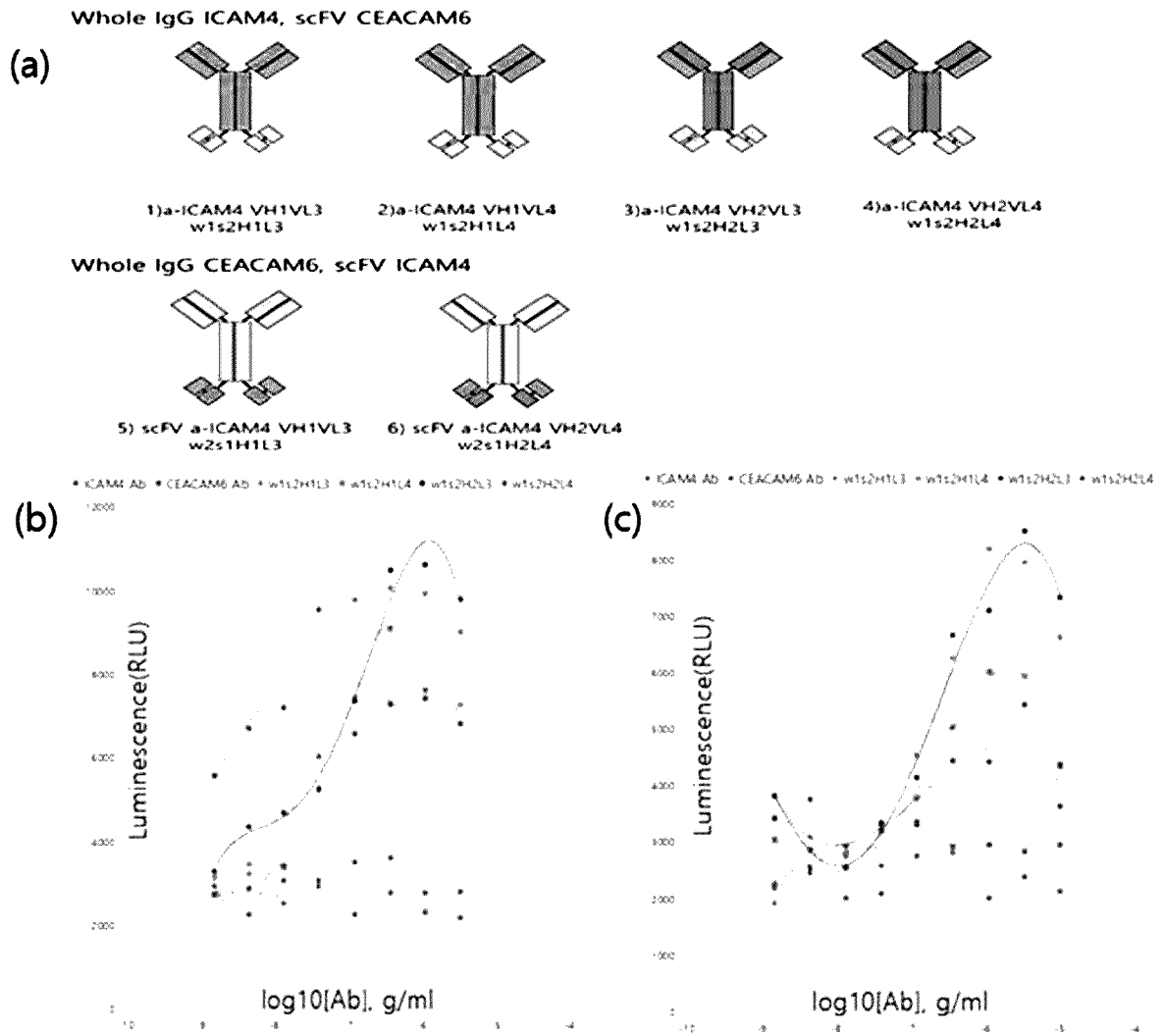
[도8]



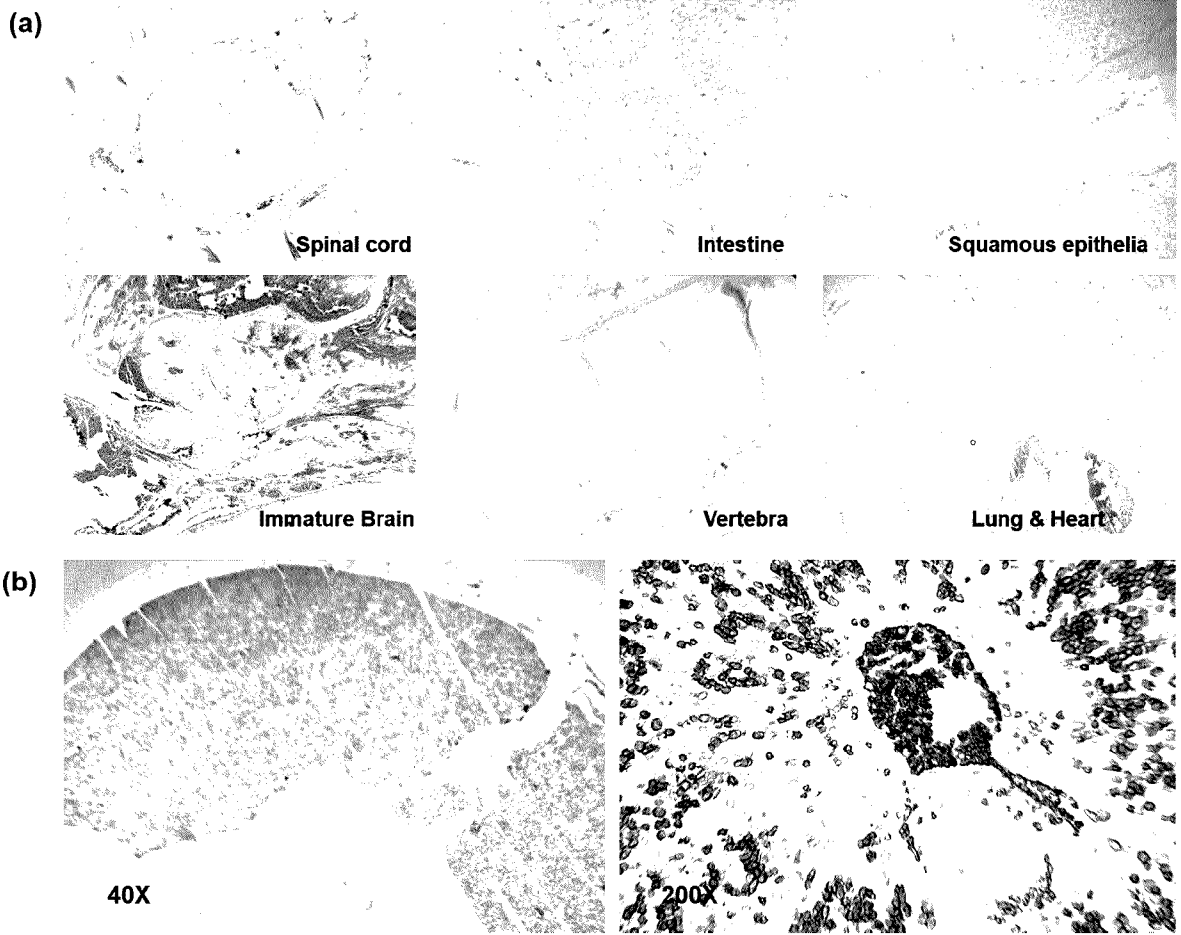
[도9]



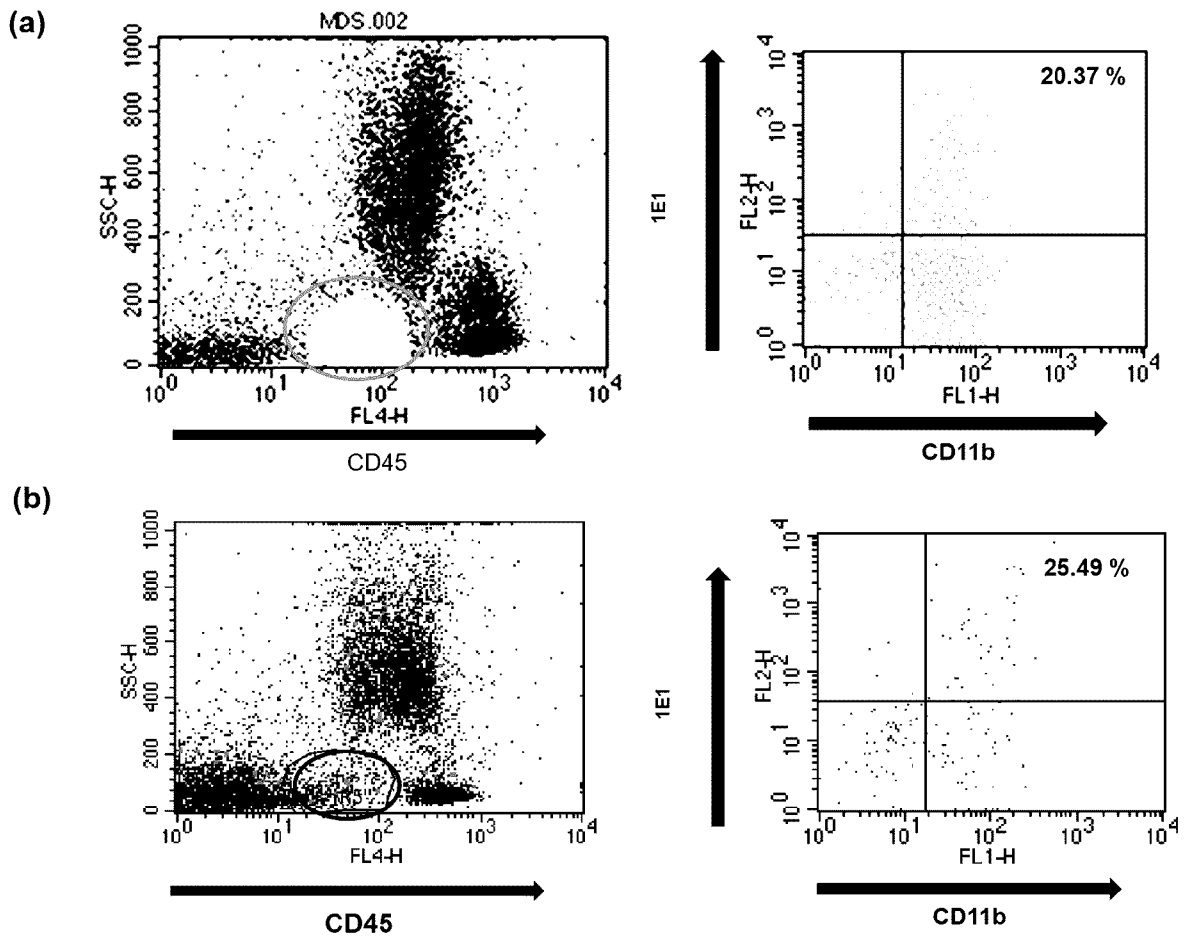
[도 10]



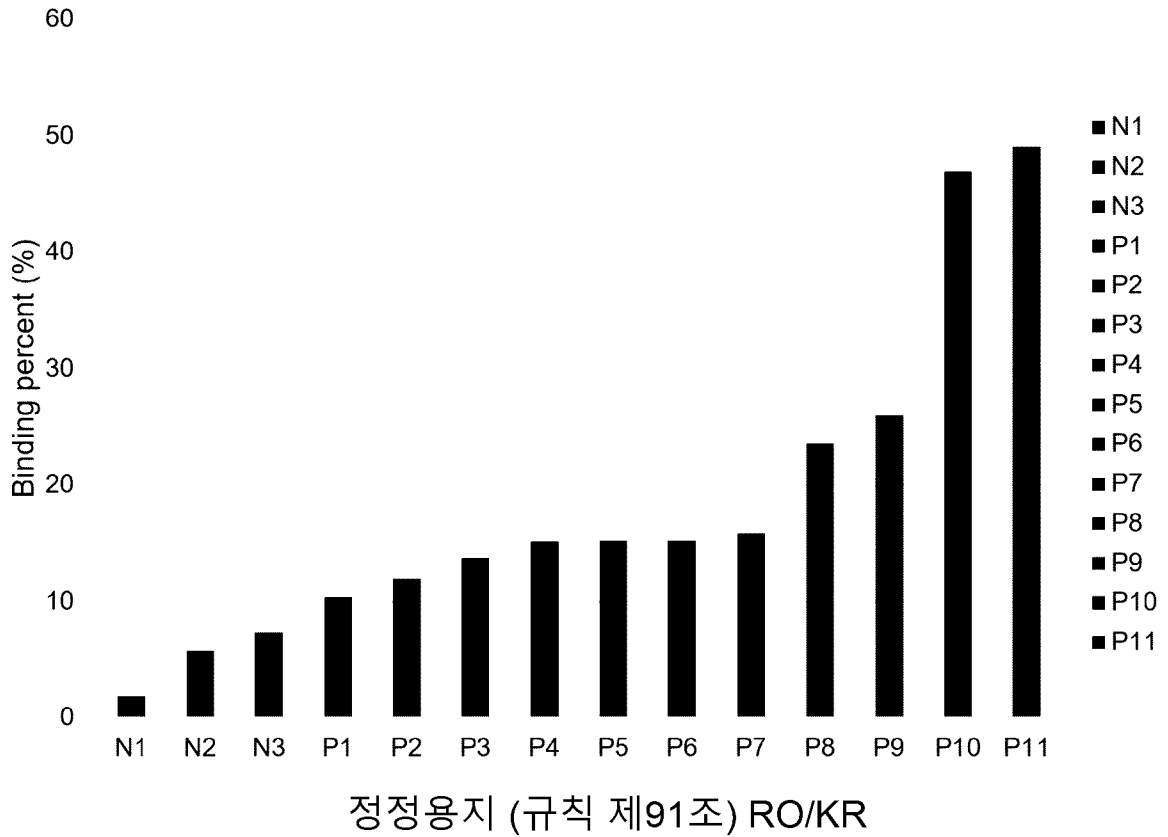
[도11]



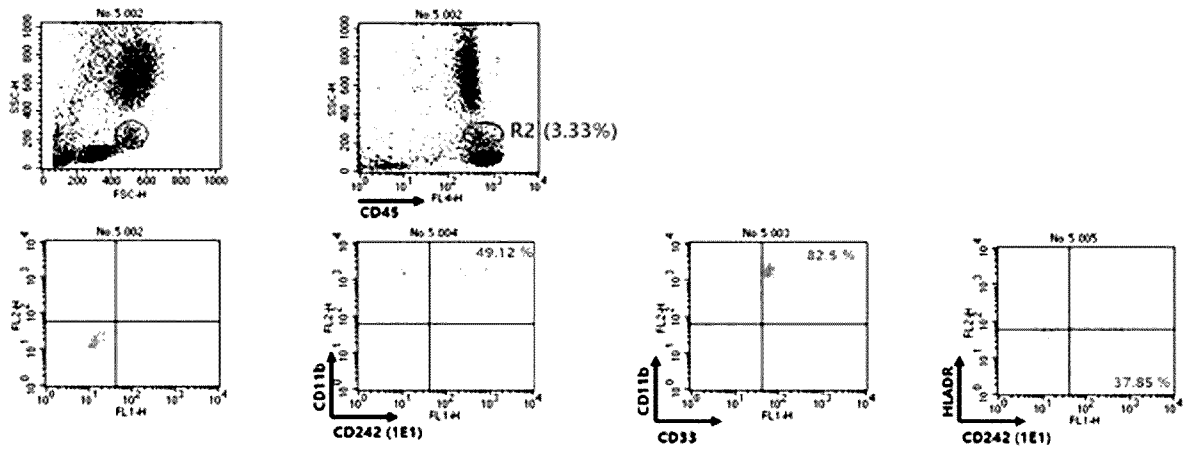
[도12]



[도13]



[도 14]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/014540

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C07K 16/18(2006.01)i, A61K 47/68(2017.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/574; A61K 31/4045; A61K 39/395; C07K 16/00; C07K 16/28; C07K 16/30; C12N 5/12; G01N 33/68; C07K 16/18; A61K 47/68; A61K 38/16; A61K 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above  
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: anti-ICAM4 antibody, climeric, bispecific, antibody-drug conjugate, myeloid-derived suppressor cells

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2015-0063859 A (CHUNGBUK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 10 June 2015 See claims 1-3, 7 and 9; sequence no. 3.	1,9-13,16,17
Y		2,3,6-8,14,15
A		4,5
Y	WO 2016-089950 A1 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.) 09 June 2016 See claims 2, 3 and 23; page 30, lines 3-15; page 32, lines 16-25.	2,3,6-8,14,15
Y	KR 10-2016-0058120 A (AMGEN INC. et al.) 24 May 2016 See claims 1 and 6; paragraphs [0110]-[0112].	6,7
A	US 5773293 A (KILGANNON, Patrick D. et al.) 30 June 1998 See the entire document.	1-17
A	LEE, G. et al., "Novel Secreted Isoform of Adhesion Molecule ICAM-4: Potential Regulator of Membrane-associated ICAM-4 Interactions", Blood, 01 March 2003, vol. 101, no. 5, pages 1790-1797 See the entire document.	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

15 MARCH 2019 (15.03.2019)

Date of mailing of the international search report

15 MARCH 2019 (15.03.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

 Korean Intellectual Property Office  
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,  
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2018/014540**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0063859 A	10/06/2015	KR 10-1627020 B1	02/06/2016
WO 2016-089950 A1	09/06/2016	US 2017-0362320 A1	21/12/2017
KR 10-2016-0058120 A	24/05/2016	AR 097648 A1	06/04/2016
		AU 2014-320246 A1	18/02/2016
		CA 2923354 A1	19/03/2015
		CN 105764505 A	13/07/2016
		EA 201690485 A1	31/08/2016
		EP 3043794 A2	20/07/2016
		IL 244529 A	21/04/2016
		JP 2016-536341 A	24/11/2016
		MA 38898 A1	31/01/2018
		MX 2016003197 A	02/06/2016
		PH 12016500434 A1	16/05/2016
		SG 10201801777 A	27/04/2018
		SG 11201600671 A	26/02/2016
		TW 201605473 A	16/02/2016
		US 2016-0317657 A1	03/11/2016
		WO 2015-036583 A2	19/03/2015
		WO 2015-036583 A3	02/07/2015
US 5773293 A	30/06/1998	AU 1066999 A	27/04/1999
		AU 6256096 A	30/12/1996
		AU 721316 B2	29/06/2000
		AU 735917 B2	19/07/2001
		CA 2107097 A1	05/08/1993
		CA 2196431 A1	19/12/1996
		CA 2196431 C	15/08/2000
		CA 2273195 A1	15/04/1999
		CA 2288401 A1	19/12/1996
		CN 1132014 C	24/12/2003
		CN 1152960 C	09/06/2004
		CN 1164870 A	12/11/1997
		CN 1246923 A	08/03/2000
		CN 1597950 A	23/03/2005
		EP 0578819 A1	08/09/2004
		EP 0643728 A1	28/01/2004
		EP 0789763 A1	30/05/2001
		EP 0789763 B1	18/09/2002
		EP 0956508 A1	03/01/2001
		EP 0956508 B1	09/04/2003
		EP 1308514 A2	07/05/2003
		EP 1308514 A3	02/01/2004
		EP 1338896 A2	27/08/2003
		EP 1338896 A3	02/01/2004
		JP 06-506606 A	28/07/1994
		JP 10-505508 A	02/06/1998
		JP 2001-508181 A	19/06/2001

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2018/014540**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 2003-047493 A	18/02/2003
		JP 3349514 B2	25/11/2002
		JP 3616090 B2	02/02/2005
		US 2001-0029293 A1	11/10/2001
		US 2003-0199423 A1	23/10/2003
		US 2004-0248211 A1	09/12/2004
		US 2005-0176020 A1	11/08/2005
		US 5525487 A	11/06/1996
		US 5532127 A	02/07/1996
		US 5663293 A	02/09/1997
		US 5700658 A	23/12/1997
		US 5702917 A	30/12/1997
		US 5753502 A	19/05/1998
		US 5770686 A	23/06/1998
		US 5773218 A	30/06/1998
		US 5811517 A	22/09/1998
		US 5837822 A	17/11/1998
		US 5852170 A	22/12/1998
		US 5869262 A	09/02/1999
		US 5880268 A	09/03/1999
		US 5989843 A	23/11/1999
		US 6040176 A	21/03/2000
		US 6087130 A	11/07/2000
		US 6100383 A	08/08/2000
		US 6153395 A	28/11/2000
		US 6818743 B1	16/11/2004
		WO 93-14776 A1	05/08/1993
		WO 94-17100 A1	04/08/1994
		WO 96-40916 A1	19/12/1996
		WO 99-18441 A1	15/04/1999

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
**G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C07K 16/18(2006.01)i, A61K 47/68(2017.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i**

**B. 조사된 분야**  
 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
 G01N 33/574; A61K 31/4045; A61K 39/395; C07K 16/00; C07K 16/28; C07K 16/30; C12N 5/12; G01N 33/68; C07K 16/18; A61K 47/68; A61K 38/16; A61K 39/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌  
 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))  
 eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항ICAM4 항체, 키메라, 이중특이성, 항체 약물 복합체, 골수유래면역억제제 포

**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2015-0063859 A (중북대학교 산학협력단) 2015.06.10 청구항 1-3, 7 및 9; 서열번호 3 참조.	1,9-13,16,17
Y		2,3,6-8,14,15
A		4,5
Y	WO 2016-089950 A1 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.) 2016.06.09 청구항 2, 3 및 23; 페이지 30, 라인 3-15; 페이지 32, 라인 16-25 참조.	2,3,6-8,14,15
Y	KR 10-2016-0058120 A (암젠 인크 등) 2016.05.24 청구항 1 및 6; 단락 [0110]-[0112] 참조.	6,7
A	US 5773293 A (KILGANNON, PATRICK D. 등) 1998.06.30 전체 문헌 참조.	1-17
A	LEE, G. 등, 'Novel secreted isoform of adhesion molecule ICAM-4: potential regulator of membrane-associated ICAM-4 interactions', Blood, 2003.03.01, 제101권, 제5호, 페이지 1790-1797 전체 문헌 참조.	1-17

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.  대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌


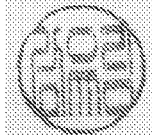
“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2019년 03월 15일 (15.03.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 03월 15일 (15.03.2019)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516	
---	------------------------------------	---

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0063859 A	2015/06/10	KR 10-1627020 B1	2016/06/02
WO 2016-089950 A1	2016/06/09	US 2017-0362320 A1	2017/12/21
KR 10-2016-0058120 A	2016/05/24	AR 097648 A1	2016/04/06
		AU 2014-320246 A1	2016/02/18
		CA 2923354 A1	2015/03/19
		CN 105764505 A	2016/07/13
		EA 201690485 A1	2016/08/31
		EP 3043794 A2	2016/07/20
		IL 244529 A	2016/04/21
		JP 2016-536341 A	2016/11/24
		MA 38898 A1	2018/01/31
		MX 2016003197 A	2016/06/02
		PH 12016500434 A1	2016/05/16
		SG 10201801777 A	2018/04/27
		SG 11201600671 A	2016/02/26
		TW 201605473 A	2016/02/16
		US 2016-0317657 A1	2016/11/03
		WO 2015-036583 A2	2015/03/19
		WO 2015-036583 A3	2015/07/02
US 5773293 A	1998/06/30	AU 1066999 A	1999/04/27
		AU 6256096 A	1996/12/30
		AU 721316 B2	2000/06/29
		AU 735917 B2	2001/07/19
		CA 2107097 A1	1993/08/05
		CA 2196431 A1	1996/12/19
		CA 2196431 C	2000/08/15
		CA 2273195 A1	1999/04/15
		CA 2288401 A1	1996/12/19
		CN 1132014 C	2003/12/24
		CN 1152960 C	2004/06/09
		CN 1164870 A	1997/11/12
		CN 1246923 A	2000/03/08
		CN 1597950 A	2005/03/23
		EP 0578819 A1	2004/09/08
		EP 0643728 A1	2004/01/28
		EP 0789763 A1	2001/05/30
		EP 0789763 B1	2002/09/18
		EP 0956508 A1	2001/01/03
		EP 0956508 B1	2003/04/09
		EP 1308514 A2	2003/05/07
		EP 1308514 A3	2004/01/02
		EP 1338896 A2	2003/08/27
		EP 1338896 A3	2004/01/02
		JP 06-506606 A	1994/07/28
		JP 10-505508 A	1998/06/02
		JP 2001-508181 A	2001/06/19

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2003-047493 A	2003/02/18
		JP 3349514 B2	2002/11/25
		JP 3616090 B2	2005/02/02
		US 2001-0029293 A1	2001/10/11
		US 2003-0199423 A1	2003/10/23
		US 2004-0248211 A1	2004/12/09
		US 2005-0176020 A1	2005/08/11
		US 5525487 A	1996/06/11
		US 5532127 A	1996/07/02
		US 5663293 A	1997/09/02
		US 5700658 A	1997/12/23
		US 5702917 A	1997/12/30
		US 5753502 A	1998/05/19
		US 5770686 A	1998/06/23
		US 5773218 A	1998/06/30
		US 5811517 A	1998/09/22
		US 5837822 A	1998/11/17
		US 5852170 A	1998/12/22
		US 5869262 A	1999/02/09
		US 5880268 A	1999/03/09
		US 5989843 A	1999/11/23
		US 6040176 A	2000/03/21
		US 6087130 A	2000/07/11
		US 6100383 A	2000/08/08
		US 6153395 A	2000/11/28
		US 6818743 B1	2004/11/16
		WO 93-14776 A1	1993/08/05
		WO 94-17100 A1	1994/08/04
		WO 96-40916 A1	1996/12/19
		WO 99-18441 A1	1999/04/15