

## (19)대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. <i>A61K 47/48</i> (2006.01)	(45) 공고일자 2006년10월24일 (11) 등록번호 10-0485240 (24) 등록일자 2005년04월15일
--	--

(21) 출원번호	10-1998-0705339	(65) 공개번호	10-1999-0077198
(22) 출원일자	1998년07월11일	(43) 공개일자	1999년10월25일
번역문 제출일자	1998년07월11일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/000307	(87) 국제공개번호	WO 1997/25069
국제출원일자	1997년01월06일	국제공개일자	1997년07월17일

(81) 지정국      국내특허 : 아일랜드, 알바니아, 오스트레일리아, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본,

                    AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 케냐,

                    EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스,

                    EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 오스트리아, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 영국,

(30) 우선권주장      08/586,075      1996년01월11일      미국(US)

(73) 특허권자      테크니클론 인크.  
 미국 92680 캘리포니아주 터스틴 프랭클린 애비뉴 14282

(72) 발명자      칼리 레슬리 에이.  
 미국 91007 캘리포니아주 아카디아 라카테나 애비뉴 918

    엠프스타인 알란 엘.  
 미국 91011 캘리포니아주 라카테나 힐러드 애비뉴 5128

(74) 대리인      김성기  
                     송병옥

심사관 : 신영신

---

(54) 감소된순양전하를갖는항체

---

요약

항체가 자유 아미노기와 반응성을 가지는 물질과 화학적으로 컨쥬게이트되어 변형된다. 본 발명과 관련되어 사용되는 화학 물질 중에는 헤테로 이작용성 물질과 바이오틴이 있다. 진단용으로 면역 섬광조영술에 사용된다. 변형 항체는 진단이나 치료에 사용되기 위하여 표지(labels) 또는 생물학적 활성 물질과 추가로 컨쥬게이트 될 수 있다. 변형 항체는 상기 목적을 위하여 제약 조성물로 제조될 수 있다.

## 대표도

도 17c

## 명세서

### 기술분야

본 발명은 일반적으로 변형 항체(modified antibody) 분야에 관련된 것으로, 더 구체적으로는 증가된 결합 특이성, 개선된 약물동력(pharmacokinetics) 및 위치 결정(localization) 능력을 가지도록 화학적으로 변형시킨 항체에 관한 것이다. 이들 변형 항체는 암 및 다른 포유 동물의 질병 치료 및 진단에 특히 유용하다.

### 배경기술

항체, 특히 단일클론 항체(Monoclonal Antibody : MAb)의 사용은 암의 진단 및 치료에 있어서 매우 유용한 접근 방법이 될 수 있다. MAb의 중요한 특성은 단일 항원에 대한 특이성이다.

종양 세포 항원에 특이적인 MAb가 생성되고 있다. 또한, MAb가 방사성핵종(radionuclides)과 같은 부수물(adjuncts)에 효과적으로 결합될 수 있다는 것도 보여지고 있다. 그러한 방사선 동위 원소로 표지된 MAb는 g-카메라 이미지 처리(g-camera imaging)이나 방사선 면역 이미지 처리(radioimmunoimaging)이라고도 불리우는 면역 섬광 조영술(immunoscinotography)을 사용하여 종양의 이미지화(imaging)와 같은 임상 데이터를 제공하는데 유용하다. 면역 섬광 조영술에서, MAb에 의해 인식되는 항원을 가지고 있는 특이적인 조직이나 종양 유형에 MAb가 결합하도록 한 후 방사성핵종이 게르마늄 카메라의 사용과 같이 적당한 기술을 사용하여 가시화된다. 종양 및 다른 종류의 조직에 면역 섬광 조영술에 MAb를 적용할 수 있는 것은 MAb의 특유한 특이성에 기인한다.

그러나, 높은 백그라운드 수준과 MAb의 항원에 대한 낮은 결합 용량으로 인해 면역 섬광 조영술에서 MAb의 사용이 제한되었다. 실험적 연구들을 통하여 방사선 동위원소로 표지된 MAb의 생체 분포가 항체의 특이성과 제거 시간(clearance time)을 포함한 많은 인자들에 의해 결정된다는 것을 알게 되었다. 면역 섬광 조영술을 통한 보다 효과적인 종양 진단을 위해서는, 종양 세포 표면에 밀집되고 균일하게 분포되어 있는 항원과 결합되도록 항체가 선택되어야 하며, 또한 선택된 항체가 효과적으로 종양 항원에 결합되어야 한다. 그러나, 적당한 항원에 결합한 MAb가 필요한 높은 결합 친화력을 제공하지 못하는 경우가 자주 있다. 게다가 다른 MAb보다 높은 친화력으로 결합하는 MAb라도 여전히 높은 수준의 비특이적 결합을 생성할 수 있어서 결과적으로 면역 섬광조영에 사용될 경우 높은 백그라운드 수준을 나타낼 수 있다. 따라서, 진단 수단으로서 면역 섬광 조영술을 개선하기 위해서는 MAb의 결합 효율성을 개선할 수 있는 방법이 필요하다.

뿐만 아니라, MAb가 방사성핵종, 약물(drugs) 또는 독소(toxin)와 결합하면 MAb의 세포 독성 효과가 눈에 띄게 증가할 수 있다. MAb의 특유한 특이성으로 인해 면역 치료법의 개발 가능성이 커지고 있다. 면역 치료법에서는 생물학적 활성 물질이 종양 세포와 같은 특별한 바람직하지 못한 종류의 세포에 MAb를 사용하여 전달되고, 이를 통해 환자의 다른 세포에는 영향을 미치지 않으면서 바람직하지 못한 종류의 세포에 영향을 미친다. 그러나, 면역 치료법은 건강한 조직에의 영향을 피하기 위해서 매우 높은 특이성을 가진 항체를 필요로 한다. 따라서, MAb의 특이성을 증가시키기 위한 방법은 안전하고 효과적인 면역 치료라는 목표를 달성하는데 매우 유익하다.

많은 MAb가 환자에게 투입된 후, 몇일 동안 순환하면서 신체에 남아 있다. 이것은 최소한 두가지 이유 때문에 바람직하지 못하다. 첫째, 순환하는 MAb는 면역 섬광 조영술에서 높은 수준의 백그라운드를 나타낸다는 점이다. 둘째, 방사성핵종이나 다른 잠재적인 세포 독성 물질과 결합된 순환하는 MAb는 오랫동안 노출 후에는 환자에게 바람직하지 못한 부작용을 일으킬 수 있다는 점이다. 따라서, MAb의 제거 시간을 줄이는 방법이 필요하다. 물론, MAb의 제거 시간이 지나치게 짧아지면 MAb가 효과적으로 사용되기도 전에 모두 MAb가 제거되는 결과를 낳을 수도 있다. 따라서, 종양이나 다른 목표 조직에 의한 흡수(uptake)에 본질적인 영향을 주지 않으면서 MAb의 제거시간을 감소시키는 방법이 특별히 필요하다.

항체의 특이성과 제거 시간을 결정하는데 있어서 결정적인 한 인자는 항체의 형태이다. 여기서 사용되는 본래의 비변형 항체(intact antibodies) 분자는 두 개의 H쇄(중쇄) 및 두 개의 L쇄(경쇄)로 이루어진 변형되지 않은 항체 분자를 의미한다. 비변형인 전체 항체 분자는 도 1의 화학식의 반응물 쪽에서 보여진다. 도 1에서 알 수 있는 바와 같이 비변형 분자는  $F_c$  및  $F_{ab}$  도메인으로 나누어진다.  $F_{ab}$  단편의 2가 형(bivalent form)인  $F(ab')_2$ 는 프로테아제로  $F_c$  도메인의 분해(digestion)를 통해서 생성될 수 있다.

두 개의 H사슬(도 1에서 H로 표시됨)은 하나 이상의 이황화물 가교에 의해 함께 유지된다. 비변형의 분자에서 이와 같은 이황화물 가교(disulfide bridge)는 보통 환원제로부터 보호된다. 그러나,  $F_c$  도메인을 제거하면 이황화물 가교가 쉽게 환원된다는 사실이 발견되었다. 따라서, 1가형(monovalent form)인  $F_{ab}$ 는 완화된 환원제의 작용을 통해서  $F(ab')_2$ 로부터 생성될 수 있다.  $F(ab')$  및  $F(ab')_2$ 의 생성에 관한 방법을 기술하고 있는 P. Parham의 논문 "BALB/c Mice로부터 단일클론 IgG1, IgG2a 및 IgG2b의 단편화"(J. Immunol. 131: 2895 (1983))에 개시된 내용은 본 발명에 참조되어 본 발명 내용의 일부를 이룬다. 상기 방법에서 발생하는 것으로 이해되어지는 변화를 도 1에 개략적으로 도시하였다.

$F_c$ 는 항체 분자의 비특이적 결합의 주된 원인이 되는 것으로 밝혀졌다. 또한 이 단편들의 분자량이 사구체 여과의 한계치(threshold) 이하여서 상기 단편이 빠르게 제거되는 것으로 이해되고 있다. 따라서 방사선 이미지 처리법에서 사용하기 위해서 항체의 제거 시간을 증가시키는 한 방법은 비변형의 항체를  $F_{ab}$  및 이의 2가형인  $F(ab')_2$ 와 같은 다양한 단편으로 분해하는 것이었다. 예상대로 이들 단편들은 체내에서 너무 빨리 제거되기 때문에 이들의 유용성이 감소된다. 더욱이, 이들 단편들은 종양이나 다른 표적 조직에 의한 흡수가 비변형 항체에 비하여 감소되는 결과를 나타낼 수 있다. 따라서, 면역 섬광 조영술에서 이들 단편의 사용이 비변형 MAb보다 더 나은 제거와 더 높은 표적 조직 대 백그라운드 비를 제공할 수 있지만, MAb가 결합할 항원을 포함하고 있는 표적 조직내의 MAb의 절대 농도는 어느 한 단편의 경우와 마찬가지로 비변형 MAb의 3배 이상에 이르는 값을 가진다는 것이 밝혀졌다. 나아가 두 종류의 단편들은 혈액 흐름으로부터 매우 빠르게 제거된다. 따라서, 상기 단편들을 이용한 진단이나 치료 기술에 대한 유효 시간은 매우 짧다.

हे테로 이작용성(heterobifunctional) 물질은 다른 반응에 관여할 수 있는 2종의 기를 가진 물질이다. 예를 들면 숙시니미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피온산염(SPDP)은 N-하이드록시숙시니미드 에스테르기가 아미노기와 반응하고 2-피리딜 디설파이드 구조는 지방족 티올과 반응한다는 점에서 हे테로 이작용성이다.

Orlandi 등의 논문 "2-피리딜 디설파이드 기 삽입 후 항종양 단일클론 항체의 결합 반응성의 변화"(Hybridoma 5:1-8 (1986))에 따르면 인간의 난소암에 대하여 만들어진 MAb의 시험관내 결합의 증가는 हे테로 이작용성 물질과 화학적으로 접합(conjugation)된 후에 얻어질 수 있다고 발표하고 있다.

Orlandi 등이 사용한 접합된(conjugated) MAb는 분자당 평균 11개의 PDP기를 가지고 있다. Orlandi 등은 비변형 MAb에 의해서는 감지되지 않는 분자가 감지될 수 있는 정도까지 변형된 MAb가 시험관내에서 결합 활성을 증가시킨다는 것을 발견하였다. 이들 연구자들은 생체내에서 접합된 MAb의 사용에 관한 연구는 전혀 제시하지 않았다. 게다가 이들 연구자들은 매우 적은 수의 항원 부위를 가진 분자들이 접합된 MAb에 의해 감지되었다고 믿었다. 따라서, PDP 변형 MAb는 비변형 대응 MAb에 비해 표적 세포 특이성이 크게 감소되었다.

따라서, 상기와 같은 개선에도 불구하고, 종양 항원에 대한 더 큰 특이적 활성을 나타내서, 더 큰 절대 농도의 항체가 종양에 축적되도록 허용하며, 또한 혈액 풀(blood pool)로부터 상대적으로 빠르지만 진단이나 치료의 유효성을 감소시킬 정도로는 빠르지 않은 제거 시간을 갖는 변형된 항체 단편이 필요하다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명의 한 면은 변형 항체를 생성하기 위해서 항체에 배열된 복수의 유리 아미노기 중 적어도 하나에서 화학 물질(chemical reagent)에 접합된 항체에 관한 것이다. 상기 항체는 비변형 항체와 비교하여 감소된 순 양전하(net positive charge)를 가진다. 또한 상기 항체는  $F(ab')_2$  단편의 제거율과 동일한 유형의 비변형 항체의 제거율 사이의 생체내 제거율을 가진다. 이러한 특징을 갖는 본 발명의 항체에 있어서, 화학 물질은 हे테로 이작용성 물질이 아니다. 또한, 항체는 항체에 부착되는 화학 작용부(chemical moiety)를 포함한다. 항체는 단일클론 항체 또는 폴리클론 항체일 수 있다. 화학 물질은 비오틴(biotin),  $N_2S_2$  또는  $N_2S_4$  같은 메틸 킬레이트, EDTA, DPTA 또는 TETA 같은 기타 다른 킬레이트, 또는 FITC와 같은 염료일 수 있다. 화학 작용부는 흔히 방사성핵종(radionuclide)과 같은 표지이다. 방사성핵종은 테크니시움

(Technicium) 또는  $^{125}\text{I}$  또는  $^{131}\text{I}$ 와 같은 할로젠 방사성핵종일 수 있다. 어떤 구체예에서는 표지가 자기 공명 영상법에 의해 감지될 수 있다. 화학 작용부는 독소, 약물 및 킬레이트와 같은 생물학적 활성 분자일 수 있다. 적당한 약물에는 메토크렉세이트(methotrexate), 5-플루오로-우라실, cis-플라티늄 및 아드리아마이신(adriamycin)이 포함된다. 적당한 독소는 리신(ricin) A사슬이다.

본 발명의 다른 면은 면역 섬광 조영술용 약학 조성물이다. 상기 조성물은 표지된 항체에 배열된 유리 아미노기에서 화학 물질과 접합된 표지된 항체로서, 비변형 항체와 비교하여 감소된 순 양전하를 갖는 표지화되 항체, 면역 섬광조영술에 있어서 허용가능한 약학적 허용 부형제, 담체 또는 기재(基材; base)를 포함한다.

본 발명의 또 다른 면은 증가된 항원 결합 특이성, 감소된 비특이적 결합 및 감소된 생체내 제거 시간을 갖는 표지된 변형 항체를 제조하는 방법이다. 이 방법은 검출되는 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 비변형 항체로서 항체상에 배열된 복수의 유리 아미노기를 갖는 비변형 항체를 수득하는 단계; 유리 아미노기 중 적어도 하나를 화학물질과 반응시켜서 비변형 항체의 등전점(isoelectric point)보다 더 낮은 등전점을 갖는 변형 항체를 생성하는 단계; 및 상기 변형 항체를 검출가능한 표지로 표지화하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 표지된 변형 항체를 생성한다. 본 발명의 방법에서 사용되는 표지는 감마 카메라와 같은 면역 섬광조영술에 의해 검출될 수 있다.

본 발명의 또 다른 면은 포유 동물에서 항원의 위치를 결정하는 방법이다. 본 방법은 위치가 결정될 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 표지된 변형 항체를 수득하는 것을 포함한다. 표지된 변형 항체는 동일한 유형의 비변형 항체와 비교하여 더 적은 수의 유리 아미노기와 감소된 등전점을 가지며, 그 항체 내부에 검출가능한 표지를 갖고 있다. 상기 표지된 변형 항체는 포유동물에 투여된다. 상기 방법은 생체내에서 항원과 표지된 변형 항체를 결합시킨다. 항원에 결합된, 표지된 변형 항체가 검출되면 이것에 의해 항원의 위치가 결정된다. 항체는 비변형 항체가 유리 아미노기에서 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 상기 비변형 항체는 헤테로 이작용성 물질과 화학적으로 집합되거나 또는 비오틴과 화학적으로 접합될 수 있다.

본 발명의 또 다른 면은 포유 동물의 질병 상태를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 포유 동물의 병든 조직에 특이적인 비변형 항체를 수득하는 것을 포함한다. 비변형 항체는 항체 위에 배열된 복수의 유리 아미노기를 가지고 있다. 또한, 본 방법은 헤테로 이작용성 물질이 아닌 다른 화학 물질과의 접합에 의해 유리 아미노기들 중 최소 한 개의 유리 아미노기를 변형시켜서 변형 항체를 생성하는 것을 포함한다. 변형 항체는 비변형 항체와 비교하여 감소된 등전점을 갖는다. 생물학적 활성 분자는 화학 물질 부위가 아닌 다른 변형 항체 상에 배치된 첫 부착 부위에 부착된다. 그리고, 항체는 포유동물에 투여되고 이로써 질병 상태를 치료하게 된다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은  $F(ab')$  및  $F(ab')_2$  단편을 생성하는 방법에서 일어나는 것으로 여겨지는 변화를 도식적으로 나타낸 것이다.

도 2는 무흉선 누드 마우스 내에서 방사성동위원소로 표지된 MAb Lym-1의 상이한 제제(製劑)들의 체내 전 잔류량을 도시하고 있다.

도 3은 주사한지 7일 후 인간의 림프종을 가지고 있는 누드 마우스 내에서 MAb Lym-1 및 변형 Lym-1의 생체 분포를 주사된 % 주사량/그램으로 도시하고 있다.

도 4는 주사한지 7일 후 인간의 림프종을 가지고 있는 누드 마우스 내에서 MAb Lym-1 및 변형 Lym-1의 생체분포를 종양/기관 비로 도시하고 있다.

도 5는 주사한지 5일 후 인간의 림프종을 가지고 있는 누드 마우스 내에서 MAb Lym-1  $F(ab')_2$  및 변형 Lym-1의 생체 분포를 주사된 % 주사량/그램으로 도시하고 있다.

도 6은 주사한지 5일 후 인간의 림프종을 가지고 있는 누드 마우스 내에서 MAb Lym-1  $F(ab')_2$  및 변형 Lym-1의 생체 분포를 종양/기관 비율로 도시하고 있다.

도 7은 I-131로 표지된 비변형 Lym-1을 주사한지 7일째 얻은 이미지를 도시한 것이다.

도 8은 I-131로 표지된 변형 Lym-1을 주사한지 7일째 얻은 이미지를 도시한 것이다.

도 9는 I-131로 표지된 변형 Lym-1을 주사한지 7일째 얻은 이미지를 도시한 것이다.

도 10은 I-131로 표지된 변형 Lym-1을 주사한지 5일째 얻은 이미지를 도시한 것이다.

도 11은 무흉선 누드 마우스 내에서 방사성 동위원소로 표지된 단일클론 항체 B72.3의 상이한 제제들의 체내 전 잔류량을 도시하고 있다.

도 12는 접종 4일 후 LS174T 결장 암종을 가지고 있는 누드 마우스 내에서 MAb B72.3 및 변형 B72.3의 생체 분포를 주사된 % 주사량/그램으로 도시하고 있다.

도 13은 접종 4일 후 LS174T 결장 암종을 가지고 있는 누드 마우스 내에서 MAb B72.3 및 변형 72.3의 생체 분포를 종양/기관 비로 도시하고 있다.

도 14은 I-131로 표지된 변형 B72.3을 주사한지 1일 후 얻은 이미지를 도시한 것이다.

도 15는 I-131로 표지된 변형 B72.3을 주사한지 4일째 얻은 이미지를 도시한 것이다.

도 16은 무흉선 누드 마우스 내에서 방사성 동위원소로 표지된 MAb TNT-1의 상이한 제제들의 체내 전 잔류량을 도시하고 있다.

도 17A 내지 17D는 일련의 막대 그래프를 나타내고 있다. 도 17A 및 17C는 종양 및 다양한 조직들에 정위(定位, localization)되어 접종된 비변형 TNT-1 및 비오틴화된 TNT-1의 백분율을 도시하고 있다. 도 17B 및 도 17D는 종양 및 다양한 조직들에 정위되어 있는 표지된 항체의 비율을 도시하고 있다.

도 18은 Balb/c 마우스 내에서 비변형 TNT-1, 변형 TNT-1 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편들의 전 체내 제거를 나타내는 선 그래프를 도시하고 있다.

도 19는 Balb/c 마우스 내에서 비변형 Lym-1, 변형 Lym-1 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편들의 전 체내 제거를 나타내는 선 그래프를 도시하고 있다.

## 실시예

본 발명자들은 유리 아미노기를 변형시키는 물질과의 접합에 의해 MAb, 인간의 항체, 유전 공학적으로 처리된 항체, 키메라 항체(chimeric antibody), 합성된 항체 및 폴리클론 항체를 포함하는 항체의 화학적 변형이 항원 결합 특이성을 증가시키고, 비특이적 결합을 감소시키고 생체내 제거 시간을 감소시킬 수 있다는 사실을 발견하였다. 위와 같이 변형된 항체는 비변형 항체와 비교해서 감소된 순 양전하를 가지고 있다. 본 발명에 따라 유리 아미노기를 변형시키기 위해 사용한 물질의 예로는 SPDP 또는 비오틴화 시약(biotinylating reagent)과 같은 헤테로 이작용성 물질을 포함한다. 그러나, 당업자라면 다양한 화학 물질이 유리 아미노기를 변형시키는데 사용될 수 있으며, 이에 의해 항체의 전체 등전점을 낮출 수 있다는 것을 알 것이다. 따라서, 예를 들면 N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 또는 N<sub>2</sub>S<sub>4</sub> 같은 메틸 킬레이트, EDTA, DPTA 또는 TETA 같은 기타 다른 킬레이트, 또는 FITC와 같은 많은 염료가 본 발명에 따라 효과적인 결과를 달성하는데 사용될 수 있다. 본 발명에서 설명된 목적 이외의 목적으로 기술된 논문 "N<sub>2</sub>S<sub>4</sub>의 항체에 대한 결합의 설명"(Nucl.Med.biol., 18:179-185 (1991))은 본 발명에 참조되어 본 발명 개시 내용의 일부를 이룬다.

놀랍게도, 유리 아미노기에 대한 화학적 변형은 항체가 결합할 항원을 포함하는 표적 세포에서 변형 항체의 축적을 증가시키는 결과를 나타냈다. 설포숙시니미딜 2-(p-아지도 살리실아미도)-에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(SASD), 설포숙시니미딜 2-(m-아지도-o-니트로벤즈아미도)-에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(SAND), 설포숙시니미딜(4-아지도페닐-디티오)프로피오네이트(설포-SADP) 및 2-아미노티올란-HCl(Traut's 시약)을 포함하되 SPDP를 제외한 다른 헤테로 이작용성 물질은 본 발명에 따른 항체와 접합될 때, 유사한 결과를 제공하는 것으로 여겨진다.



본 발명의 변형 항체는 다른 화학 작용부에 유용하게 연결되어 특이적인 진단이나 치료에 도움을 준다. 예를 들어, 방사성 핵종이나 효소와 같이 주지의 각종 표지들 중 어느 것이라도 부착될 수 있다. 또한, 항종양 화합물이나 독소와 같은 치료용 화합물도 부착될 수 있다.

종전에 헤테로 이작용성 물질과 비오틴은 표지와 다른 작용부를 항체에 부착시키는 링커(linker)로서 사용되어 왔다. 비오틴은 그 자체로서 특정 환경에서는 표지로서 작용할 수 있다. 그러나, 비오틴이나 헤테로 이작용성 물질은 항체를 변형시켜서 향상된 결합 특이성, 감소된 비특이적 결합 및 감소된 생체내 제거 시간을 얻기 위한 목적으로는 사용되지 않았다. 따라서, 본 발명에서와 달리, 이전까지의 항체는 항체의 제 1부위에 부착된 헤테로 이작용성 물질이나 비오틴과 같은 변형시키는 물질과, 그리고 항체의 제 2부위에 부착된 표지나 다른 작용부를 가지고 있지 않았다. 본 발명에서 제 2 부착 부위는 일반적으로 제 1부착 부위에 부착된 변형시키는 물질과 동일한 종류의 부착된 변형시키는 물질을 갖지 않을 것이다.

변형 항체의 축적의 증가는 특이적 결합 용량의 증가에 기인한다고 여겨진다. 본 발명자들은 평균 항체 분자 당 단지 1개의 PDP기를 접합시킴으로써 비변형 항체에 비해 표적 세포에 대한 항체 분자의 특이성이 급격히 증가한다는 것을 발견하였다. 비오틴화된 항체를 사용할 경우에도 유사한 결과가 나타났다.

IgG의 유리 아미노기를 헤테로 이작용성 물질이나 비오틴과 접합시킴으로써 화학적 변형시키면 정상 조직으로부터의 제거가 효과적으로 증강되는 것도 발견하였다. 상기 효과에 대한 어떤 특정 설명에만 제한되고 싶지는 않지만, 상기 변형으로 사구체 여과의 한계치 이하의 분자량을 갖는 형태로 항체가 단편화되어 이들 단편들이 빠르게 제거되는 것으로 생각할 수 있다. 항체가 단편화되어 1가 형태의 항체가 생기는 것도 가능하다. 최종 단편의 정확한 형태가 무엇이건, 이들 단편들은 너무 빠르게 제거되지 않아 변형 항체의 진단이나 치료 유효성을 감소시키지 않는다.

상기한 바와 같이, 본 발명의 실시예에 있어서 유용한 변형 항체는 유리 아미노기가 화학적으로 변형되고 추가적으로 검출 가능한 표지로 표지화된다. 항체 자체나 유리 아미노기를 변형시키는데 사용된 화학 물질이 표지화될 수 있지만, 유리 아미노기가 아닌 다른 부위에서 변형 항체를 표지화하는 것은 본 발명의 실시예에 있어서 유용한 항체를 제공할 수 있다는 사실도 또한 명백하게 밝혔다. 항체의 유리 아미노기에서의 화학적 변형 전 또는 변형후에 표지가 항체에 화학적으로 접합되었을 때, 상기 표지는 유리 아미노기가 아닌 다른 부위 및 물질이 헤테로 이작용성 물질일 때는 아미노기를 변형시키는 물질 부위가 아닌 다른 부위에서 항체에 부착될 수 있다. 구체적으로 여기서 개시된 바와 같이, 항체 단백질에 존재하는 티로신 잔기는 방사성 요오드화(radioiodination)에 의해 변형될 수 있다. 그러나, 항체의 티로신 잔기에 부착될 수 있는 다른 표지에는 F, Cl, Br 및 I 등의 방사성 동위원소와 같은 방사성 핵종이 포함된다. 그러한 할로젠 방사성 핵종의 항체에의 부착이 Wilbur, Bioconj. Chem., 3:433-470 (1992)에 개시되어 있고, 이 개시 내용은 본 발명에 참조되어 본 발명의 개시 내용의 일부를 이룬다. 테크니시움(Technicium) 방사성 핵종은 항체 분자의 다른 잔기에 결합한다. 나아가 해당 기술의 당업자들에게는 용이하게 이해될 수 있는 바와 같이, 다른 표지 및 항체 단백질을 표지화하는 방법도 본 발명의 실시예에 유용하다. 당업자들은 항체 단백질의 아미노산 측쇄의 작용기가 표지의 부착 부위로 작용할 수 있다는 것을 인식할 수 있을 것이다. 표지, 부착 부위 및 표지와 항체의 접합 방법의 선택은 당업자에 의해 이해될 수 있다. 본 발명의 실시가능성에 대한 중요한 조건은 변형 항체가 부착된 표지를 갖는다는 것이다.

일반적으로 비변형 항체에 비하여 감소된 등전점(pI)을 갖도록 화학적으로 변형된 항체는 개선된 표적 특이성을 나타낸다는 것을 발견하였다. 더 구체적으로, 본 발명자들은 항체의 유리 아미노기의 화학적 변형이 개선된 표적화 특이성을 제공할 수 있다는 것을 입증하였다. 이러한 화학적 변형은 상기 헤테로 이작용성 물질 및 비오틴과 같은 물질에 의한 변형을 포함할 수 있지만, 이들만으로 제한되지는 않는다. 실제로 항체 pI를 효과적으로 감소시킬 항체 상에 존재하는 유리 아미노기의 어떤 화학적 변형은 증가된 표적화 특이성을 제공할 것이다.

이러한 개선의 기원을 설명하는 어떤 특별한 이론에만 제한되도록 할 의도는 없지만, 비특이적 항체 결합이 부분적으로는 비특이적 정전기적 상호작용에 기인한다고 가정한다. 포유 동물의 세포는 음전하화되는 반면에 MAb는 생리적 pH에서 양전하화된다(Eichmann 등, J. Exp. Med. 131:207 (1970); Silva Filho 등, J. Leukocyte Biol. 41:143 (1987))는 관찰에 비추어보면 상기 내용은 타당하다. 따라서 비변형 항체의 양전하의 성질을 변형시키는 것은 음전하로 하전된 조직과 양전하로 하전된 항체 단백질 사이의 상호작용에 기인하는 비특이적 결합을 효과적으로 감소시킨다. 이러한 비특이적 상호작용을 최소화함으로써 항체의 항원 결합 도메인에 기인하는 항체 특이성이 주로 결합 특이성을 결정하게 된다. 따라서, 항체의 pI가 비변형 항체에 비해 감소되도록 변형된 복수의 아미노사이드 부위를 가진 어떤 항체는 비동족 항원(non-cognate antigen)과의 비특이적 상호작용이 감소함에 따라 개선된 표적 특이성을 나타낼 것이다. 그러나, 본 발명자들은 본 발명에 따라 변형된 항체의 두 번째 특징으로 인하여 이들 항체가 특히 생체내 항원 위치 결정에 유용하다는 것도 발견했다.

항체를 기초로 한 항원의 이미징처리 과정에서, 종양/기관 비(tumor/organ ratio)로 표시될 수 있는 신호 대 노이즈(noise) 비를 개선시킬 수 있는 두 가지 인자는 첫째, 종양의 위치 결정력의 향상, 둘째 비특이적으로 결합된 표지화된 항체 레벨의 감소이다. 본 발명자들은 비변형 MAb에 비하여 감소된 등전점을 갖도록 화학적으로 변형된 MAb는 비변형 항체에 비하여 비특이적 결합을 감소시키고 전 체내 제거 시간을 감소시키면서, 효과적으로 결합 특이성을 증가시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 나아가 항체 상에 검출 표지를 가지고 있으며, 화학적으로 변형된 항체를 사용함으로써 항체 특이성과 위치결정 능력을 증가시키는 것이 가능하다는 것도 발견했다. 예를 들어, 상기 표지는 방사성핵종일 수 있다. 더 구체적으로, 이제 비오틴 작용부를 포함하도록 변형된 항체가 항원 결합 용량을 상당히 개선시킨다는 것을 발견하였다. 아래에 개시되는 바와 같이, 표지화되고 비오틴화된 항체는 생체내에서 종양 세포의 위치를 결정하는 방법에 사용되었다. 본 발명의 방법의 실시예에 있어서, 화학적으로 변형된 항체가 직접적으로 표지화되는 것이 필수적이다. 이 것은 Khawli et al., Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals, 6:13 (1993)에 기술된 바와 같이, 간접적으로 표지화된 항체를 사용하는 방법과 대조된다. 상기 내용은 본 명세서에 참조되어 본 발명의 일부를 이룬다.

따라서, 개선된 종양의 위치 결정 방법에서 유용한 물질은 원하는 표적 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 항체를 수득하고, 헤테로 이작용성 물질이나 비오틴과 같은 물질을 사용하여 항체의 유리 아미노기를 화학적으로 변형시키고, 방사성핵종과 같은 검출가능 표지로 항체를 표지화시킴으로써 생성될 수 있다. 실제로 있어서, 화학적 변형 단계와 방사성 동위원소로 표지화하는 단계의 순서는 선택적이다. 나아가, 실질적으로 정제된 항체를 방사성 동위원소로 표지화하는 단계는, 본 방법에 사용되는 항체가 MAb이고, 상기 MAb를 생성하는 하이브리도마가 하이브리도마의 MAb 생성물에 융합되는 표지된 전구체를 포함하는 성장 배지에서 증식된다면, 생략될 수 있다. 따라서, 예를 들어 본 발명과 관련하여 유용한 방사성 동위원소로 표지화되고 비오틴화된 MAb는 방사성 동위원소로 표지된 아미노산을 포함하는 성장 배지에서 MAb 생산 세포주를 증식시키고, 방사성 동위원소로 표지된 MAb를 수집하고, 그리고 방사성 동위원소로 표지된 MAb를 비오틴화하여 생성될 수 있다. 비오틴화 단계 이전 또는 이후에 항체를 표지화하는 다른 방법은 당업자에게 자명할 것이다.

본 명세서에 기술된 방법은 Khawli et al., Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals, 6:13 (1993)에 개시된 것과 관계가 있지만, 유용하게도 생체내에서 종양세포 항원의 이미지를 얻기 위해 더 적은 단계를 포함하며, 예기치 않게 비오틴기를 갖지 않는 방사성 동위원소로 표지된 항체를 단순히 사용하는 것보다 더 좋은 효과를 나타낸다. 따라서, 본 명세서는 비오틴화된 항체가 그렇지 않은 항체와 비교해 볼 때 개선된 표적화(targeting)를 나타낸다는 것을 개시한다. 본 발명과 관련하여 유용한 항체는 항체상에서 운반되는 표지에 의해 검출될 수 있기 때문에, 표지된 항체상의 비오틴기의 존재는 표적화 및 검출의 측면에서 명백한 잇점을 제공한다. 따라서, 본 발명에 관련하여 유용한 항체의 본질적인 특징은, 첫째로 변형된 항체의 pI가 비변형 항체와 비교하여 감소되도록 항체가 화학적으로 변형된 아미노사이드 작용부를 가진다는 점과, 둘째로 검출 수단에 의해 검출될 수 있는 표지를 항체가 가진다는 점이다.

본 발명의 변형 항체는 F(ab')나 F(ab')<sub>2</sub>와 같은 항체의 단편들에 비해 효과 면에서 매우 향상된 진단 및 치료의 효능을 갖고 있다,

다음의 실시예는 단일클론 항체 당 평균 하나의 PDP기를 삽입하는 방법에 관한 예시이다.

#### <실시예 1>

##### SPDP에 의한 Lym-1의 변형

Lym-1(IgG<sub>2</sub>), B세포 림프종에 대한 단일클론 항체는 Epstein, A.L. 등의 논문 "인간의 B 림프구 및 유도된 종양과 반응성이 있으며, 면역 진단 및 면역 반응의 잠재성을 갖는 2개의 새로운 항체, Lym-1 및 Lym-2"(Cancer Res. 47: 830-840 (1987))에 기술된 방법에 의해 얻어졌는데, 상기 논문 내용은 본 발명에 참조되어 본 발명의 일부를 이루고 있다. Lym-1 MAb는 Carlson, J. 등의 논문 "단백질 티올화 및 가역적인 단백질-단백질 접합 : 새로운 헤테로 이작용성 물질인 숙시니미딜 3-(2-피리디디티오)프로피오네이트"(Biochem. J. 173: 723-737 (1987))에서 기술된 바와 같이 항체의 아미노기와 반응하는 헤테로 이작용성 물질인 SPDP를 사용하여 작용성을 가지게(functionalized) 되는데, 상기 논문은 본 발명에 참조되어 본 발명의 일부를 이루고 있다. pH 7.2이고 인산염 완충 식염수(phosphate buffer saline : PBS)에 용해된 Lym-1 (10 mg/ml) 1 mL를 포함하고 있는 5 mL시험관에 1 mL 에탄올 및 40μL N,N-디메틸포름아미드에 용해된 3 mg SPDP 20 μL를 첨가했다. 이 혼합물을 통상의 속도로 오비탈 진탕기(orbital shaker)를 사용하여 계속 혼합하면서 실온에서 15 분 동안 항은 배양하였다. 항은 배양 후 작용성 Lym-1 용액을 PBS로 평형을 이룬 PD-10 칼럼에 통과시켜 정제하였다.

SPDP를 통한 Lym-1의 작용성화(functionalization)의 정도는 Grasseti, D.R. 및 Murray, J.F.의 논문 "2,2'- 또는 4,4'-디티오디피리딘을 갖는 설프하이드릴기의 결정 방법"(Arch. Biochem. Biophys. 119:41-19, 1967)에서 기술된 바와 같이, 1 분취량(aliquot)의 Lym-1 용액을 pH 7.2인 PBS 상에서 7 mg 디티오에리스리톨을 통해 감소시킨 후 343 nm에서 피리딘-2-티온의 유리량(release)을 측정하여 분자 당 평균 한 개의 PDP기를 갖는 것으로 결정되었는데, 상기 논문의 개시 내용은 본 발명에 참조되어 본 발명의 일부를 이룬다.

본 실시예의 변형 항체는 실질적으로 비변형으로 남아 있는 항체를 보여 주기 위하여 FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography)를 통해 분석하였다. 분석 결과는 실시예 2에 제시되어 있다.

#### <실시예 2>

##### 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC)를 통한 변형 Lym-1의 분석

실시예 1로부터 얻은 변형 항체의 분석은 280 nm의 고정된 파장으로 맞춰진 UV 분광 광도계(spectrophotometer)가 갖춰진 FPLC를 통해 수행하였다. 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)는 용매계로서 pH 7.2의 PBS를 갖는 수퍼로즈(superose)-12칼럼(Pharmacia) 상에서 1 mL/min의 유속(flow rate)으로 용리하면서 작동시켰다. 변형 Lym-1의 보유 시간(retention time)은 600 초로 나타났는데, 비변형의 Lym-1과 동일하다.

따라서, 실시예 2는 SPDP-변형 항체가 실질적으로 FPLC에서 비변형 항체와 동일하게 작용한다는 것을 보여주는 것이다. 이러한 데이터는 변형을 하는 것이 시험관내에서 비변형 분자를 분해까지 시키는 것은 아니라는 것을 보여준다.

변형된 MAb의 생체내 실험을 추가로 수행하기 위해서, 변형 MAb를 방사성 동위원소로 표지하였다. 방사성 동위원소로 표지하는 것은 실시예 3에 나타나 있다.

#### <실시예 3>

##### 변형된 Lym-1의 직접 방사성 요오드화(Radioiodination)

Mills, S.L. 등의 논문 "생체내 처리 공정을 위한 단일클론 항체의  $^{125}\text{I}$  표지"(Hybridoma 5: 265-275 (1986))에 기술된 수정된 클로라민(chloramine) T 방법을 사용하여 한 배치(batch)의 PDP변형 Lym-1 및 비변형의 Lym-1를  $^{125}\text{I}$ 로 표지하고, 다른 배치는  $^{131}\text{I}$ 로 표지하였다. 상기 논문의 개시 내용은 본 발명에 참조되어 본 발명의 일부가 된다. 요약하면, 100  $\mu\text{L}$ 의 PBS에 용해된 100  $\mu\text{g}$ 의 단일클론 항체를 포함한 5 mL 시험관에 각 배치에 따라 적당한 요오드 방사성 동위원소인  $^{131}\text{I}$  및  $^{125}\text{I}$ 와 43 mM 클로라민(chloramine) T 수용액 10  $\mu\text{L}$ 를 첨가하였다. 120 mM 소듐 메타바이설파이트 용액 20  $\mu\text{L}$ 와 함께 반응시킨 후 3분 후에 중지시켰다. 방사성 동위원소로 표지된 항체는 세파덱스(Sephadex) G-25 칼럼을 사용하여 정제하였다. 상기 칼럼은 솜으로 된 양끝이 플러그로 접속( $v_0 = 4.5 \text{ mL}$ ,  $v_1 = 12 \text{ mL}$ )된 혈청 플라스틱 피펫(8 mm  $\times$  200 mm)으로 구성되어 있다. 각 반응 혼합액을 칼럼 상에 적재하고 pH 7.2의 PBS 상에서 용리시켰다. 1 mL 분취량을 포함한 각 튜브를 계측하였는데, 튜브 6에서 방사성 동위원소로 표지된 항체가 85-90% 수율로 회수되었다. 상기 방사성 동위원소로 표지된 항체는 냉장고에 보관하고 표지된지 4시간 이내에 마우스에 투여하였다.

표지된 MAb의 순도를 결정하기 위하여, 본 실시예에서 얻은 방사성 동위원소로 표지된 MAb를 순간 박층 크로마토그래피(Instant Thin Layer Chromatography;ITLC)로 전개시켰다. 분석 결과는 실시예 4에 나타나 있다.

#### <실시예 4>

##### 순간 박층 크로마토그래피 ITLC를 통한 방사성 동위원소로 표지된 변형 Lym-1의 분석

실시예 3의 클로라민(chloramine) T 방법을 통해  $^{131}\text{I}$ 로 표지된 변형 Lym-1 및  $^{125}\text{I}$ 로 표지된 변형 Lym-1이 유리 섬유가 침윤된 실리카겔로 구성된 분석 ITLC 시스템을 사용하여 분석되었다. 스트립(Strips, 2  $\times$  20 cm)이 사용전 15분 동안 110 - 1.2°C에서 가열됨으로써 활성화가 되고, 1  $\mu\text{L}$  시료가 점적되고 공기로 건조되고, 약 12 cm 전개되는 동안 MeOH/



H<sub>2</sub>O(80 : 20)으로 용리되고 다시 공기로 건조되고 중간 부위에서 잘린 후 단백질 결합 및 비단백질 결합 방사능을 측정하기 위해 계측된다. 방사능으로 표지된 두 종류의 Lym-1은 R<sub>f</sub> 값으로 0을 가지며, 방사화학적 순도 99 % 이상을 나타낸다. 실시예 3과 같은 방법으로 표지된 비변형 Lym-1을 분석해보면 같은 순도를 나타낸다.

따라서, 실시예 4는 고순도의 방사성 동위원소로 표지된 항체를 얻을 수 있다는 것을 보여 주는 것이다. 상기 방사성 동위원소로 표지된 MAb의 면역 반응성은 Raji 세포에의 결합 능력에 의해 측정하였다. 분석 결과는 실시예 5에 나타나 있다.

#### <실시예 5>

##### 면역 반응성 평가(Immunoreactivity Assessment)를 통한 방사성 동위원소로 표지된 변형 Lym-1의 분석

방사성 동위원소로 표지된 변형 Lym-1 및 비변형 Lym-1의 시험관내 면역 반응성은 Epstein, A.L. 등의 방법에 의해 10<sup>6</sup> Raji 세포/튜브의 전통적인 생체(live) 검정을 통해 평가될 수 있다. 간단히 말하면, PBS 상에 1%의 소 혈청 알부민 100  $\mu$ L에 부유된(suspended) Raji 세포가 3개가 한 벌로 된 시험관에 피펫으로 옮겨졌다. 표지된 Lym-1 100  $\mu$ L를 각 시험관(100,100 cpm/tube)에 첨가하고 오비탈 진탕기를 사용하여 계속 혼합하면서 실온에서 30분 동안 항온 배양하였다. 1%의 소 혈청을 포함한 PBS 상에서 항온 배양 후 5분 동안 1000 rpm으로 튜브를 회전시키며, 상층액을 따라 내리고, 200  $\mu$ L PBS 상에 세포를 재부유시킴으로써 30분 동안 세척하였다. 세척을 다 한 후에 결합된 Lym-1은 감마 계측기를 사용하여 세포에 결합된 방사능을 측정함으로써 검출할 수 있었다. 그 결과를 보면, 변형 Lym-1의 결합 활성이 87%인 반면, 대조군으로 사용된 비변형 Lym-1은 80%의 결합 활성을 보이고 있다.

따라서, 본 실시예에서는 변형 Lym-1이 비변형 Lym-1보다 시험관내에서 더 큰 면역 반응성을 갖는다. 생체내에서 변형 항체 활성의 안정성을 예비 평가하기 위해서, 변형 MAb에 대해 실시예 6에서 보여지는 바와 같이 혈청 내에서의 안정성이 분석되었다.

#### <실시예 6>

##### 혈청 안정성을 통한 방사성 동위원소로 표지된 변형 Lym-1의 분석

I-125로 직접 표지된 변형 Lym-1 및 비변형 Lym-1의 단일클론 항체를 3개가 한 벌로 된 여러 개의 신선한 마우스 혈청에 첨가하여 최종 농도를 100  $\mu$ g/mL로 하였다. 시험관은 공기 중 탄소 농도가 5%이고, 온도는 37 -1/2°C인 습한 항온 배양기에서 항온 배양하였다. 8일째까지는 100%의 트리클로로아세트산(TCA) 900  $\mu$ L를 100  $\mu$ L 분취량에 첨가하여 단백질 결합 활성을 측정하였다. 실온에서 5분 동안의 항온배양 후 침전물은 원심 분리에 의해 침강시키고, 상층액 500  $\mu$ L를 각 튜브에서 떠내 감마 계측기로 방사능(radioactivity)을 계측하였다. 데이터는 침전된 평균 백분율 카운트에서 대조군 시험관 백분율의 카운트를 뺀 값으로 표시된다. 결과를 보면 주사 후 각 시점에서 변형된 <sup>125</sup>I-Lym-1은 표준 대조군으로 사용된 <sup>125</sup>I로 표지된 비변형 Lym-1처럼 안정적이었다. 더 나아가, 항온 배양 8일 후 온도 37-1/2°C에서 변형 Lym-1에 존재하는 92% 이상의 활성이 TCA 침전가능하였다.

따라서, 본 실시예에서는 변형 항체 활성의 안정성이 최소한 8일 동안은 유지된다는 것을 보여주고 있다. 변형 MAb가 혈청에서 항온 배양된 후 손상되지 않고 남아 있는지 여부를 평가하기 위해서 하기 실시예 7에서 보여지는 바와 같이 주사후 변형 Lym-1의 HPLC 분석을 실시하였다.

#### <실시예 7>

##### HPLC에 의한 변형 Lym-1의 분석

전개 용매로서 0.1M 중성 인산염 완충액을 갖고, 1 mL/min의 유속을 갖는 크기별 배제 칼럼(SW 300)으로 갖춰진 수계(water system) 상에서 HPLC 분석을 하였다. 용출액은 방사성 동위원소 검출기에 의해 검출된다. 실시예 6으로부터 얻어진 표지된 변형 Lym-1의 생성 혼합물은 690초에서 소량 외에 750초의 용리 시간을 갖는 저분자량족이 하나의 주된 피크를 이룬다. 비변형 Lym-1은 690초의 보류 시간을 갖는 하나의 피크를 가진다.

따라서, 혈청에서 항은 배양된 변형 Lym-1 시료가 HPLC 분석에서 명백히 비변형 Lym-1보다 낮은 분자량을 가지고 있다는 것을 알 수 있다. 이와 대조적으로 실시예 2에서는 항은 배양되지 않은 변형 Lym-1이 비변형 Lym-1과 동일한 보유 시간을 가지고 있었다. 따라서, 변형 Lym-1은 혈청에서 항은 배양시, FPLC 분석에서 명백한 분자량의 손실을 보여주고 있다.

변형 Lym-1의 혈청에서의 명백한 분자량 손실을 증명하기 위하여 실시예 8에서 보여지는 바와 같이 시료의 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 수행하였다.

#### <실시예 8>

##### SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 통한 방사성 동위원소로 표지된 변형 Lym-1의 분석

실시예 6으로부터 얻어진, 동일 분취량의 항은 배양된 각 혈청 혼합액은 비환원 SDS-PAGE에 의해 순차적으로 검사하였다. 본 실험을 위해서 시료들을 10% 아크릴아미드 겔 상에 전개시키고, 주의 깊게 건조시킨 후 Laemmli, U.K.의 논문 "박테리오파지 T4의 헤드(head)의 어셈블리(assembly) 기간 중 구조 유전자의 분해"(Nature 227: 680-685 (1970))에 기술된 바와 같은 통상적인 방법에 의하여 사진 필름에 노출시켰다. 상기 논문의 개시된 내용은 본 발명에 참조되어 본 발명의 일부를 이룬다. 비변형  $^{125}\text{I}$ -Lym-1은 M 200,000에서 뚜렷이 나타난 반면, 변형  $^{125}\text{I}$ -Lym-1은 약 M 116,000의 더 작은 분자량에 대응하는 뚜렷한 밴드로 나타났다. 따라서, 본 실시예는 변형 항체를 혈청에서 항은 배양하면 아크릴아마이드 겔 상에서 변형된 뚜렷한 분자량으로 나타난다는 것을 보여주어 HPLC 분석 결과를 증명한다.

#### <실시예 9>

##### 혈청에서 표지된 Lym-1의 탈요오드화 테스트

방사능의 손실은 혈청내의 탈요오드화의 증거로 해석되어질 수 있기 때문에 실시예 6에서 얻어진 시료를 통해 방사성 동위원소로 표지된 Lym-1으로부터 방사능의 손실 여부를 8일 동안 조사하였다. 데이터를 보면 이 시간 동안에 실질적인 방사능의 손실이 없으므로 면역 접합(immunoconjugate)에서 요오드가 매우 안정되게 부착되었음을 말해주는 것이다.

따라서, 실시예 7 내지 9를 통해 변형 항체가 혈청에서 항은 배양된 후에도 실질적으로 완전한 활성을 보유하면서 겔보기 분자량 116,000의 분자로 분해되었다는 것을 알 수 있다. 상기한 바와 같이 분자량의 손실은 항체가 1가형으로 분해됨으로써 발생했을 가능성이 있다. 어쨌든 겔보기 분자량의 손실은 변형 항체가 단편으로 분해되었기 때문인 것으로 여겨진다.

혈청에서 항은 배양되었을 때, 예측하지 못한 변형 항체의 겔보기 분자량의 변화를 발견한 후에 변형 MAb의 생체내 안정성을 시험하였다. 총 체내 제거 시간(total body clearance time)을 결정하기 위하여 생체내 실험을 수행하였다. 이들 실험에는 실시예 10에 나타나 있다.

#### <실시예 10>

##### 총 체내 제거(total body clearance)

비변형 항체,  $\text{F(ab')}_2$  단편 및 클로라민(chloramine) T 방법을 사용하여 I-131로 표지된 변형 항체 Lym-1을 복강 주사한 3개 집단의 무흉선 누드 마우스( $n=5$ )를 통해 실험을 하였다. 상기 항체들의 몸 전체의 활성은 주사시 및 이후 연속적으로 방사선량계(dosimeter)를 이용하여 측정하였다. 실험 결과가 도 2에 도시되어 있는데, 방사능의 총 체내 제거는 항체의 제에 따라 변하는 것을 알 수 있다.

변형 Lym-1은 생물학적 반감기( $t_{1/2}$ )가 20시간 자연 상태 Lym-1의 생물학적 반감기 5일에 비해 몸 전체에서 빨리 제거된다. 그러나,  $\text{F(ab')}_2$  단편의 제거 시간은 생물학적 반감기가 10h로 변형 항체 Lym-1보다 2배 빠르다. 실험 결과를 보면 변형 Lym-1은 빨리 제거되는  $\text{F(ab')}_2$  단편과 늦게 제거되는 비변형 항체의 중간 정도의 속도로 제거된다.

따라서, 변형 항체는 매우 오랫동안 유지되는 비변형 항체보다는 빨리 제거되나,  $\text{F(ab')}_2$ 의 제거 속도보다는 빠르지 않다.

이상적인 면역 치료 물질은 혈액의 흐름 속에서 원하는 독소 효과를 나타낼 정도로 충분히 오랫동안 존속하면서도, 원하지 않는 독소의 부작용(toxic side effect)을 발생시킬 정도로 오래 존속되지는 않아야 한다. 본 실시예는 변형 항체가 면역 치료에서 사용될 때의 가능한 이상적 존속 시간(ideal persistence time)을 제시하고 있다.

상기한 바와 같이 면역치료에 사용되는 물질은 또한 표적 세포에 대한 매우 높은 특이성을 가져야 한다. 따라서, 비변형 MAb 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편의 특이성에 대한 변형 MAb의 특이성을 비교하였다. 실시예 11은 후속되는 생체분포 (Biodistribution)에서 사용되는 방법을 보여주고 있다.

#### <실시예 11>

##### 생체 분포 연구

생후 6주된 두개 집단의 누드마우스에 Raji 세포( $10^7$ )를 넓적다리 부위에 피하 주사하였다. 종양은 직경이 1 cm 이상 커질 때까지 3주 동안 자라게 했다. 하기에 기술되는 바와 같이 각 마우스 집단을 사용하여 쌍표지(Paired-label) 연구를 하였다. 첫 번째 집단(n=6)에서는, 12  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 의 I-131으로 표지된 변형 Lym-1 10  $\mu\text{g}$  (120  $\mu\text{Ci}$ /마우스)을 포함하는 0.2 mL 접종원 및 2.5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 의 I-125으로 표지된 비변형 Lym-1 10  $\mu\text{g}$  (25  $\mu\text{Ci}$ /마우스)을 각 마우스의 복강 내에 주사하였다. 두 번째 집단(n=4)에서는, 12  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  (120  $\mu\text{Ci}$ /마우스)의 I-131으로 표지된 변형 Lym-1 10  $\mu\text{g}$ 을 포함하는 0.2 mL 접종원 및 25  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  (25  $\mu\text{Ci}$ /마우스)의 I-125으로 표지된 비변형 F(ab') 단편 10  $\mu\text{g}$ 을 각 마우스의 복강 내에 주사하였다. 모든 실험에서 마우스는 주사 후 미리 정해진 시간에 경추를 탈골시켜 희생시킨 후 여러 기관들, 혈액 및 종양을 제거하고 분석 저울에서 이들의 무게를 측정하였다. 그리고, 시료는  $^{131}\text{I}$  및  $^{125}\text{I}$ 의 활성도를 결정하기 위하여 감마 계측기에서 계측하였다.

$^{125}\text{I}$  카운트(counts)는 1282 컴퓨감마 감마 계측기(Compugamma gamma counter : LKB)용으로 실험적으로 정해지는 공식에 의해  $^{131}\text{I}$  채널 카운트로부터  $^{131}\text{I}$  채널 카운트(channel counts)의 17%를 감산함으로써 교차에 대해 조정하였다.

데이터는 마우스가 희생된 날에 따라  $^{131}\text{I}$  동위원소의 방사선 붕괴를 고려하여 수정하였다. 각 마우스에 대하여 데이터는 그램 종양 당 cpm / 그램 기관 당 cpm, % 주사량/그램, 및 % 주사량/기관으로 표시되며, 이러한 데이터로부터 각 집단에 대하여 평균과 표준 편차가 계산된다.

실시예 12에서는 본 실시예의 방법을 사용하여 변형 MAb와 비변형 MAb의 생체 분포를 비교한다.

#### <실시예 12>

##### 변형 Lym-1 대 비변형 Lym-1의 생체 분포 연구

본 연구에서는 비변형 Lym-1 항체와 변형 Lym-1 항체가 실시예 11의 방법으로 비교되었다. 비변형 Lym-1는 표 1에서 보는 바와 같이 주사한지 7일째에 0.64 % ID/g의 혈액 활성(blood activity)을 나타냈다. 같은 시간대에 종양은 3.92 % ID/g의 혈액 활성을 나타냈다.

표 1에서 보는 바와 같이 비변형 Lym-1과 비교해, 변형 Lym-1는 혈액에서 빨리 제거되고, 주사후 7일째는 0.14% ID/g의 혈액 활성을 나타낸다. 같은 시간대에 종양은 7.7% ID/g의 혈액 활성을 나타내는데, 이는 비변형 Lym-1의 대응되는 활성보다 상당히 높은 경향을 보인다.

본 실시예로부터 얻어진 여러 기관에서의 항체 반응성은 표 1에 기술되어 있고, 도 3(%주사량/그램) 및 도4(종양/기관)에 도시되어 있다.

#### <표 1>

주사후 7일 후, Raji 종양을 가진 누드마우스(N=6) 내에서의 변형 단일클론 항체와 비변형 단일클론 항체 LYM-1의 생체 분포

<u>변형된 Lym-1</u>			
기관	$\frac{cpm/g\text{종양}}{cpm/g\text{기관}}$	%주사량/g	%주사량/기관
혈액	140.07(81.30)*	0.14(0.20)	-
피부	93.98(43.40)	0.09(0.04)	-
근육	364.53(232.97)	0.03(0.03)	-
뼈	126.96(55.86)	0.06(0.02)	-
심장	137.34(67.96)	0.07(0.04)	0.01(0.00)
허파	28.31(10.34)	0.28(0.10)	0.06(0.02)
간	96.80(49.03)	0.09(0.05)	0.15(0.08)
지라	12.02(5.62)	0.79(0.53)	0.03(0.01)
이자	286.43(159.92)	0.04(0.02)	0.00(0.00)
위	71.21(30.72)	0.11(0.03)	0.02(0.01)
장	133.31(80.82)	0.07(0.04)	-
신장	17.63(7.63)	0.45(0.12)	0.14(0.03)
종양	-	7.70(3.95)	2.98(1.71)

<u>비변형 Lym-1(대조군)</u>			
기관	$\frac{cpm/g\text{종양}}{cpm/g\text{기관}}$	%주사량/g	%주사량/기관
혈액	30.72(17.74)	0.64(1.26)	-
피부	8.83(3.05)	0.41(0.20)	-
근육	44.39(26.16)	0.15(0.21)	-
뼈	19.49(6.08)	0.21(0.18)	-
심장	28.79(13.76)	0.19(0.22)	0.02(0.02)
허파	16.98(8.22)	0.36(0.46)	0.07(0.01)
간	11.84(5.95)	0.37(0.25)	0.59(0.46)
지라	3.93(3.74)	1.52(1.14)	0.06(0.03)
이자	29.35(12.88)	0.16(0.17)	0.02(0.02)
위	11.00(4.55)	0.32(0.11)	0.07(0.03)
장	18.06(8.79)	0.23(0.13)	-
신장	22.44(10.61)	0.20(0.17)	0.06(0.05)
종양	-	3.92(3.11)	1.02(0.27)

\*평균(표준편차)

도 3에서 변형 항체가 비변형 항체보다 종양에서 큰 신호(signal)를 생성하는 것을 볼 수 있다. 게다가 변형 항체는 비변형 MAb보다 신장을 제외한 모든 기관에서 덜 강하게 반응하고 있다. 항체는 신장에서 제거되기 때문에 신장에서 큰 신호가 발견될 것으로 기대되지 않는다.

실시에 10에서 보는 바와 같이 변형 MAb가 비변형 MAb보다 제거율이 빠르기 때문에, 더 많은 양의 변형 MAb가 신장에서 발견될 것으로 예상된다.

도 3과 같은 결과를 다른 형식으로 도시한 도 4를 참조해 보면, 변형 MAb가 비변형 MAb보다 신장을 제외한 모든 기관에서 종양/기관 비를 상당히 높게 생성하고 있음을 볼 수 있다. 따라서, 변형 항체는 면역 섬광 조영술에 사용될 때 상당히 낮은 백그라운드를 생성한다고 예상할 수 있다. 게다가 변형 항체는 종양에 대한 높은 친화력과 비표적 조직에 대한 낮은 친화력으로 면역치료에 사용될 때 더 효과적일 것이라고 예상할 수 있다. 따라서, 면역치료에서 변형 항체는 종양에 더 효과적이고, 비표적 조직에 덜 효과적일 것으로 예상된다. 본 발명의 변형 항체의 면역치료적 사용은 본 명세서에서 이후에 더 자세히 설명될 것이다.

다음으로 다른 비변형 항체의  $F(ab')_2$  단편을 갖는 변형 MAb의 생체분포를 비교하였다. 이 실험은 실시예 13에 나타나 있다.

#### <실시예 13>

##### 변형 Lym-1 대 Lym-1의 $F(ab')_2$ 단편의 생체 분포 연구

본 연구를 위하여  $F(ab')_2$  단편들을 변형 Lym-1 MAb와 비교하였다. 실험은 실시예 11에서와 같은 방법으로 수행되었다. 그 결과가 표 2에 기술되어 있고, 도 4 및 도 5에 도시된다.

#### <표 2>

주사한지 5일 후, Raji 종양을 가진 누드마우스(N=4) 내에서의 변형된 단일클론 항체와 비변형 단일클론 항체 LYM-1의 생체 분포

기관	<u>변형된 Lym-1</u>		
	$\frac{cpm/g\text{종양}}{cpm/g\text{기관}}$	%주사량/g	%주사량/기관
혈액	39.59(14.84)*	0.09(0.03)	-
피부	13.69(3.15)	0.24(0.06)	-
근육	75.32(16.22)	0.04(0.01)	-
뼈	26.79(7.18)	0.12(0.04)	-
심장	44.42(11.34)	0.08(0.04)	0.01(0.01)
허파	15.78(3.88)	0.21(0.07)	0.04(0.01)
간	12.19(4.25)	0.29(0.12)	0.27(0.10)
지라	2.68(1.01)	1.34(0.55)	0.07(0.03)
이자	42.17(11.23)	0.08(0.03)	0.01(0.00)
위	14.16(4.43)	0.24(0.07)	0.05(0.02)
장	28.36(9.96)	0.12(0.05)	-
신장	12.53(3.15)	0.27(0.09)	0.09(0.03)
종양	-	3.18(0.89)	3.16(1.09)

기관	<u>F(ab')<sub>2</sub> 단편 (대조군)</u>		
	$\frac{cpm/g\text{종양}}{cpm/g\text{기관}}$	%주사량/g	%주사량/기관
혈액	29.27(13.17)	0.05(0.02)	-
피부	10.54(2.78)	0.12(0.02)	-
근육	55.50(14.49)	0.02(0.01)	-
뼈	23.73(7.89)	0.06(0.02)	-
심장	35.19(11.01)	0.04(0.02)	0.00(0.00)
허파	12.57(3.69)	0.10(0.03)	0.02(0.00)
간	10.43(4.20)	0.13(0.05)	0.12(0.04)
지라	2.59(1.03)	0.54(0.21)	0.03(0.01)
이자	31.55(9.82)	0.04(0.02)	0.00(0.00)
위	8.08(3.31)	0.17(0.06)	0.03(0.01)
장	22.27(7.93)	0.06(0.02)	-
신장	10.05(2.71)	0.13(0.04)	0.04(0.01)
종양	-	1.23(0.24)	1.42(0.48)

\*평균(표준편차)



표 2는 변형 Lym-1이  $F(ab')_2$  단편보다 혈액으로부터 더 천천히 제거된다는 것을 보여주고 있다. 변형 Lym-1은 주사 후 5일째에 0.09 % ID/g의 면역활성을 생성하여, 0.05 %의 혈액활성을 생성하는  $F(ab')_2$  단편보다 높은 값을 나타낸다. 도 5는 변형 Lym-1의 종양에서의 활성은 대응되는  $F(ab')_2$  단편의 방사능보다 약 2.5배 높다는 것을 보여주고 있다. 변형 Lym-1의 활성은 신장을 포함한 조사된 여러 기관들에 대해서  $F(ab')_2$  단편보다 높은 값을 나타내었다. 이는 더 빨리 제거 되는 항체일수록 신장에 축적된다는 이론과도 부합된다.

더욱이 도 6은 변형 Lym-1에 대한 종양 대 기관 비가  $F(ab')_2$  단편보다 더 높다는 것을 보여주고 있다. 따라서, 실시예 12 및 13의 실험은 본 발명의 변형 항체가 비변형 MAb 또는  $F(ab')_2$  단편보다 표적 종양에 대해 더 높은 활성을 가진다는 것을 확인해 준다. 추가적으로 상기 실험의 종양 대 기관 데이터로부터 변형 항체가 비변형 MAb 또는  $F(ab')_2$  단편보다 종양에 대해 더 높은 특이성을 가지고 있다는 것을 알 수 있다.

따라서, 본 발명의 변형 MAb의 개선된 면역 섬광조영술의 결과를 낼 수 있는 능력을 시험해 보았는데, 이들 시험 중 하나의 예가 실시예 14에 나타나 있다.

#### <실시예 14>

##### Lym-1의 이미지 처리(imaging) 연구

종양을 지닌 누드마우스는 핀홀 조준장치(pinhole collimator) 및 스펙트럼 91 감마 카메라(Raytheon)를 이용하여 이미지 처리하였다. 마우스의 이미지 분석으로 주사 후의 종양 대 체내 전 항체의 분포를 평가할 수 있었다. 주사 후 7일째에, 마우스를 0.2 ml s.c. 접종으로 투여된 2 mg 케타민 염산 및 0.4 mg 크실라진으로 마취시켰다. 마우스를 움직이지 못하게 한 후 10,000 카운트를 기록하도록 사전 설정된 카메라를 이용하여 후면에서 이미지 처리하였다. 어떠한 백그라운드도 제거하지 않았다. 사진 이미지는 330 타입의 폴라로이드형 330 팩 필름(Polaroid Type 330 Pack film)을 이용하여 이미지 처리했다. 각 이미지의 두 영역, 즉 부위 1은 전체 몸으로, 부위 2는 종양으로 정의된다. 도 6 내지 8은 본 실험을 통해 얻어진 예시적인 (신티그래프 또는 신티그램으로 알려진) 섬광조영을 도시하고 있다.

면역 섬광 조영술을 이용하여 비변형 Lym-1에 대한 이미지 처리가 주사 후 7일째에 이루어졌는데, 도 6에서 보는 바와 같이 만족스럽지 못하다. 도 6에서는 종양이 보이는 하지만 마우스의 나머지 부분도 또한 보인다는 것을 알 수 있다. 도 7 및 도 8은 접종 후 같은 시간에 표지되고 변형된 Lym-1이 주사된 두 종류의 다른 Raji 종양을 지닌 마우스의 이미지를 보여준다. 도 7 및 8은 종양에서의 표지된 변형 Lym-1의 농도 수준의 도 6에 나타난 비변형 Lym-1에 의해 생성된 것보다 매우 높은 값을 가짐을 보여주고 있다. 더욱 중요한 것은 변형 Lym-1에 의해 생성된 종양에서의 표지 대 전체 마우스의 백그라운드 비가 비변형 Lym-1보다 몇 배 더 높다는 점이다. 따라서, 도 7 및 8은 백그라운드가 전혀 없거나 거의 없이 종양을 뚜렷하게 보여주고 있다.

더욱이, 변형 Lym-1을 사용할 경우 주사 후 5일째에 만족스런 종양의 이미지를 얻을 수 있다. 도 10은 7일째에 촬영된 사진인 도 9에서 사용된 동물과 같은 동물을 5 일째에 찍은 사진이다. 도 10의 5 일째의 이미지는 도 7의 비변형 Lym-1에 의해 생성된 이미지보다 상당히 우수하다. 이러한 결과는 모든 시험 대상 마우스에서 동일하게 나타났다.

본 연구는 변형 항체 단편을 사용하면 항체의 종양 항원에 대한 특이적 활성이 증가되어, 종양에서 축적되는 항체의 절대 농도가 증가된다는 것을 제시한다. 이는 변형 Lym-1 단편의 절대 농도가 주사 후 7일째에 비변형 Lym-1 농도의 약 2배가 되고, 주사 후 5일째에는  $F(ab')_2$  단편보다 약 2.5배가 되는 것을 보여주는 결과에 의해 확인된다.

변형 Lym-1 단편의 제거시간이 빠를수록 높은 종양 대 백그라운드 비에 도달하는 데 필요한 시간을 상당히 감소시키고, 이에 따라 비변형 항체를 이용하는 경우보다 더 짧은 시간 내에 더 좋은 이미지를 얻을 수 있다.

항체의 특이성과 활성을 개선하는데 본 발명의 변형이 일반적인 유용성을 갖는다는 것을 보여주기 위하여, 추가적으로 MAb를 변형시켰다. 이러한 여러 가지 변형 MAb에 대한 시험은 실시예 15 내지 18에 나타나 있다.

#### <실시예 15>

### 단일클론 항체 B72.3의 제거율

B72.3(IgG<sub>1</sub>), 클론 암종에 대한 단일클론 항체는 Colcher, D. 등의 논문 "인간 유방암과 반응하는 단일클론 항체의 스펙트럼"(Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3199-3203 (1981))에서와 같이 얻어졌으며, 상기 논문의 개시 내용은 본 발명에 참조되어 본 발명의 일부를 이룬다. B72.3 MAb은 실시예 1의 방법에 따라 한 분자 당 평균 하나의 PDP 기를 갖도록 작용성화(functionalized)하였다.

변형된 B72.3 MAb은 실시예 3의 방법에 의해 방사성 동위원소로 표지하였다. 전 체내 제거 시간(total body clearance)은 실시예 10의 방법으로 측정하였다. 도 11은 전 체내 제거시간의 실험 결과를 보여준다. 변형 항체들은 전 체내 반감기 제거 시간(half-time clearance)이 비변형의 MAb 경우 약 6일인데 비해 변형된 항체의 경우 약 2.5일로 감소됨을 보여준다.

F(ab')<sub>2</sub> 단편의 반감기 제거 시간은 Lym-1 단편의 경우 약 12시간의 반감기를 가져 변형 항체보다 더 빠르다. 그 결과 변형 B72.3이 F(ab')와 비변형 항체의 중간에 해당하는 반감기 제거 시간을 가진다는 점에서 변형 Lym-1과 유사하게 행동함을 보여준다.

### <실시예 16>

### B72.3의 생체 분포

각각 다섯 마리의 마우스로 구성된 2개 집단에 있어서 쌍으로 표지(paired-label)된 생체 분포의 연구는 인체의 LS174T 클론 암종을 지니고 있는 무흉선 누드 마우스에 대해 실행하였다. 한 집단은 B72.3로 표지된 비변형의 I-125를 주사하였고, 다른 집단은 B72.3로 표지된 변형 I-131을 주사하였다. 또한, 혈액과 다양한 기관들에서의 암종의 생체 분포를 비교하는 실험도 행하였다. 사용된 방법은 실시예 11 내지 13과 같다. 결과가 표 3에 나타나 있으며, 도 11 및 12에서는 그래프로 나타나 있다.

### <표 3>

주사된지 4일 후, 인체의 LS174T 결장 암종을 가진 누드마우스(N=5) 내에서의 변형 및 비변형 단일클론 항체 B72.3의 생체 분포

변형 B72.3

기관	$\frac{cpm/g\text{종양}}{cpm/g\text{기관}}$	%주사량/g	%주사량/기관
혈액	6.16(2.32)*	1.10(0.45)	-
피부	20.81(3.92)	0.31(0.12)	-
근육	61.58(16.16)	0.11(0.05)	-
뼈	65.25(15.04)	0.10(0.04)	-
심장	31.41(18.44)	0.24(0.11)	0.03(0.02)
허파	11.89(3.25)	0.54(0.18)	0.14(0.04)
간	21.61(10.36)	0.33(0.14)	0.43(0.17)
지라	37.89(15.00)	0.18(0.09)	0.02(0.01)
이자	60.23(23.73)	0.12(0.06)	0.02(0.01)
위	37.74(9.20)	0.17(0.05)	0.04(0.01)
장	68.31(28.27)	0.10(0.04)	-
신장	24.56(10.07)	0.29(0.13)	0.09(0.04)
종양	-	6.02(1.33)	6.45(1.53)

비변형 B72.3 (대조군)

기관	$\frac{cpm/g\text{종양}}{cpm/g\text{기관}}$	%주사량/g	%주사량/기관
혈액	3.43(1.13)	1.34(0.60)	-
피부	10.44(1.80)	0.41(0.15)	-
근육	31.78(8.86)	0.14(0.05)	-
뼈	33.36(9.84)	0.14(0.06)	-
심장	16.57(8.28)	0.30(0.14)	0.04(0.02)
허파	6.42(1.59)	0.68(0.28)	0.18(0.08)
간	11.85(4.78)	0.39(0.16)	0.52(0.24)
지라	18.94(5.61)	0.24(0.12)	0.02(0.01)
이자	29.80(9.42)	0.15(0.05)	0.02(0.01)
위	18.88(3.83)	0.22(0.04)	0.05(0.01)
장	35.61(13.48)	0.13(0.06)	-
신장	15.20(6.40)	0.33(0.18)	0.11(0.06)
종양	-	4.04(0.84)	4.28(0.78)

\*평균(표준편차)

표 3에서 알 수 있는 바와 같이, 비변형 B72.3 항체는 주사 후 4일째에 1.34% ID/g에서 혈액 활성을 나타냈고, 종양에서는 4.04%의 활성을 나타냈다. 비변형 B72.3과 비교하여 변형 B72.3는 4일째에 더 낮은 혈액 활성(1.1%)과 더 높은 종양 활성(6.02% ID/g)을 나타냈다.

도 13에 도시된 바와 같이, 더 빠르게 항체가 제거되는 것을 기대했던 것처럼, 변형 B72.3에서 신장을 제외한 모든 다양한 기관의 활성이 더 높게 나타났다. 따라서, 도 14에 도시된 바와 같이 변형 B72.3에 대한 종양 대 기관 비는 비변형의 B72.3에 대한 종양 대 기관 비보다 상당히 더 높다. 신장의 경우 종양 부위에 변형 항체의 활성이 더 높았기 때문에 종양 대 기관 비가 훨씬 개선되었다.

#### <실시예 17>

##### 종양을 가진 마우스에서의 B72.3의 이미지 처리

변형 B72.3을 주사한 LS174T 종양을 가진 마우스의 이미지 분석은 주사후의 종양/전체 항체 분포의 추정값을 제공한다. 도 14는 주사 후 1일째의 면역 섬광조영 사진을 나타낸다. 이미지는 적은 백그라운드로 종양을 명확히 나타낸다. 도 15는 주사 후 4일째의 면역 섬광조영 사진을 나타낸다. 4일째까지 종양은 동물의 혈액 풀에 남아 있는 방사능이 거의 없다는 것을 분명하게 보여준다. 모든 동물에 대해 동일한 결과를 나타낸다.

따라서, 변형 B72.3은 B72.3과 반응하는 종양에 짧은 주사 시간 내에 양질의 면역 섬광조영 사진을 얻는데 매우 유용하다는 것이 발견되었다.

TNT-1은 인체의 암에 선택적인 결합을 위한 표적으로 괴사성 종양을 이용하는 단일클론 항체인 IgG<sub>2</sub>이다. 본 발명자들은 실시예 1에서 평균 한 분자당 1 PDP기로 항체를 변형시켰고, 실시예 18에서 모든 항체의 보류 시간을 분석했다.

#### <실시예 18>

##### 단일클론 항체 TNT-1의 이용

Epstein, 등의 논문 "인간 암에서 괴사성 병변(Necrotic Lesions)의 탐지를 위한 신규 방법"(Cancer Res. 48: 5842-5848 (1988))에서와 같은 방법으로 TNT-1을 얻었으며, 상기 논문의 개시 내용은 본 발명에 참조되어 본 발명의 일부를 이룬다.

TNT-1 MAb는 실시예 3의 방법에 의해 방사성 동위원소로 표지하였다. 전 체내 제거시간(total body clearance time)은 실시예 10의 방법으로 측정하였다. 도 16은 체내 전 제거 시간의 실험 결과를 나타낸다. 변형 TNT-1 MAb는 전 체내 반감기 제거 시간(half-time clearance)이 비변형 TNT-1에 비하여 상대적으로 감소하고, TNT-1의 F(ab')<sub>2</sub> 단편에 비하여 상대적으로 증가하였음을 나타낸다.

따라서, 변형 TNT-1의 행동은 나머지 변형 항체들과 유사하다. 이에 따라 본 발명자들은 변형 TNT-1의 행동은 나머지 변형 항체들과 유사하다. 이에 따라 본 발명자들은 변형 TNT-1 MAb의 이용이 나머지 변형 시험된 항체들과 동등할 것으로 예측한다.

실시예 19에는 비오틴화된 항체(biotinylated antibodies)를 제조하는데 유용한 하나의 방법이 기술되어 있다.

#### <실시예 19>

##### 비오틴화된 항체의 제조

TNT-1 과 Lim-1 MAb 는 각각 분리시켜서 6-(비오틴아미도) 헥사노에이트와 이의 설포 N-하이드록시숙시니마이드 에스테르 (NHS-LS-biotin)와의 반응에 의해 접합하였다. 통상적으로 1 mL의 식염수에 2 mg의 NHS-LC-비오틴 기준 용액을 준비하였다. pH 8.5의 NaHCO<sub>3</sub> 완충액에 1 mL의 항체(10 mg/mL)를 포함하는 5 mL 시험관에 1 mL의 NHS-LC-비오틴 기준 용액을 첨가하였다(NHS-LC-비오틴/MAb의 몰비 50:1). 이 반응 혼합물을 실온에서 2.5시간 동안 낮은 속도로 지속적으로 저으며 항온 배양하였다. 항온 배양 후에 결합된 항체들은 pH 7.2의 PBS와 평형을 이루고 있는 PD-10 칼

럼(Pharmcia)에서 크로마토그래피로 분리하였다. 커플링된(coupled) 항체의 제제의 순도는 수퍼로즈(superose)-12칼럼을 이용하는 FPLC에 의해 평가하였다. 상기 방법의 결과는 항체의 비오틴화된 항체가 적어도 99% 순도로 얻어짐을 나타냈다.

각각의 항체들과 결합되어 있는 비오틴기의 평균 숫자는 Green에 의해 설명된 방법(Biochem J.94:23c-24c, 1965)에 따라 분광광도법으로 측정하였다. 간단히 말하면, 비오틴화된 항체는 37℃에서 4시간 동안 1%프로테아제에 의해 효소적으로 분해된다. pH7.2의 0.1M PBS 용액에 100  $\mu$ M HABA, 800  $\mu$ L를 포함하는 5mL 용액에 17 $\mu$ M 스트렙타비딘 용액을 첨가했다.

그 후, 스트렙타비딘-HABA 용액은 소화된 비오틴화 항체의 부피를 증가시키며 적정했고 500nm에서 흡광도의 변화를 측정했다. 이러한 처리를 통해 프로테아제로 처리된 항체 용액 내에 들어 있는 비오틴의 농도는 비오틴 용액에 의한 표준 곡선을 이용하여 계산될 수 있다. 결과는 3 내지 4개의 비오틴의 일부가 각 항체마다 결합되었다는 것을 나타낸다.

비오틴-항체 접합 화합물은 필수적으로 실시예 3에서 설명되었던 클로라민-T 방법을 사용하여  $^{125}$ I로 방사능 표지하였다.

실시예 20은 항체와 항체 단편들의 방사성 요오드화에 사용되는 방법들을 기술하고 있다.

#### <실시예 20>

##### 항체의 직접 방사성 요오드화

모든 항체들(비변형 항체, 변형 항체 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편)은 실시예 3에서 설명된 바와 같이 수정된 클로라민-T 방법을 이용하여  $^{125}$ I 또는  $^{131}$ I로 요오드화하였다. 통상적으로 요오드-125 또는 요오드-131 0.5-1.0 mCi 및 43mM 클로라민-T 수용액 10 $\mu$ L는 100  $\mu$ L PBS에 용해된 단일클론 항체 50-100  $\mu$ g을 포함하는 시험관에 첨가하였다. 3분 후에 반응은 120  $\mu$ M의 소듐 메타비설피트 용액 20 $\mu$ L로 억제시켰다. 방사능 표지된 항체는 세파텍스 G-25 칼럼을 사용하여 정제하였다. 이 칼럼은 면(V<sub>0</sub> = 4.5 mL, V<sub>t</sub> = 12 mL)으로 틀어 막은 혈청 플라스틱 피펫(8×200 mm)으로 구성되었다. 각 반응 혼합물은 칼럼 상에 장착하여 pH 7.2의 PBS로 희석시켰다. 1 mL Tlr의 정제물을 포함하는 각각의 시험관은 섬광 카운터에서 측정하였다. 방사능 표지된 항체들은 80 내지 90%의 수율로 회수된다. 클로라민-T 방법으로 방사능 표지된 항체들은 유리 섬유가 침윤된 실리카겔 상에서 분석 순간 박막 크로마토그래피(ITLC) 시스템으로 분석하였다. 스트립(2X20 cm)은 사용하기 전에 110℃에서 15분 동안 가열함으로써 활성화시켰고, 표본 1 $\mu$ L로 점적하고, 공기로 건조시킨 후, 약 12 cm 전개되는 동안 메탄올/H<sub>2</sub>O로 용리시키고, 다시 공기로 건조시키고, 중간에서 잘라서 측정하여 단백질 결합과 비단백질 결합의 방사능 활성을 결정하였다. 이런 절차의 결과 99% 이상의 항체가 단백질과 결합된 것을 나타내고, 그 때문에 기능적으로 방사능 표지되고 비오틴화된 항체들은 고순도로 얻어질 수 있다는 것을 확인하였다.

상기 방법으로 준비된 방사능 표지되고 비오틴화된 항체들을 4℃에서 저장하고, 표지된지 4시간 이내에 마우스에 투여하였다.

다음 2가지의 실시예는 분석적인 절차의 결과들은 방사능 표지되고 비오틴화된 항체들이 표적 항원들과 결합하는 능력을 보유하며, 혈청 성분들이 있는 상태에서 안정하는 것을 입증하고 있다.

실시예 21은 비오틴화 및 방사능 표지에 의해서 변형 항체들이 항체 결합 능력과 구조적인 고유성을 지닌다는 것을 설명하는데 사용되는 방법들을 기술하고 있다.

#### <실시예 21>

##### 면역 반응성 평가

생체외(in vitro)에서 방사능 표지된 Lym-1은 Epstein 등의 방법(Cancer Res., 47:830, 1987)에 EK라 Raji 세포를 사용한 살아있는(live) 세포 분석으로 측정할 수 있다. Riji 세포(10<sub>5</sub>/시험관)를 PBS 내에서 1% 소 혈청(BSA) 100  $\mu$ L에 부유시켰다. 표지된 Lym-1(100  $\mu$ L)를 각각의 시험관(약 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ g:100,000 cpm/튜브)에 첨가하고, 오비탈 진탕기를 사용하여 계속적으로 섞으면서, 실온에서 한 시간 동안 3배로 항온 배양하였다. 항온 배양 후, 5분 동안 1000 rpm의 속도로 원심

분리 시킨 후 상층액은 따라내고, 세포들은 200  $\mu$ L PBS에 부유시키는 방법에 의해 PBS 중에 들어 있는 1 % BSA로 세포들을 세 번 세척하였다. 세척을 완료한 후 감마 카운터를 이용하여 세포 관련된 방사능을 측정하는 방법에 의해 결합된 Lym-1을 추적하였다. 이런 절차의 결과는 실시예 6에서 제시되었던 것과 실질적으로 동일하다. 보다 상세하게 설명하면, 방사능 표지된 비변형 Lym-1의 75%와 방사능 표지되고 비오틴화된 Lym-1의 항원 결합 활성이 표준 대조군으로 사용되는 방사능 표지된 비변형 Lym-1의 결합 활성과 거의 동일하다는 것을 나타냈다.

변형 TNT-1 MAb의 면역 반응성은 Gaffar 등의 논문 "고정 세포 방사능 면역 분석법"(J. Immunassay, 2:11 (1991))을 사용하여 측정할 수 있다. 요약하면 방사능 표지된 TNT-1과 방사능 표지되고 비오틴화된 TNT-1을 실온 상태에서 PBS에서 20%의 파라포름알데히드로 고정된 Raji 세포와 함께 30분 동안 항온 배양 후, 20°C에서 아세톤으로 처리한다. PBS에 들어 있는 1% BSA로 세포들을 세척한 후, 감마 카운터로 측정한다. 이 절차의 결과들은 양쪽 항체 준비물들의 약 60% 정도가 고정 세포에 결합한다는 것을 나타낸다. 상기 결과는 방사능 표지된, 비오틴화 TNT-1의 항원 결합 활성이 표준 대조군으로 사용되는 방사능 표지된 비변형 TNT-1의 결합 활성과 거의 동일하다는 것을 나타낸다.

실시예 22는 방사능 표지되고 비오틴화된 항체들이 특이하게 혈청의 정제하에서 분해되지 않는다는 것을 입증하는 방법을 기술하고 있다.

#### <실시예 22>

##### 변형 항체의 혈청 안정성

$^{125}$ I로 직접 표지된 MAb를 신선한 마우스 혈액을 포함하는 세 개의 시험관에 첨가하여 최종 농도가 100  $\mu$ g/mL가 되도록 하였다. 모든 표본들을 37°C에서, 공기 중에 5% CO<sub>2</sub> 농도가 유지되고 습기있는 항온 배양기에서 항온 배양하였다. 8일 까지 여러 시간에 걸쳐, 각각의 표본 100  $\mu$ L에 100%의 트리클로로아세트산(TCA) 900  $\mu$ L를 첨가하고, 5분 동안 실온에서 항온 배양한 후, 원심분리기로 단백질을 침전물을 얻어내는 방법에 의해서 단백질과 결합된 방사능 표지가 결정되었다. 상층액 500  $\mu$ L가 각각의 시험관으로부터 수득하였고, 감마 카운터를 사용하여 방사능을 측정하였다. 그 결과 방사능 표지되고 비오틴화된 항체가 시험관내에서 모든 시점에 안정하다는 것으로 나타났다. 보다 상세하게는 적어도 방사능 표지의 97%가 항온배양 8일 후에도 단백질과 결합된 상태로 남아 있었다. 이것은 MAb에 존재하는 비오틴의 일부분이 방사능과 결합된 단백질의 안정성에 악영향을 끼치지 않는다는 것을 확실하게 보여주고 있다.

동일 분취량의 항온 배양된 혈청 혼합물은 비환원성 SDS-PAGE와 자기방사법(autoradiography)에 의해서 연속적으로 확인하였다. 이 실험에서 표본들을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동시켜, X-레이 필름에 노출시키는 방법에 의해서 관찰하였다. 표본들의 분자량은 기준 분자량과 비교하는 방법으로 결정하였다. 이런 절차의 결과, 방사능 표지된 비변형 MAb와 방사능 표지된, 비오틴화된 MAb의 분자량이 실제적으로 거의 비슷하다는 것을 나타냈다. 보다 상세하게는 방사능 표지된 Lym-1과 방사능 표지되고 비오틴화된 Lym-1에 대한 주요 밴드들은 약 200,000정도의 분자량을 갖는다. 마찬가지로 방사능 표지된 TNT-1과 방사능 표지되고 비오틴화된 TNT-1을 위한 주요 밴드들은 약 150,000의 분자량을 가지고 있었다.

폴리아크릴아마이드 겔에서의 등전점 측정은 Biorad 모델 111 미니 IEF 세포에서 실행되었다. 표본들의 전기영동은 BioRad의 의해 제공된 방법에 따라 1.2%의 3/10 양쪽성 전해질과 0.8%의 5/8의 양쪽성 전해질로 된 바이오라이트 양쪽성 전해질(Biolyte ampolyte : Biorad)의 혼합물로 구성된 pH 구배에서 행하였다. pI 값을 보정하기 위하여 각각의 전개에 IEF 기준(Biorad)을 포함시켰다. IEF 겔은 코마시 블루(Coomassie Blue) R-250로 염색하여 밤새 건조시켰다. 이 절차의 결과에 의해 MAb의 비오틴화가 실제적으로 거대 물질의 전하 특성을 바꾸었다는 것이 확인되었다. 방사능 표지된 Lym-1은 7.8의 pI 값을 갖는 반면 방사능 표지된 비오틴화된 Lym-1은 5.6의 pI 값을 갖는다. 마찬가지로, 방사능 표지된 TNT-1 MAb는 4.5 내지 5.0을 갖는다. 따라서, 비오틴화된 항체의 감소된 염기적 특성(basic character)에 의해 증명되는 바와 같이, MAb 단백질 상에 있는 아미노기의 변형은 예상대로 효과적으로 단백질 상에 있는 약간의 양전하를 제거하거나 중성화시켰다.

실시예 23은 아미노사이드 부분이 화학적으로 변형되어 비변형 항체에 비하여 감소된 등전점을 갖는 거대분자가 되는 MAb는 증가된 표적 특이성, 감소된 비특이적 결합 및 감소된 제거 시간을 효과적으로 나타내고 있다.

#### <실시예 23>

##### 생체 분포 연구



생후 6주된 누드마우스 두 집단에 Khawli 등의 논문 "면역결합체 및 방사성의약"(Antibody, 6:13 (1993))에 개시된 방법에 따라 Raji 림프종 세포, LS-174T 결장 암종 세포 또는 ME-180 경구 암종 세포를 주사하였다. 종양은 직경이 약 1 cm 가 될 때까지 10 내지 21일 동안 성장하였다.

(a) 쌍-표지(Paired label)

제1 마우스 집단(n=6)에서 각각의 마우스에 120  $\mu\text{Ci}/10\mu\text{g}$ 의  $^{131}\text{I}$ 로 표지된 변형 MAb와 25  $\mu\text{Ci}/10\mu\text{g}$ 의  $^{125}\text{I}$ 로 표지된 비 변형 MAb를 포함하는 0.2mL 접종물을 정맥 주사로 주사하였다. 제2 집단(n=4)에서는 마우스에 120  $\mu\text{Ci}/10\mu\text{g}$ 의  $^{131}\text{I}$ 로 표지된 변형 MAb와 25  $\mu\text{Ci}/10\mu\text{g}$ 의  $^{125}\text{I}$ 로 표지된 MAb F(ab')<sub>2</sub>를 0.2 mL 포함하는 접종물을 주사하였다. 모든 실험에서 마우스들은 주사 후 미리 선택된 시간에 경구 탈골에 의해 희생되고 다양한 종류의 기관, 혈액, 종양이 제거되어 무게가 측정된다. 그 다음에 모든 종류의 표본들은  $^{131}\text{I}$ 와  $^{125}\text{I}$ 의 활성을 정량화하기 위해 감마 계측기에서 측정하였다.  $^{125}\text{I}$  카운트(channel counts)의 17%를 감산함으로써 교차에 대해 조정하였다. 모든 데이터는 또한 동물이 희생당한 시간에 따라  $^{131}\text{I}$  동위원소의 방사성 붕괴에 대해 수정하였다. 각각의 마우스에 있어서 데이터는 그램 종양 당 cpm/ 그램 기관 당 cpm, 및 % 용량/그램으로 표시하였다. 이 데이터로부터 각 집단의 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 동일한 쌍-표지 생체 분포 연구가 Raji 림프종 모델에 있는 Lym-q 및 LS-174-T 인간 결장 암종 모델에 있는 B72.3을 이용하여 실행하였다.

상기 절차의 결과를 도 17에 나타내었다. 도 12a 에 나타난 바와 같이, 비변형 TNT-1과 TNT-1/비오틴 변형 MAb가 모두 주사 후 첫날에 종양 조직에 위치하는 반면, 비오틴화된 항체는 %주사량/gram 종양에 의해 측정된 것에 따르면 더 큰 정위(定位)를 나타냈다. 중요한 점은 이 조직들과 비특이적으로 관련된 비오틴화된 TNT-1의 양은 그러한 비특이적 결합을 나타내는 비변형 TNT-1의 양보다 한결같이 더 적다는 것이다. 따라서 비변형 항체와 비교하여 비오틴화된 항체에 있어서, 특이적 결합의 수준은 증가되었고 비특이적 결합의 수준은 감소되었다. 변형 항체의 장점이 도 17b에 양적으로 나타나 있고, 비특이적으로 위치한 항체 대 종양에 위치한 항체의 비가 각각의 조직에 대하여 나타나 있다. 예시된 바와 같이, 이미지처리 시약(imaging reagent)으로서 비오틴화된 항체의 장점은 근육과 이차에서 특히 자명하다.

주사 후 3일째에 얻어진 측정에서도 유사한 경향이 관찰되었다. 도 17c는 비오틴화된 TNT-1 항체가 비오틴화되지 않은 다른 항체보다 더 효과적으로 종양 조직에 정위된다는 것을 보여준다. 동시에 비특이적 결합을 하는 양은 비오틴화된 종에 있어서 더 적다는 효과를 나타내었다. 도 17d는 다양한 조직에서 신호 대 잡음비를 반영하는 종양/조직 비가 근육과 이차에서 가장 높다는 것을 수량적으로 확실히 보여주고 있다. 도 17c 및 도 17d는 빠른 전 체내 제거율을 갖는 TNT-1 F(ab')<sub>2</sub> 단편들을 통해서 얻어진 결과들을 포함하고 있다는 점에 유의하여야 한다. 종양/기관 비가 몇몇 조직 형태에 있어서 비오틴화된 TNT-1보다 항체 단편이 높음 값을 갖지만, 종양에 정위되어 주사되고 비오틴화된 TNT-1 부분은 상당히 높은 값을 갖는다. 이러한 결과들은 비오틴화된 MAb 가 비변형 MAb 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편보다 우수하게 종양 조직에 정위되어 있다는 것을 나타낸다.

(b) 전 체내 제거(whole-body clearance)

Balb/c 마우스(n=4)의 다른 여러 집단에 방사능 표지된 항체들을 정맥 주사하는 실험을 수행하였다. 주사시 및 그 후 선택된 시간에 주사량 측정기를 통해 전 체내 활성을 측정되었다.

도 18 및 도 19는 TNT-1, Lym-1 항체 및 그 유도체들에 대한 전 체내 제거율의 결과를 나타낸다. 도 19에 제시된 결과는 SPDP 또는 비오틴을 통한 TNT-1의 변형이 비변형 항체에 비해 상대적으로 제거 시간을 감소시킨다는 것을 나타내었다. 본 제거율 측정에서, 실험된 모든 항체들 중 가장 빠른 제거율을 가지고 있는 F(ab')<sub>2</sub> TNT-1 단편을 양성 대조군으로 사용하였다. 따라서, 비오틴화된 TNT-1 MAb는 비오틴화되지 않은 항체보다 더 빠른 제거율을 나타낸다는 효과를 보여 주었다. 마찬가지로, 도 19에 나타난 결과는 비오틴에 의한 변형 Lym-1 MAb가 비변형 항체에 비하여 제거 시간을 감소시키고 있다는 것을 보여 주었다. 이는 항체의 등전점을 감소시키기 위해 유리 아미노기의 일부를 화학적으로 변형시키는 반응물들이 항체 결합 특이성 및 전 체내 제거율을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

본 발명의 방법을 사용한 항체의 변형은 개선된 종양 이미지를 수득하는데 유용한 물질을 제공한다. 본 발명의 방법을 사용하여 원하는 조직 유형의 이미지를 만들어 내기 위해서는, 먼저 그 조직 유형에 대한 항체들을 수득하여야 한다. 다클론 항체를 수득하는 방법은 당업계에 공지된 방법이다. 대신에, 단일클론 항체는 당업계에 공지된 기술로써 이러한 종류들의

항체에 의해 제공되는 증가된 특이성을 획득할 목적으로 제조할 수 있다. 이어서, 항체들은 헤테로 이작용성 물질, 비오틴 또는 비변형 항체보다 더 낮은 등전점을 가지는 변형 항체 산물을 유도할 수 있는 기타 다른 물질과의 접합에 의해 유리 아미노기에서 화학적으로 변형시켰다. 접합 후, 변형된 항체에 적당한 표지를 부착시켰다.

상기 실시예들에 있어서, 감마선을 방출하는 방사성핵종을 포함하는 표지의 이미지를 사용한다 할지라도, 본 발명의 범위 내에서 많은 다른 유형의 표지와 이미지 처리 시스템들이 고려된다. 예를 들어, 바륨, 세슘, 요오드 같은 비투과성 방사성 물질들은 평범한 X-선을 사용하여 이미지 처리할 수 있다. 상자성체 또는 초자성체 입자들이 항체 위치의 상을 나타내는 MRI 이미지 처리 기술을 사용하여 표지로 사용할 수 있다. 이와 같은 대안의 표지들은 통상적인 방법들을 사용하여 변형 항체에 접합시킬 수 있다.

이와 같이 표지된 항체들은 약학적 허용 부형제, 담체 또는 기재들을 포함하는 대상물에 표지를 삽입하는 약품 제제에 포함시킬 수 있다. 적당한 담부형제, 담체 또는 기재들로는 식염수, 인산염 완충 식염수, 글리세롤, 탄산칼슘 염 등을 들 수 있다. 이어서, 감소된 신호 강도가 요구되거나 또는 구강 내 조직의 이미지 처리가 바람직한 경우에 국소 주사, 정맥 주사 또는 경구 투여와 같은 각종 수단을 통해 이들 조성물을 도입시켰다. 그러나, 항체에의 표적 조직의 노출을 최대화하기 위해서는 전신 주사(systemic injection)를 통한 투여가 바람직하다.

본 발명에 따라 상응하는 본래의 비변형 항체보다 낮은 등전점을 가지는 변형 항체를 생성시키기 위한, 헤테로 이작용성 제제, 비오틴 또는 기타 제제의 첨가에 의해 항체 상에 배치된 유리 아미노기의 화학적 변형은 이들 변형 항체가 면역 치료제에 혼입될 경우에 유의적으로 향상된 결과를 나타내는 것으로 여겨진다. 일반적으로, 상기 치료제들은 1종 이상의 생물학적 활성 분자와 결합된 종양 또는 기타 질병 조직에 특이적인 항체를 포함한다. 상기 치료제에 작용하는 적당한 생물학적 분자들로는 디프테리아 독소(리신) A-사슬 또는 당업계에 공지된 각종 독소들과 같은 독소; 이트륨, 요오드, 인의 방사성 동위원소 및 통상 사용되는 방사성 치료 제와 같은 방사성핵종; 메토타렉세이트, 5-플루오로-우라실 또는 아드리아마이신과 같은 약물; EDTA 및 EGTA를 포함하는 킬레이트; cis-플라티늄 및 기타 다른 독성 유기금속 제제; 및 임의의 기타 치료제 등을 들 수 있다.

아직까지는 효과적인 면역 치료 가능성들이 완전히 현실화되지 않았다. 본 발명의 변형 항체의 증가된 활성 및 특이성은 종래의 면역 치료 약물의 부족을 극복하기 위해 이들의 표적 조직에 대한 충분한 활성과 특이성을 갖는 면역 치료 약물을 생산할 것이다. 따라서, 숙주에 적당한 면역 치료제를 주사할 경우, 숙주의 건강한 조직에 유의적으로 영향을 미치지 않고 표적 질병 조직을 사멸시킬 수 있다.

이러한 면역 치료제의 사용에 있어서, 먼저 특정 바람직하지 못한 조직 유형에 특이적인 항체를 수득한다. 소정의 항체를 이용할 수 없는 경우, 항원을 유기체에 주사하고 당업계에 공지된 기술을 사용하여 포유 동물로부터 혈청을 수득함으로써, 적당한 유기체 내에 항체를 생산할 수 있다. 대안으로, 당업계에 공지된 방법으로 단일클론 항체를 생산하는 것이 바람직하다. 이어서, 항체는 헤테로 이작용성 제제, 비오틴 또는 항체 분자 상에 존재하는 아미노기를 변형시킬 수 있는 다른 제제와 같은 제제와 화학적으로 접합된다. 접합 후, 그 결과로 생성되는 변형 항체는 상기 치료제 또는 탐지가능한 표지와 같은 생물학적 활성 제제와의 접합에 의해 추가로 변형시켰다. 약학적 허용 담체, 부형제 또는 기재를 함유하는 약학 조성물에 항체를 결합시켰다. 상기 약학적 허용 담체, 부형제 또는 기재로는 통상의 전신 주사용 식염수, 글리세롤, 탄산 칼슘 등을 들 수 있다. 이어서, 상기 조성물을 포유 동물과 같은 환자에 즉시 도입시킬 수 있다.

이어서, 임의의 공지된 투여 경로를 통해 숙주에 항체를 도입시켰다. 예를 들어, 상기 조성물은 전신 주사, 국소 주사를 통해 손상된 조직에 도입시킬 수 있고, 외부적으로 손상된 조직에 국소적으로 도포할 수 있으며, 감소된 신호 강도가 요구되거나 구강 내 조직의 치료를 요하는 경우 경구 투여할 수 있다.

항체를 함유하는 생물학적 활성 제제의 용량은 독소에 대한 표적 조직의 감수성, 손상된 조직의 양, 투여 경로, 항체의 친화성, 제거율 및 기타 다른 인자에 좌우된다. 그러나, 대표적인 용량은 일반적으로  $1 \mu\text{g}/\text{kg} \times \text{체중}$  내지  $1 \text{ mg}/\text{kg} \times \text{체중}$  범위이다. 대부분의 경우, 용량은  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  내지  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이 바람직하다.

하기 실시예는 마우스 내의 Raji 종양에 대해 효과적인 면역 치료법을 예시하고 있다. 이 실시예에서는 PDP-변형 항체가 사용되지만, 상응하는 본래의 비변형 항체보다 낮은 등전점을 가지는 변형 항체를 생산하는 비오틴과 같은 다른 제제에 의해 변형된 유리 아미노기를 갖는 항체들도 동일하게 양호한 효과를 낼 것으로 예측된다.

#### <실시예 24>

##### 마우스 내의 Raji 종양의 치료

실시에 1에서와 같이 PDP-변형 Lym-1을 수득하였다. 이어서, 변형 항체를 처리하여 평균적으로 항체 1 분자 당 1개의 리신 A-사슬을 도입시켰다. 마찬가지로, 본래의 비변형 Lym-1 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 독소와 결합시켰다.

25 마리의 마우스를 5개의 집단으로 나누었다. 제1 집단에는 8주 동안 1주에 1회씩 PBS에 용해된 리신-PDP 변형 Lym-1을 10 µg/kg×체중만큼 정맥 주사하였다. 제2 집단에는 동일한 양의 리신-비변형 Lym-1을 주사하였다. 제3 집단에는 Lym-1의 리신-F(ab')<sub>2</sub> 단편을 동일한 양으로 주사하였다. 제4 집단에는 동일한 양의 비접합 리신을 주사하였다. 제5 집단에는 PBS만 주사하였다.

8주 후, 실시예 14의 방법을 이용하여 생존하는 모든 마우스들에 대해 면역 섬광 조영술을 수행하였다. 제1 집단은 다른 모든 집단에 비하여 종양이 감소된 것으로 나타났다. 제2 집단 및 제3 집단에 생존하는 마우스들도 제1 집단의 마우스들과 같은 정도는 아니지만 다소 개선된 것으로 나타났다. 제5 집단의 마우스들은 질병이 심해지거나 사망하였다.

따라서, 본 실시예는 본 발명의 변형 항체를 사용하면 종양의 특수 치료 효과가 나타난다는 것을 보여 준다. 실시예 19는 본 발명의 PDP-변형 항체를 사용할 경우 보다 우수한 결과가 얻어진다는 것을 나타낸다. 기타 다른 종양, 또는 마우스 또는 인간과 같은 다른 포유 동물 내의 병든 조직을 치료하는데 효과적인 유사한 결과를 나타낼 것이다. 실시예 20은 인간의 췌장암에 대해 효과적인 치료법의 사용을 보여 준다. 이 실시예에서 PDP 변형 항체를 사용하였지만, 자연 상태의 등전점보다 낮은 등전점을 가지는 변형 항체를 생산하는 비오틴과 같은 다른 제제에 의해서 변형된 유리 아미노기를 갖는 항체들도 동일하게 양호한 결과를 나타낼 것으로 예측된다.

<실시예 25>

#### 인간의 췌장암의 치료

인간의 췌장 종양에서 발견되는 항원에 특이적인 단일클론 항체를 수득하였다. 실시예 1에서와 같이 항체 1 분자 당 평균 1개의 PDP 기를 갖도록 접합시켰다. 이어서, 실시예 19에 리신에 대해 설명한 것과 마찬가지로 변형 항체와 메토틱렉세이트를 접합시켰다.

10명의 췌장암 환자들을 2개의 집단으로 나누어 치료하였다. 제1 집단은 통상적인 치료법과 함께, PBS에 용해된 약물-PDP-MAb을 20 µg/kg×체중만큼 1주에 1회씩 정맥 주사하였다. 제2 집단은 대조군으로서 통상적인 방법과 함께 1주에 1회씩 PBS만을 주사하였다. 10주 후에 살아있는 생존자들에 면역 섬광 조영술을 수행하였다.

면역 섬광 조영술의 수행시, 제1 집단 환자들의 이미지에 나타난 종양의 평균 크기는 대조군보다 상대적으로 감소되었다.

따라서, 상기 실시예는 인간에 대한 면역 치료법에 있어서 변형 항체들이 유용성을 가짐을 나타낸다.

전술한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 변형된 항체를 포함하는 약학 조성물로 제제화할 수 있다. 따라서, 면역 치료법에 사용되는 약물과 접합되는 PDP-변형 항체는 본 발명의 항체-독소 접합체를 세포 독성에 효과적인 양만큼 갖는 주사제의 일부로 할 수 있다. 하기 실시예는 인간의 B-세포 림프종에 대해 효과를 갖는, 세포 독성에 효과적인 조성물의 실시예이다.

<실시예 26>

#### 인간의 B-세포 림프종에 효과적인 약학 조성물

실시예 18로부터의 10 mg/ml의 방사능 표지된 변형 Lym-1

균형 인산염 완충 식염수(PBS) (0.9%)

또한, 방사능 표지된 MAb는 면역 섬광 조영술에 있어서 특이성 항원을 가시화하는데 효과적인 조성물로 제제화할 수 있다. 다음은 상기 조성물의 일례이다.

<실시예 27>

## 결장 암종의 면역 섬광 조영술에 효과적인 약학 조성물

실시에 15로부터의 10 mg/ml의 방사능 표지된 변형 B72.3

균형 인산염 완충 식염수(PBS) (0.9%)

실시에 23에 방사능 표지되고 비오틴화된 항체의 위치를 결정하는 한가지 방법만을 기술하였지만, 당업자는 방사능 표지된 항체에 사용되는 대안의 방법들도 적용할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 방사능 표지되고 비오틴화된 항체들의 분포는 실시예 14에 기재되어 있는 바와 같이 면역 섬광 조영술 이미지 처리에 의해 위치를 정확히 확인할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 종양 항원에 특이적으로 결합하는 방사능 표지되고 비오틴화된 MAb는 진단 절차에 유용할 것이다. 하기 실시예는 상기 이미지 처리 기법을 수행하는 방법에 대해 설명한다.

실시에 28은 생체내에서 종양 세포의 이미지를 나타내는데 방사능 표지되고 비오틴화된 MAb를 사용할수 있는 한가지 방법에 대해 설명한다.

<실시에 28>

### 흑색종 종양 세포의 이미지 처리

먼저 전이성 흑색종으로 진단된 인간 환자를 확인하였다. 면역 섬광 조영술 분석의 결과, 흑색종이 하나의 항흑색종 MAb로 염색가능한 세포 표면 항원을 발현시키는 것으로 나타났다. 항흑색종 MAb는 먼저 실시예 19의 방법에 따라 유리 아미노기의 비오틴화에 의해 화학적으로 변형시키고, 실시예 20의 방법에 따라  $^{131}\text{I}$ 로 방사능 표지하였다. 이어서, 거의 정제되고, 방사능 표지되며, 비오틴화된 항흑색종 MAb를 약학적 허용 부형제와 결합시켜 환자에게 투여하였다. 3일 후, 주사된 변형 MAb의 상당수가 흑색종 항원을 발현시키는 세포에 위치했다. 이어서, 위치가 확인된 MAb는 핀홀 조준기 및 스펙트럼 91 감마 카메라(Raytheon)를 사용하는 면역 섬광 조영술 이미지 처리에 의해 가시화하였다. 사진 기록은 환자 피부 상의 소규모 영역에 방사능 활성을 나타냄으로써, 이차 종양을 확인하였다.

특정 기계적 또는 화학적 변이는 당업자에게 자명할 것이다. 상기 실시예들과 상세한 설명은 예시에 의해 부여된 바와 같이 명확히 이해될 수 있으며, 본 발명의 정신과 범위는 첨부되는 청구범위에 의해서만 제한될 수 있다.

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1.

변형 항체를 함유하는 조성물로서, 상기 변형 항체는

복수개의 유리 아미노기를 포함하는 항체;

복수개의 유리 아미노기 중 하나 이상의 부위에서 헤테로 이작용성 물질을 통하지 않고 항체에 결합된 염료, EDTA, DPTA, TETA 또는 비오틴;

염료, EDTA, DPTA, TETA 또는 비오틴이 결합된 부위가 아닌 다른 부위에서 항체에 부착된 방사성핵종(radionuclide), 독소, 약물 또는 킬레이트

를 포함하며;

여기서 상기 변형 항체는 동일한 유형의 비변형 항체에 비하여 감소된 순 양전하(net positive charge)를 가지며;

상기 변형 항체의 생체내 제거율(clearance rate)이  $F(ab')_2$  단편의 제거율과 동일한 유형의 비변형 항체의 제거율 사이에 해당하는 조성물.

## 청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

## 청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 항체가 비오틴에 접합되는 것을 특징으로 하는 조성물.

## 청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 항체가 EDTA, DPTA 또는 TETA에 접합되는 것을 특징으로 하는 조성물.

## 청구항 5.

제1항에 있어서, 할로젠 방사성핵종 또는 테크니시움(Technicium)이 변형항체에 부착되는 것을 특징으로 하는 조성물.

## 청구항 6.

제 5항에 있어서,  $^{125}\text{I}$  또는  $^{131}\text{I}$ 가 변형 항체에 부착되는 것을 특징으로 하는 조성물.

## 청구항 7.

제1항에 있어서, 상기 항체가 메토틱렉세이트, 5-플루오로-우라실, cis-플라티늄 또는 아드리아마이신에 접합되는 것을 특징으로 하는 조성물.

## 청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 항체가 리신 A-사슬(ricin A-chain)에 접합되는 것을 특징으로 하는 조성물.

## 청구항 9.

면역 섬광 조영술(immunosciintography)용 약학 조성물로서,

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항의 항체; 및

면역 섬광 조영술에 있어서 허용가능한 약학적 허용 부형제, 담체 또는 기재(基材; base)를 포함하는 약학 조성물.

## 청구항 10.

제9항에 있어서, 포유 동물 내 항원의 위치를 결정하는데 사용되는 조성물.

## 청구항 11.

제10항에 있어서, 감마 카메라 면역 섬광 조영수에 사용되는 조성물.

## 청구항 12.

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 암의 진단 및 치료에 사용되는 조성물.

## 청구항 13.

증가된 항원 결합 특이성, 감소된 비특이적 결합 및 감소된 생체내 제거 시간(clearance time)을 가지는 제1항의 변형 항체를 제조하는 방법으로서,

본래의 비변형 항체를 수득하는 단계;

1개 이상의 유리 아미노기를 염료, 킬레이트 또는 비오틴과 반응시켜서 본래의 비변형 항체보다 더 낮은 등전점을 갖는 변형 항체를 생성시키는 단계; 및

방사성핵종, 독소, 약물 또는 킬레이트로 변형 항체를 표지화하여 표지된 변형 항체를 생성시키는 단계를 포함하는 방법.

## 청구항 14.

제13항에 있어서, 상기 표지가 할로젠 방사성핵종 및 테크네튬으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방사성핵종인 방법.

## 청구항 15.

제14항에 있어서, 상기 표지가  $^{125}\text{I}$  및  $^{131}\text{I}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

## 청구항 16.

인간을 제외한 포유 동물 내 항원의 위치를 결정하는 방법으로서,

위치결정되는 항원에 대한 결합 특이성을 가지는, 표지된 변형 항체로서, 동일 유형의 비변형 항체에 비하여 더 적은 수의 유리 아미노기와 감소된 등전점을 갖고 그 안에 검출가능한 표지를 혼입한 표지된 변형 항체를 수득하는 단계;

인간을 제외한 포유 동물에 표지된 변형 항체를 투여함으로써 항원과 표지된 변형 항체가 생체내에서 결합되도록 하는 단계; 및

항원에 결합된 표지된 변형 항체를 검출함으로써 항원의 위치를 결정하는 단계를 포함하는 방법.

## 청구항 17.

제16항에 있어서, 상기 표지된 변형 항체가 방사성핵종으로 표지되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 18.



제17항에 있어서, 상기 방사성핵종이 할로젠 방사성핵종 및 테크네튬으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 19.

제16항에 있어서, 검출 단계가 면역 섬광 조영술을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 20.

제19항에 있어서, 상기 면역 섬광 조영술이 감마 카메라의 사용을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 21.

제16항에 있어서, 상기 표지된 변형 항체가 유리 아미노기에서 화학적으로 변형되는 본래의 비변형 항체를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 22.

제21항에 있어서, 본래의 비변형 항체가 비오틴과 화학적으로 접합되는 것인 방법.

#### 청구항 23.

제16항에 있어서, 화학 시약(chemical reagent)이 메틸 킬레이트, 기타 다른 킬레이트 및 염료로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 24.

제23항에 있어서, 화학 시약이  $N_2S_2$ ,  $N_2S_4$ , EDTA, DPTA, TETA 및 FITC로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 25.

인간을 제외한 포유 동물의 질병 상태를 치료하는 방법으로서,

상기 인간을 제외한 포유 동물 내의 병든 조직(diseased tissue)에 특이적인 본래의 비변형 항체로서 그 항체상에 복수의 유리 아미노기가 배치된 본래의 비변형 항체를 수득하는 단계;

화학 시약과의 접합에 의해 하나 이상의 유리 아미노기를 변형시킴으로써 본래의 비변형 항체에 비하여 감소된 등전점을 갖는 변형 항체를 생성하는 단계로서, 상기 화학 시약은 헤테로 이작용성 시약이 아닌 것을 조건으로 하는 단계;

화학 시약에 의한 변형 부위가 아닌 다른 부위로서 변형 항체 상에 배치된 부작 부위에 생물학적 활성 분자를 부착시키는 단계; 및

상기 인간을 제외한 포유 동물에 상기 항체를 투여함으로써 질병 상태를 치료하는 단계를 포함하는 방법.

## 청구항 26.

제25항에 있어서, 상기 화학 시약이 비오틴인 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 27.

제25항에 있어서, 상기 화학 시약이 메틸 킬레이트, 기타 다른 킬레이트 및 염료로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

## 청구항 28.

제27항에 있어서, 화학 시약이  $N_2S_2$ ,  $N_2S_4$ , EDTA, DPTA, TETA 및 FITC로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

## 청구항 29.

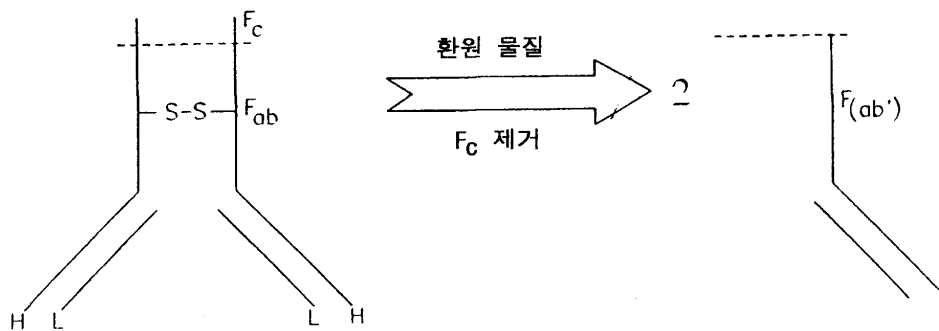
제28항에 있어서, 생물학적 활성 분자가 식물 독소, 약물 및 킬레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

## 청구항 30.

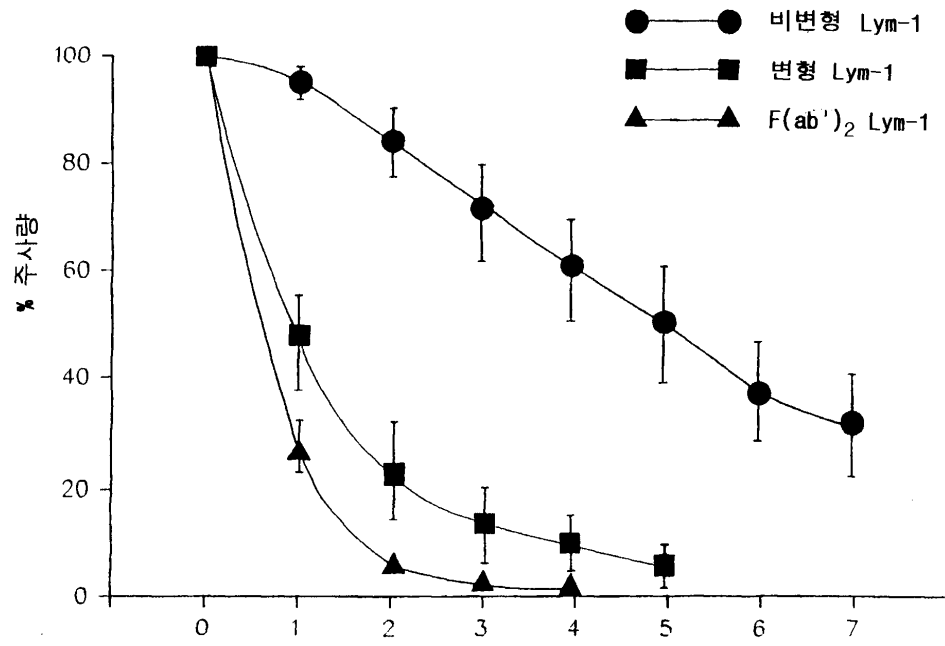
제29항에 있어서, 상기 약물이 메토틱렉세이트, 5-플루오로-우라실, cis-플라티늄 및 아드리아마이신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

도면

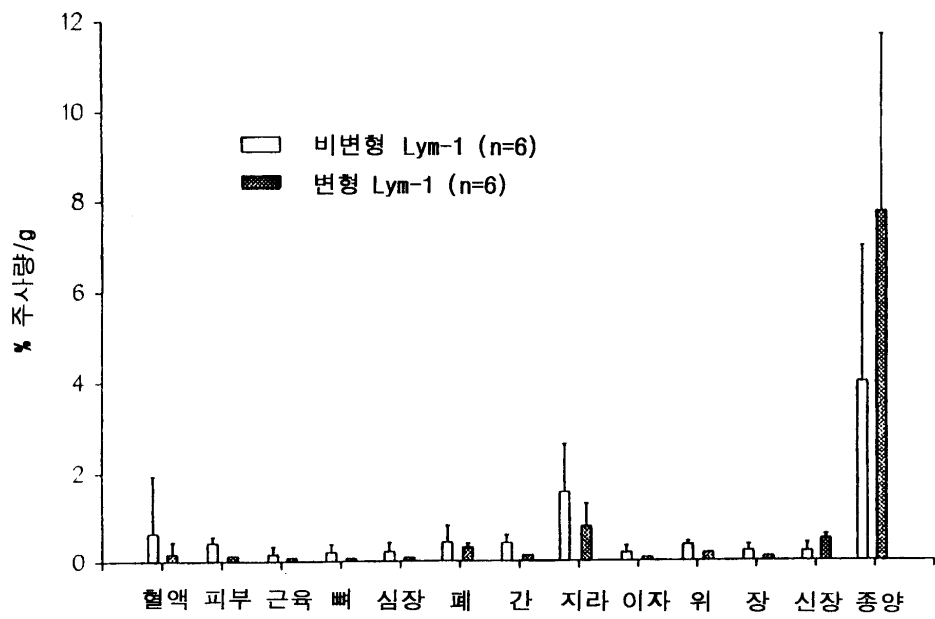
도면1



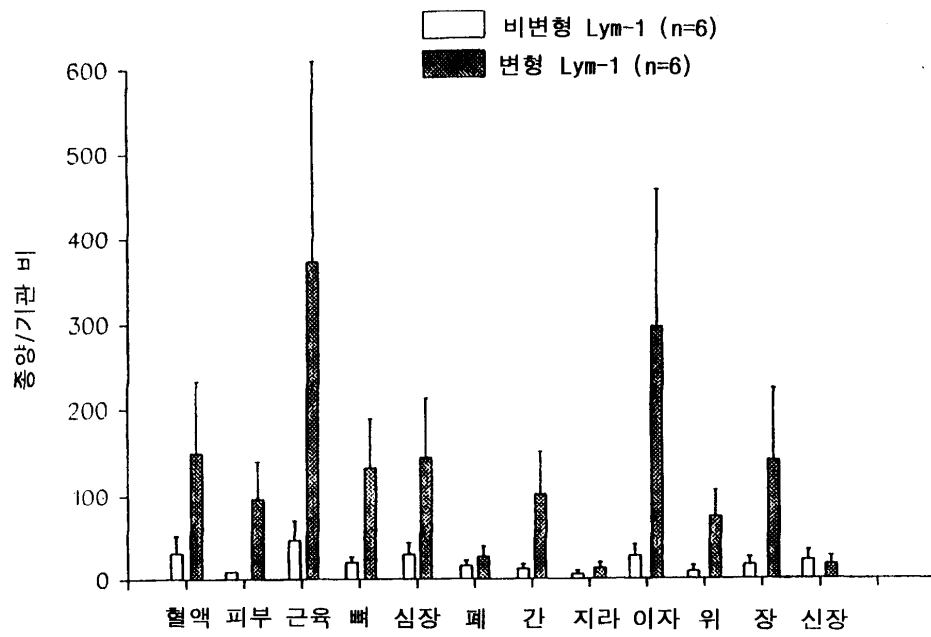
도면2



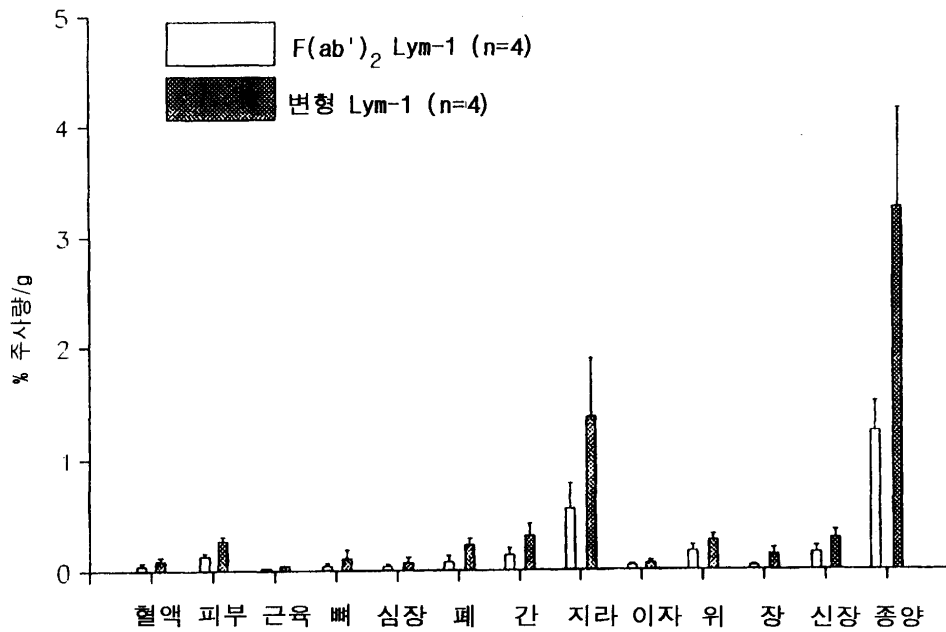
도면3



도면4



도면5



도면6



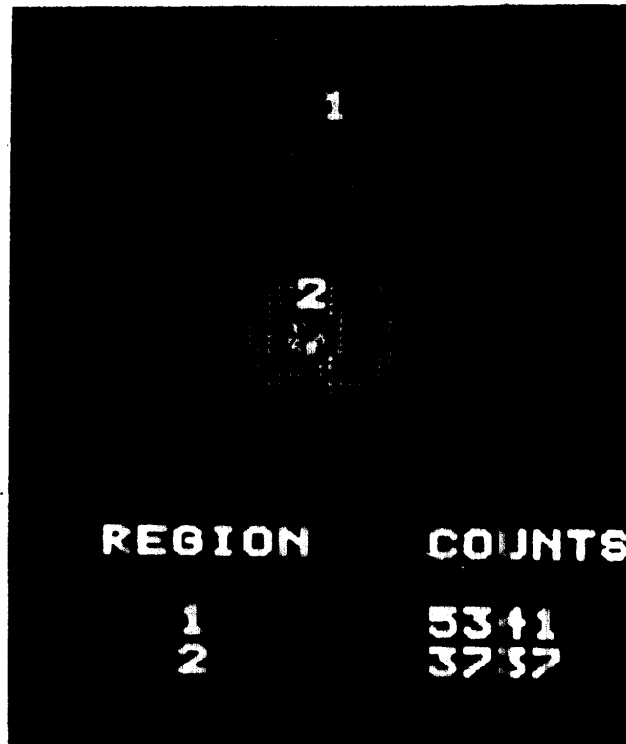
부위 1, 전체 마우스; 부위 2, LS174T 종양

도면7



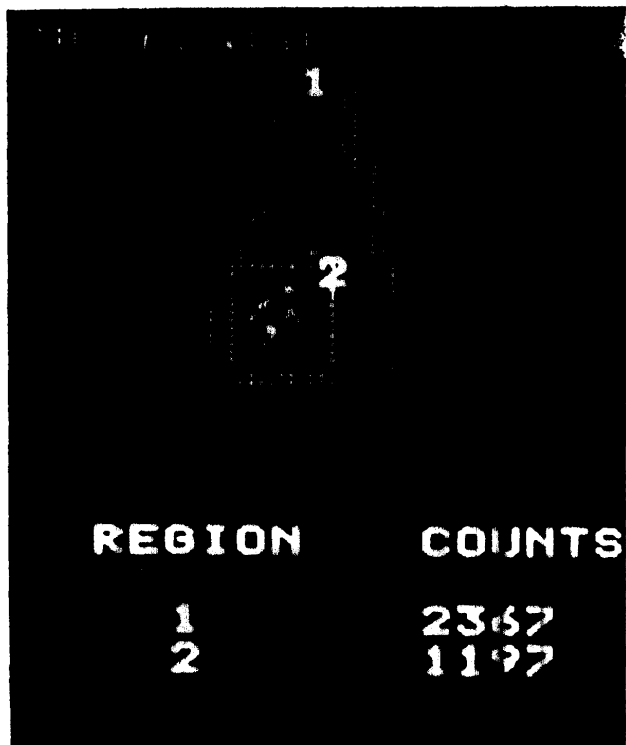
부위 1: 전체 마우스; 부위 2: Raji 종양

도면8



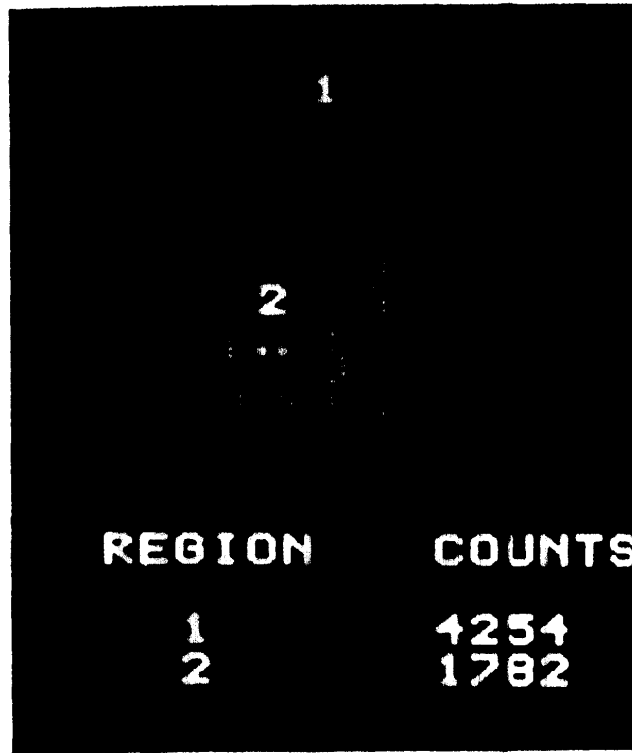
부위 1: 전체 마우스; 부위 2: Raji 종양

도면9



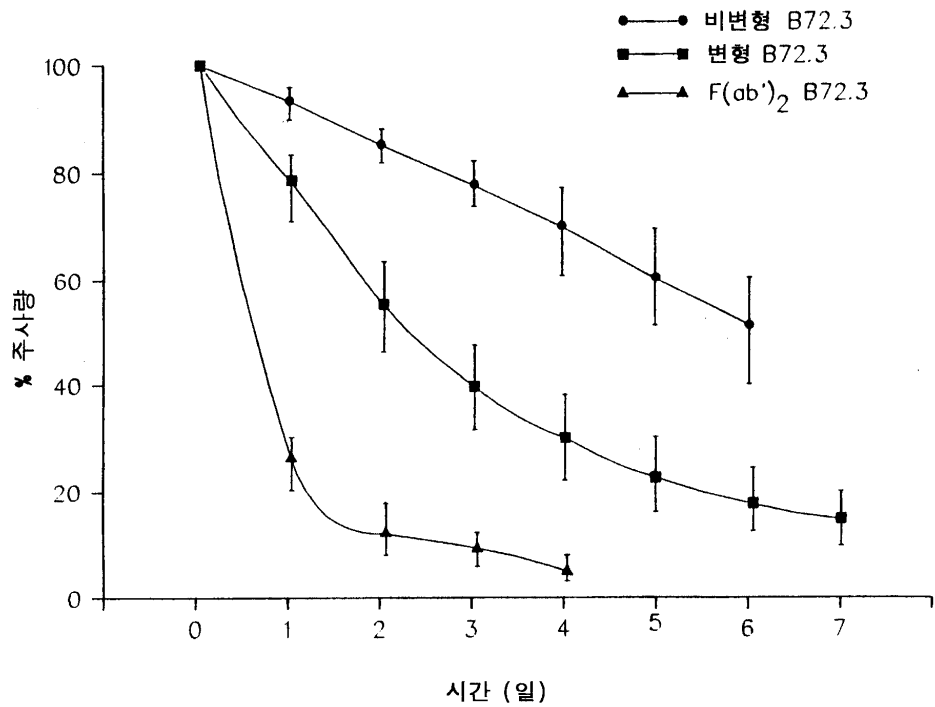
부위 1: 전체 마우스; 부위 2: Raji 종양

도면10

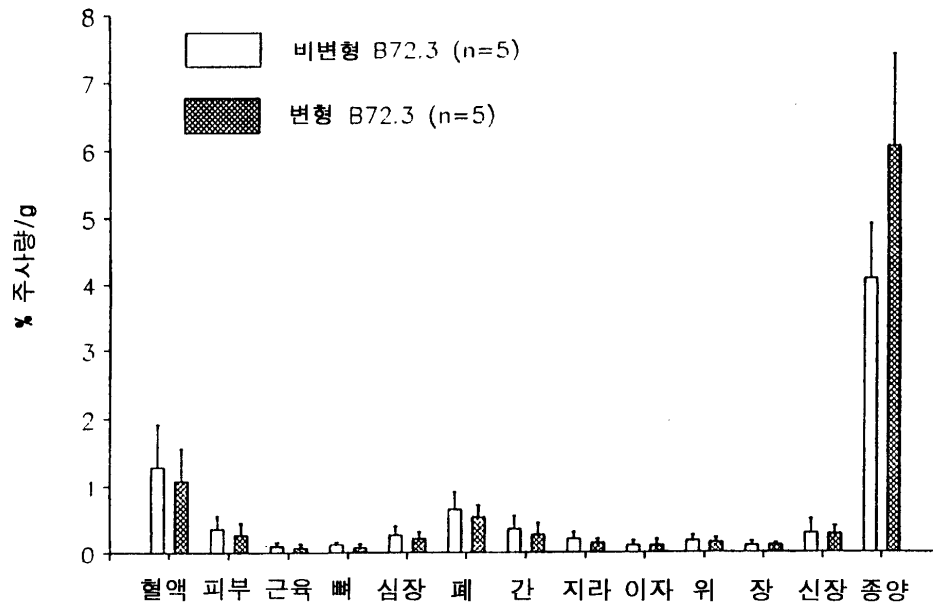


부위 1: 전체 마우스; 부위 2: Raji 종양

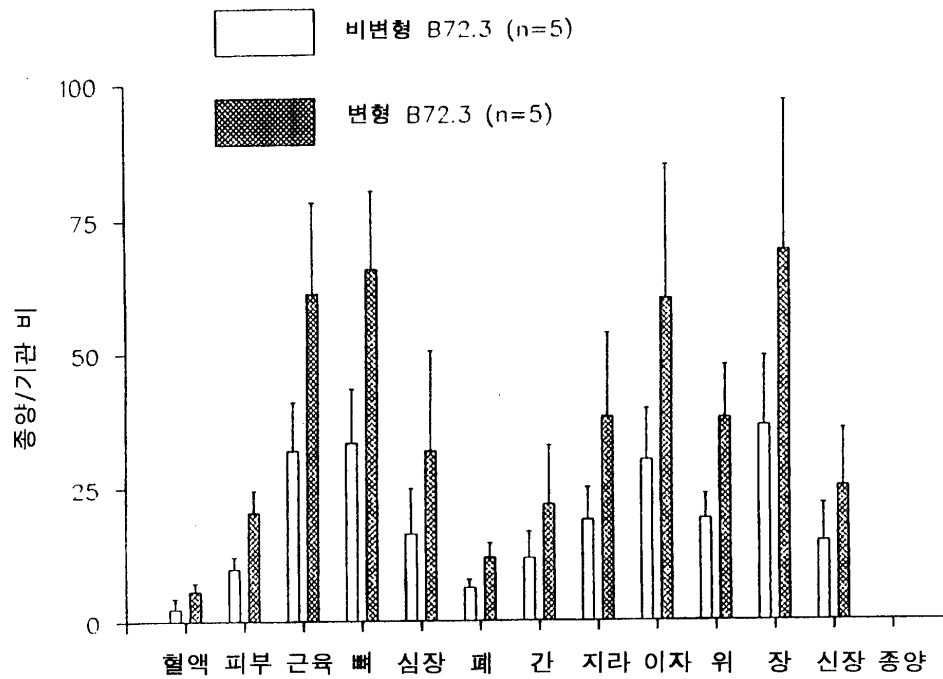
도면11



도면12

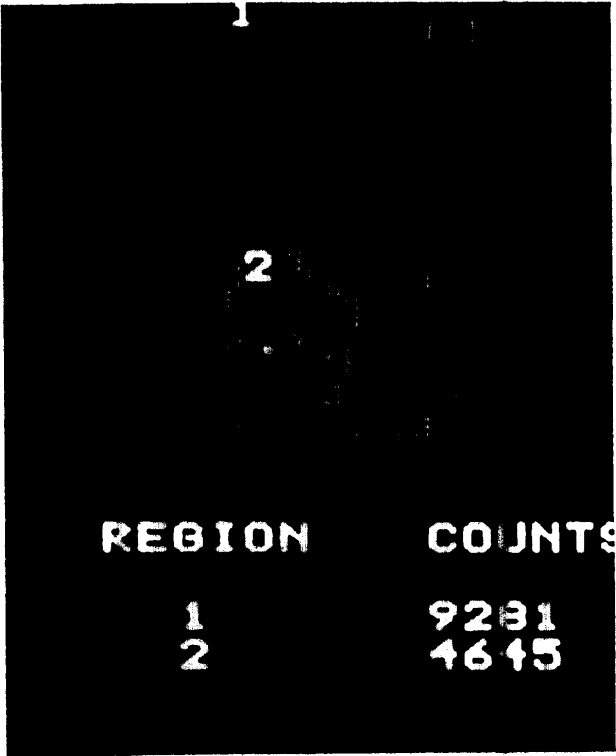


도면13



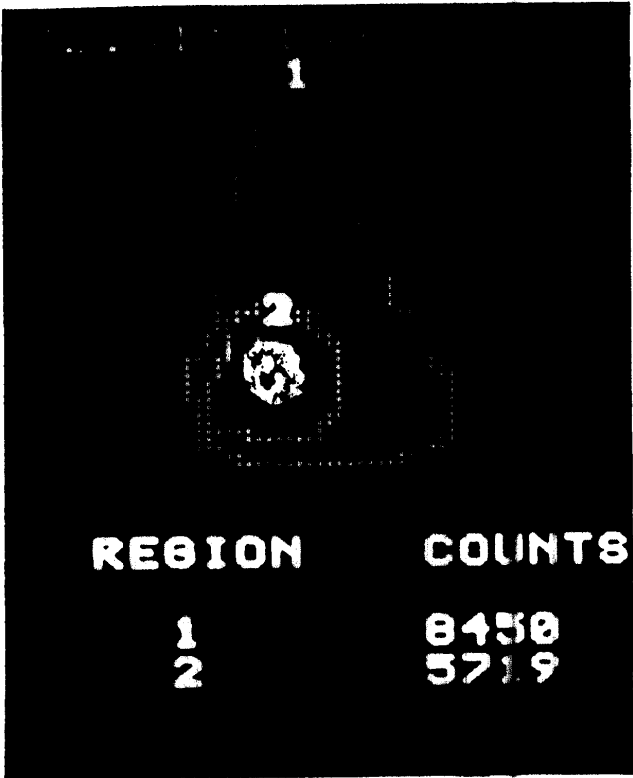


도면14



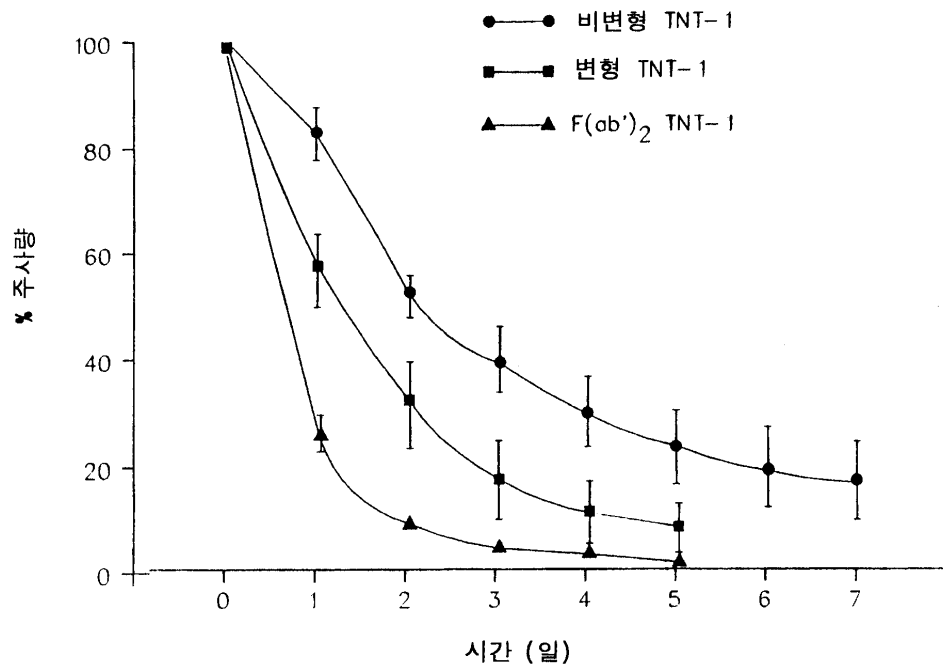
부위 1, 전체 마우스; 부위 2, LS174T 종양

도면15

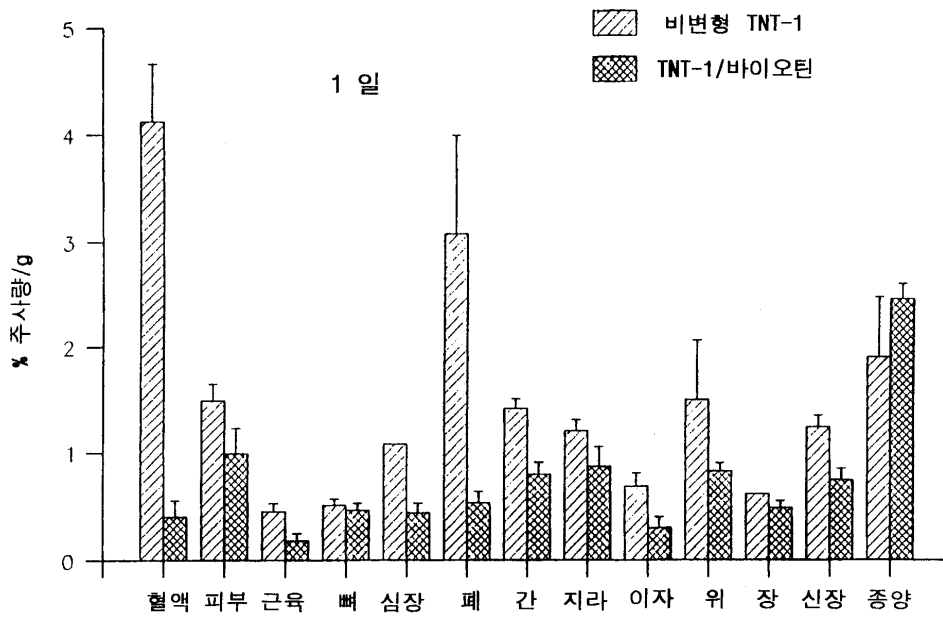


부위 1, 전체 마우스; 부위 2, LS174T 종양

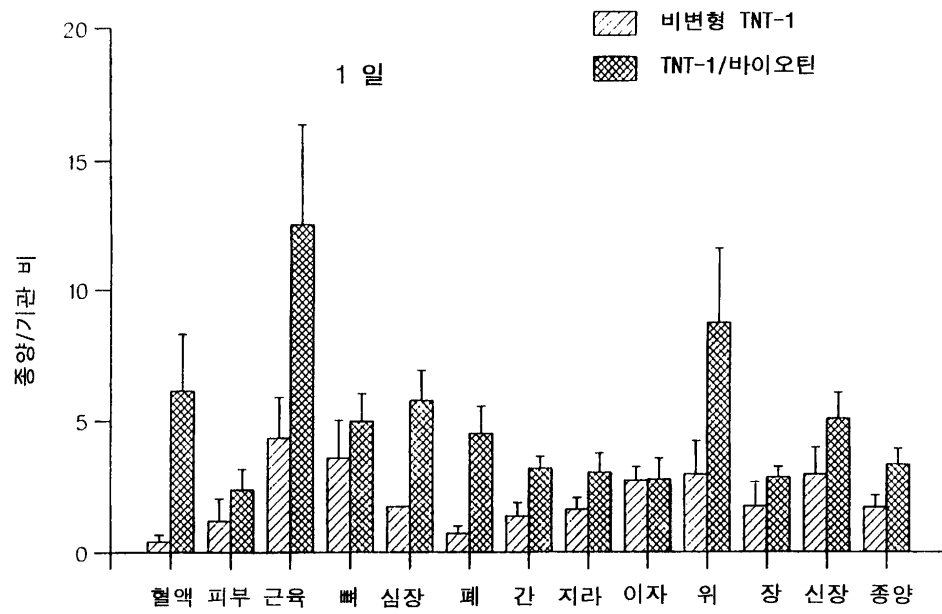
도면16



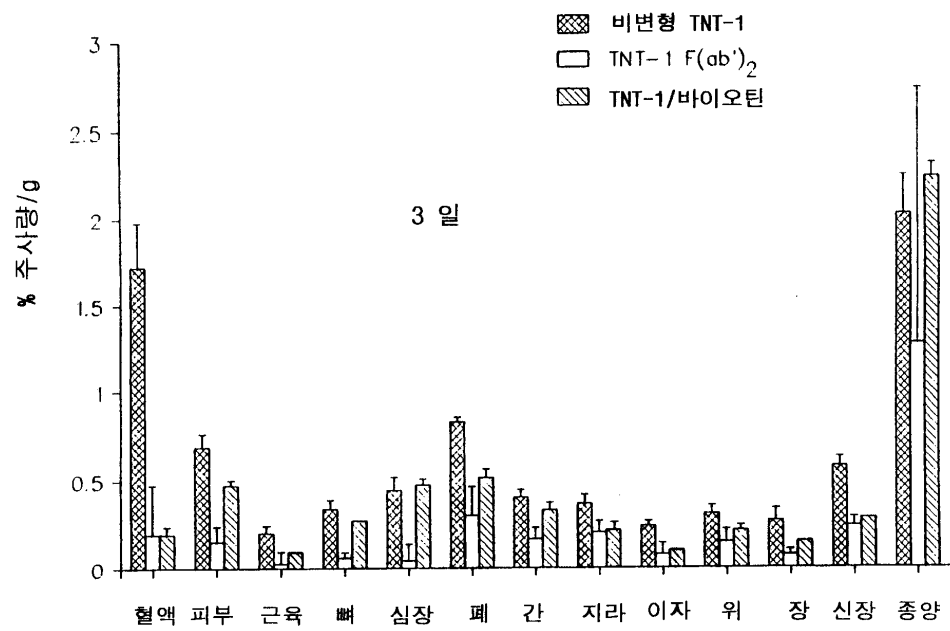
도면17a



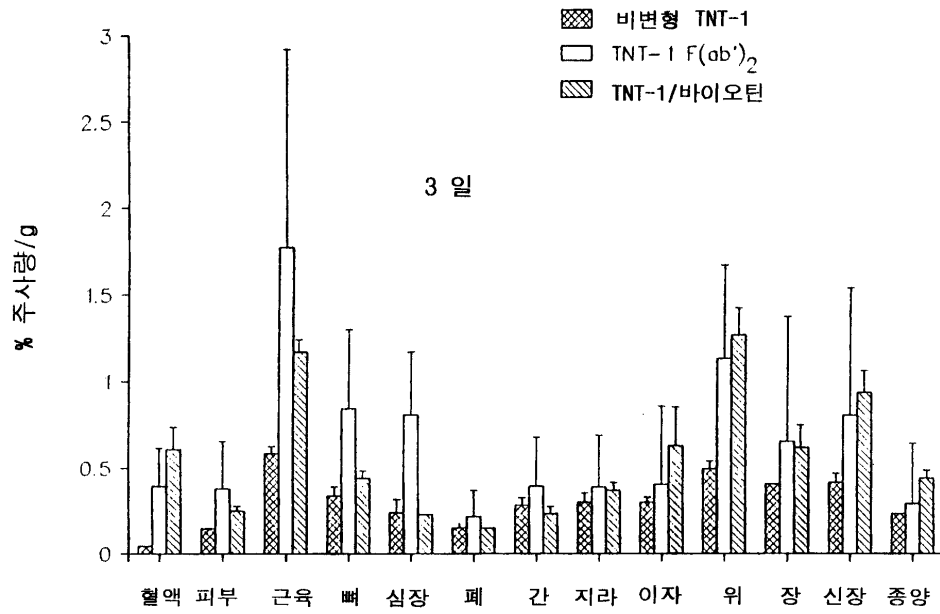
도면17b



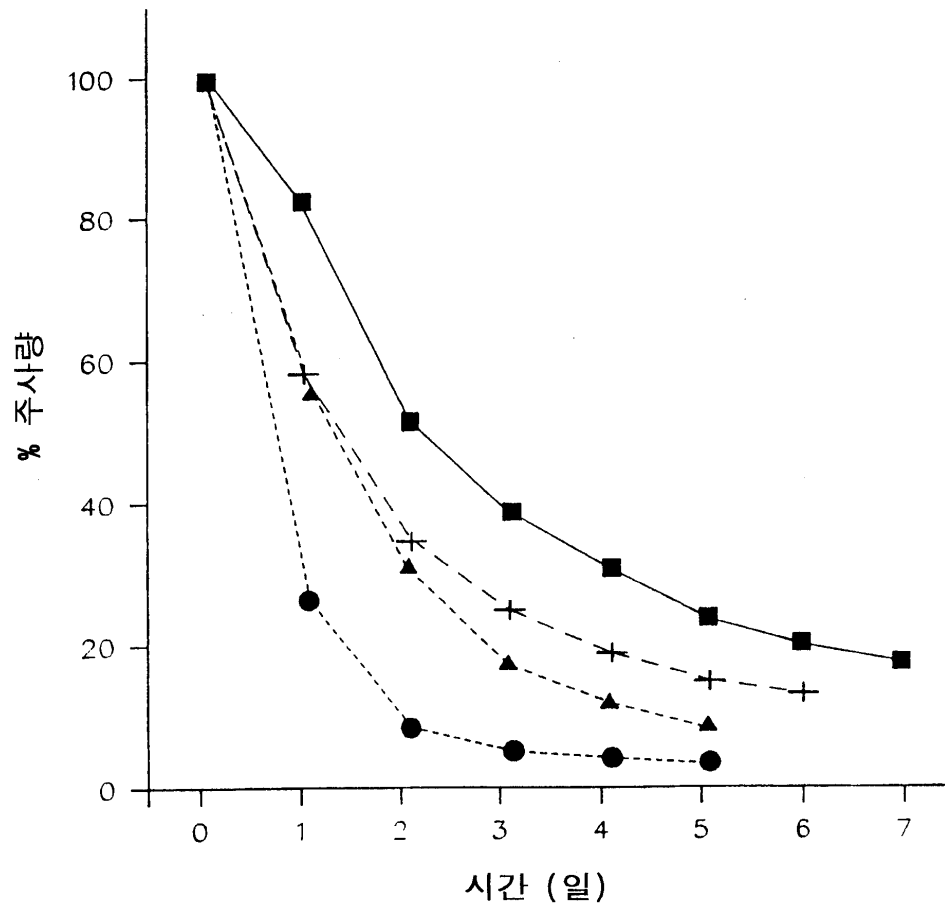
도면17c



도면17d



도면18



도면19

