

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

| | | | |
|----------------------------|--|-------------|---------------|
| (51) Int. Cl. ⁶ | (45) 공고일자 | 2000년02월01일 | |
| A61K 51/00 | (11) 등록번호 | 10-0238558 | |
| A61K 49/02 | (24) 등록일자 | 1999년10월14일 | |
| (21) 출원번호 | 10-1993-0702561 | (65) 공개번호 | 특1994-0700108 |
| (22) 출원일자 | 1993년08월26일 | (43) 공개일자 | 1994년02월21일 |
| 번역문제출일자 | 1993년08월26일 | | |
| (86) 국제출원번호 | PCT/US 92/001577 | (87) 국제공개번호 | W0 92/15333 |
| (86) 국제출원일자 | 1992년02월27일 | (87) 국제공개일자 | 1992년09월17일 |
| (81) 지정국 | EP 유럽특허 : 핀란드 국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국 | | |
| (30) 우선권주장 | 661,793 1991년02월27일 미국(US) | | |
| (73) 특허권자 | 악조 엔.브이. 에프.쥐.엠.헤르만스 네덜란드 엔엘-6824 비엠 아르눔 벨페르베그 76 | | |
| (72) 발명자 | 수브라마니안 라마스와미 미합중국 메릴랜드 21701 프레드릭 캣옥틴 애비뉴 352 | | |
| (74) 대리인 | 나영환 | | |

심사관 : 류종훈**(54) 단백질의 테크네튬-99M 표지화****요약**

본 발명은 환원성 금속 시약을 사용하여 테크네튬-99m를 단백질에 결합시키는 방법에 관한 것으로서, 이로써 친화도가 높은 결합부위에 결합시킬 수 있고 높은 비활성도를 유지시킬 수 있다. 이 시약은 제시된 실험 조건하에서, 단백질내의 디설파이드 결합을 테크네튬이 결합하기에 적합한 살프히드릴기로 환원시키고, 퍼테크네이트를 환원시켜 Tc(VII)를 Tc(III) 또는 Tc(V)로 환원시키는 이중 작용을 한다. 단백질상의 디설파이드의 환원은 먼저 과량의 환원성 금속 시약으로 실시되고, 퍼테크네이트 시약이 단백질 환원 반응의 마지막에 첨가되어 테크네튬을 지속적으로 환원시킨다. 그 다음 퀄레이트제 스캐빈저는 나쁘게 결합되거나 비결합된 테크네튬을 제거하기 위해 첨가한다.

대표도

| 시간 | 결합량 % |
|-------|-------|
| 0 시간 | 95% |
| 1 시간 | 94% |
| 3 시간 | 94% |
| 24 시간 | 95% |

37°C의 과량의 DTPA (I_G :DTPA - 1:1000)를 함유한

식염수내에서 안정성을 실험했다.

명세서

[발명의 명칭]

단백질의 테크네튬-99M 표지화

[발명의 설명]

본 발명은 환원 금속 시약을 사용하여 항체에 테크네튬(technetium)-99m를 결합시키는 방법에 관한 것이다. 이 시약은 특정 조건하의 표지화 반응(labeling reaction)에서 이중 역할을 한다. 본 발명의 방법은

종래 방법이 갖고 있던 2가지 문제점, 즉 낮은 비활성(specific activity) 및 친화도가 낮은 결합 부위에의 $Tc-99m$ 의 결합을 개선한 것이다.

[본 발명의 배경]

항체를 테크네튬-99m로 표지화하는 종래 기술 방법은 항체 위에 설프히드릴기가 생성되도록 환원제로서 염화 주석을 사용했다. 동시에 항체를 테크네튬 및 칠레이트제(chelator)(일반적으로 DTPA)와 접촉시켜 그 항체에 테크네튬을 결합시키면서, 비결합된 테크네튬은 그 반응 매체내에 존재하는 DTPA로 제거했다.

페이크(Paik) 등은 테크네튬-99m 표지화를 과량의 DTPA 존재하에서 실시함으로써(MoAb: DTPA = 1:10), 친화도가 높은 부위에 테크네튬-99m를 선택적으로 결합시킬 수 있다고 보고했다. 염화주석은 그 단백질에 대해 10배의 과량으로 첨가되었다. 일반적인 반응 조건(Paik등)은 다음과 같다:

$$[MoAb] = 10\mu\text{M}$$

$$[SnCl_2] = 100\mu\text{M}$$

$$[DTPA] = 100\mu\text{M}$$

그러나, 친화도가 높은 부위에 대한 선택적인 결합은 DTPA와 항체가 환원된 테크네튬 이온에 대해 경쟁하는 실험 조건하에서만 얻어졌다. 페이크등은 친화도가 낮은 부위에 테크네튬-99m가 결합되지 않도록 하려면 약 10배 과량의 DTPA를 필요하다고 보고하였다. 그러나, 과량의 DTPA의 존재는 비활성(~mCi/mg)을 감소시켰다. IgG_3 인 항체 88BV59로 상기 절차를 수행한 결과, 수율은 단지 0.01~0.5mCi/mg이었다.

[본 발명의 요약]

본 발명은 주석 및 아연과 같은 환원 금속 시약을 사용하여 모노클로날 항체와 같은 단백질에 테크네튬-99m를 결합시키는 방법에 관한 것이며, 이것에 따르면 ^{99m}Tc 는 친화도가 높은 결합 부위에 결합되고 비활성도 높게 유지된다. 상기 환원 금속 시약은 주어진 실험 조건하에서 단백질 내의 디설파이드(disulfide) 결합을 테크네튬에 결합하기에 적합한 설프히드릴기로 환원시키고, 퍼테크네테이트(per technetate)를 $Tc(VII)$ 로부터 $Tc(III)$ 또는 $Tc(V)$ 로 환원시키는 이중 역할을 한다. 본 발명의 바람직한 방법에 의하면, 먼저 단백질 상의 디설파이드기가 과량의 주석 또는 아연 시약으로 환원되고, 그 단백질의 환원 반응 말기에 퍼테크네테이트 시약이 첨가되어 테크네튬이 지속적으로 환원되도록 한다. 그 다음 칠레이트제 스캐빈저(scavenger)를 첨가하여 나쁘게 결합되거나 비결합된 ^{99m}Tc 를 제거한다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 37°C에서 IgG : DTPA의 비가 1:1000인 과량의 DTPA를 함유한 식염수 중의 IgG_3 항체 88BV59에 결합된 ^{99m}Tc 의 안정성 연구를 나타낸 것이다.

제2도는 본 발명의 방법에 따라 제조한 후 반응매체 중의 ^{99m}Tc -88BV59의 HPLC 방사능 크로마토그래프를 나타낸 것이다. 제2(a)도는 주피크로서 테크네튬 항체 결합체의 피크를 나타낸다. 작은 피크는 DTPA에 결합된 테크네튬이다. 제2(b)도는 모든 측정가능한 칠레이트제가 결합된 테크네튬이 제거된 정제된 테크네튬 항체 결합체를 나타낸 것이다.

제3도는 본 발명에 따라 제조된 항체 테크네튬 결합체의 면역 반응성을 항체만의 면역 반응성과 비교하여 나타낸 것이다. 면역 반응성은 특이 항원 피복된 웰(well)상에서 간접 ELISA 법으로 측정한다. 방사능 표지된 항체(Tc -항체 결합체)의 반응성은 항체(88BV59)가 특이성을 갖는 동원(同源)의 항원(cognate antigen)에 결합하는 능력에 대해 본래(비결합된) 항체의 반응성과 비교하여 측정하였다.

제4(a)도는 6내지 8주된 무흉선증의 Balb/c 마우스 내에 존재하는 종양 이종 이식편이 항체 테크네튬 결합체를 보유하고 있는 것을 나타낸 것이다. 이종 이식편은 88BV59에 의해 인식될 수 있는 항원을 함유하는 효소적으로 해리된 사람 종양 세포를 사용함으로써 증식되었다. 생체 분포 연구를 위해 마우스들($n=6$)의 정맥내로 표지된 항체 $10\mu\text{g}(1-2\mu\text{Ci}/\mu\text{g})$ 을 주입했다. 본래 항체를 가진 결합체와 $F(ab')_2$ 를 가진 결합체를 비교했다.

제4(b)도는 사람 결장 종양의 이종이식편을 가진 마우스내에서 88BV59 테크네튬 결합체가 혈청내에서 유지되는 것을 나타낸 것이다.

제4(c)도는 마우스내의 종양에서 항체 및 $F(ab')_2$ 테크네튬 결합체가 보유되는 것을 나타낸 것이다.

제4(d)도는 마우스내의 신장에서 $F(ab')_2$ 및 본래 항체 테크네튬 결합체가 보유되는 것을 나타낸 것이다.

제4(e)도는 간에서 $F(ab')_2$ 및 본래 항체 테크네튬 결합체가 보유되는 것을 나타낸 것이다.

[구체예의 상세한 설명]

본 발명은 주석 및 아연과 같은 환원성 금속을 함유한 시약을 사용하여 단백질에 테크네튬-99m(^{99m}Tc)를 결합시키는 프로토콜을 기술한다. 이 시약은 주어진 실험 조건하에서 이중 역할을 한다.

상기 단백질에 대한 결합은 그 단백질내의 디설파이드가 환원됨으로써 수득되는 설프히드릴기(SH)를 통하여 이루어진다. 따라서, 결합을 위해서는 단백질내에 시스테인이 존재하여야만 한다.

이 시약은 공유결합 또는 배위 결합을 통해 리간드에 결합되는 공지된 환원 금속을 포함한다. 이것은 단백질 분자내에 존재하는 디설파이드 결합을 환원시켜 테크네튬에 결합하기에 적합한 설프히드릴기를 생성할 만큼 충분히 강력하지만, 금속 수산화물의 콜로이드를 형성할 정도로는 강력하지 않다. 바람직한 금속의 예는 Sn, Zn, Rn 및 Co이다. 이것은 공유 결합 또는 배위 결합에 의해 올리고당, 다당류 및 기타 당

유도체와 같은 리간드에 결합한다.

이 시약은 또한 단백질에 결합시키기 위해 퍼테크네테이트를 환원시킨다.

Tc(VIII)는 Tc(III) 또는 Tc(V)로 환원되고 동시에 단백질 상의 설프히드릴기에 결합된다.

임의의 느슨하게 결합된 테크네튬은 DTPA, EDTA, 이미노디아세테이트, 시스테인, 디아민디티올, 또는 다른 칼레이트제와 칼레이트되며, 이 칼레이트제는 Tc가 환원되어 단백질에 결합된 후 반응 혼합물에 첨가되어 비결합되고 느슨하게 결합된 Tc를 스캐빈지함으로써 반응을 퀸칭(quenching)시킨다. 퀸칭제(quencher)에 대한 MoAb의 비율은 약 1:1 내지 1:5인 것이 바람직하고, 약 1:8을 초과하지는 않아야 한다. 그 칼레이트제는 고정화된 표면에 결합될 수 있고, 또는 겔 여과 크로마토그래피에 의해 제거될 수 있다. Tc-항체 결합체를 이용한 본 발명자들의 영상화 실험결과, Tc-DTPA는 신장 여과의 순환으로부터 빠르게 세정되기 때문에 소량의 Tc-DTPA가 존재하더라도 영상의 질에는 영향을 미치지 않는다. 따라서, 그 제조물을 투여하기전에 반드시 키클레이트제 결합된 99m Tc를 제거할 필요는 없다.

방사능 표지된 항체를 제조하는 본 방법은 독특한 것이다. 바람직한 구체예로서, 주석 또는 아연의 당산 염(saccharate) 또는 글루카르산 염(glucarate)을 이용하여 항체내에서 설프히드릴기를 만들고, 이 SH기에 결합시키기 위해 테크네튬을 환원시킨다. 또한, 이 방법은 칼레이트제를 보다 일찍 반응 혼합물내에 첨가하여 환원된 테크네튬에 대해 경쟁 반응을 유발하기 보다는 퀸칭제로서 사용한다는 점에서 독특한 것이다. 본원의 환원제는 염화 주석 용액(예, 0.02M HCl 중의 5mg/ml)에 당산(예, 20mg/ml, 탈기된 것)용액을 첨가함으로써 제조된 당산 주석(tin saccharate)이 바람직하다. 당산 주석은 또한 염화 주석을 과량의 당산으로 처리하여 침전된 당산 주석을 분리한 뒤 그 침전물을 무수 질소하에서 보관함으로써 제조될 수 있다. 또한 염화 금속과 산을 함께 결합시킨 뒤 그 반응 혼합물을 단백질에 첨가할 수도 있다(예, 염화 주석과 글루카르산을 결합시키는 경우).

완충 용액이나, 또는 환원성 완충 용액중의 항체(10mg/ml 또는 동결 건조된 분말)를 당산 주석 용액에 첨가하고 약 4° 내지 60°C에서 5 내지 60분간 항온 처리한다. 이 항온처리는 설프히드릴기의 형성을 유도한다. 항온처리 기간은 온도에 역비례한다. 반응 온도는 단백질의 안정성에 의해 제한된다. 단백질을 변성시킬 수 있는 항온 처리 온도는 사용될 수 없다. 바람직한 반응 조건은 약 20° 내지 37°C에서 약 15분 내지 60분이다. 실험 조건하에서 항체 분자당 1 내지 3개의 SH기가 생성된다. 이 표지 방법은 IgG와 같은 항체에 특히 적합한 것으로 증명되었다. 동일 반응 조건하에서, 당산염이 아닌 염화 주석만을 사용한 결과, 이후의 사용에 적합하지 않은 콜로이드 용액이 형성되었다. 따라서 환원성 금속은 본 방법에 있어서는 리간드에 결합되어 있어야만 한다.

항체가 환원된 다음 퍼테크네테이트를 첨가한다. Tc(VIII)를 Tc(III) 또는 Tc(V)로 환원시키고 항체상의 설프히드릴기와 결합시키기 위한 항온 처리는 약 20°C 내지 37°C에서 약 2분 내지 1시간 동안 수행된다. 표지화는 약 20°C 내지 37도°C에서 약 15분 내지 60분이다. 실험 조건하에서 항체 분자당 1 내지 3개의 SH 기가 생성된다. 이 표지 방법은 IgG 와 같은 항체에 특히 적합한 것으로 증명되었다. 동일 반응 조건하에서, 당산염이 아닌 염화 주석만을 사용한 결과, 이후의 사용에 접합하지 않은 콜로이드 용액이 형성되었다. 따라서 환원성 금속은 본 방법에 있어서는 리간드에 결합되어 있어야만 한다.

항체가 환원된 다음 퍼테크네테이트를 첨가한다. Tc(VII)를 Tc(III) 또는 Tc(V)로 환원시키고 항체상의 설프히드릴기와 결합시키기 위한 항온 처리는 약 20°C 내지 37°C에서 약 32분 내지 1시간 동안 수행된다. 표지화는 약 23° ~37°C DOP에서 약 30 내지 60분간 항온 처리함으로써 실시되는 것이 바람직하다. 그후, 그 반응을 퀸칭시키고 비결합된 Tc를 Tc-DTPA로 전환시켜 스캐빈지하기 DLN해 칼레이트제(예, DTPA)를 첨가한다. 이로써 수득되는 약학적 제조물은 투여전 정제하거나, 또는 과량의 Tc-DTPA를 제거함이 없이 암 환자들에게 직접 투여한다. 일반적으로 90%이상의 Tc가 항체에 결합되어야만 한다. 그렇지 않다면 정제가 필요하다. 투여후 1-2시간내에 Tc-DTPA 형태의 원 제조물중의 비-항체 결합된 Tc는 신장에 의해 제거될 수 있다. Tc-DTPA를 함유하는 방사능 표지된 항체제조물을 사용한 환자들의 연구에서 종양 편재화가 우수함이 밝혀졌다. 그 조성물이 투여전 정제되어야만 한다면, 과량의 Tc-DTPA는 겔 여과 컬럼 크로마토그래피로 제거되며, 순수한 방사능 표지된 항체는 잔존한다.

본 발명에 따라 제조된 Tc 표지된 항체는 매우 안정하다. 그 제조물을 사용하여 암 환자들로부터 수득한 결과는 투여 후 4시간이 지나도 테크네튬-99m는 항체에 단단히 결합되어 있다는 것을 명백히 나타냈다. 또한 이 경우에 방사능 표지된 항체의 우수한 편재화가 관찰되었고, 이로 인해 우수한 방사능 면역신티그래프를 수득할 수 있었다. 느슨하게 결합된 Tc가 만일 있다면, 사람 혈청 알부민에 결합될 것이다. Tc-99m 표지된 99BV59로 처리된 환자로부터 수득한 혈청의 HPLC 분석은 투여후 4시간이 지나도 사람 혈청 알부민으로 전이되지 않는다는 것을 보여주었다.

본 발명의 또다른 장점은 $F(ab')$ ₂와 같은 비교적 어려운 시스템을 표지화할 수 있다는 것이다. $F(ab')$ ₂의 테크네튬으로의 환원적 표지화는 빈번히 99m Tc 표지된 $F(ab)$ 를 형성시킨다. 사실 많은 연구자들은 $F(ab')$ ₂로부터 99m Tc 표지된 Fab 단편을 수득하기 위해 환원적인 방법을 사용한다. 본 발명에서는 적절한 농도와 반응조건을 사용함으로써, 특히 실온(20° ~25°C)에서 반응시킴으로써, 변질됨이 없이 $F(ab')$ ₂내에 테크네튬을 서서히 도입시킬 수 있다.

본 발명자들은 IgG₃인 88BV59의 $F(ab')$ ₂ 단편을 본 방법을 사용하여 방사능 표지시켰고 약 10mg/10mCi의 방사능면역 결합체를 암환자에게 투여했다. 평면 및 SPECT 상은 병변내에 방사능표지된 항체의 편재화를 나타냈다. 또한 환자의 혈청을 HPLC 분석한 결과 99m Tc는 항체에 단단하게 결합되어 있었다. 방사능 표지된 항체의 면역반응성은 본 방법에 의해 영향을 받지 않았다.

[실시예]

본 발명자들은 주석염 용액(특히 글루카르산 주석) 30 내지 50를 당량으로 항체 농축 용액(10~50μM 용액)을 상승된 온도(4° ~60°C)에서 단시간 처리함으로써 다수의 -SH기(분자당 2~3개, Tc-결합에 적합한 엘

만스(Elmans) 시약을 사용하여 DTNB 시험으로 측정)를 생성시킬 수 있다는 것을 발견했다. 이 방법은 -SH가 풍부한 단백질에 특히 적합하다. 소듐 퍼테크네이트를 그 반응의 마지막에 첨가하였다. 불활성 대기(진공 또는 질소)하에서 추가 20~30분 동안 반응이 지속되도록 하였다. DTPA, EDTA, 시스테인 또는 디아미니디티올 칼레이트제와 같은 칼레이트제를 포함하는 스캐빈지 용액을 반응의 마지막에 첨가하고 약 5내지 10분동안 실온에서 항온처리하였다. 이로 인해 MoAb에 결합되지 않은 나머지 TcO₄는 Tc-DTPA로 전환되었다.

실험조건은 다음과 같다:

글루카르산 주석: 1~2mm

탈기된 바이알내에서 15~30분간 37°C에서 반응(다른 조건은 실온에서 60분,

또는 45°C에서 3~6분임).

TcO₄(50~100mCi)를 첨가하고 37°C에서 15분간 반응시켰다(또는

23°~25°C에서 30분간).

그 다음 DTPA를 첨가하였다(1~100μm 용액). DTPA:MoAb의 비율은 0.1:1 내지 5:10이었다.

10~15mCi/단백질 μg의 반응 수율이 용이하게 수득되었다.

방사능 표지화 수율이 90% 이하이면, 방사능 표지된 항체는 결 여과 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 일반적으로 수율은 항상 >90%(88BV59인 경우)이었다. 정제 결과는 제2도에 기술되어 있다.

마우스내에서의 생체내 생체 분포 실험 데이터는 방사능 표지된 항체가 형성 및 종양내에서 보유되었고, 간, 뾰, 비장, 근육 및 장관과 같은 정상 조직내로의 흡수율은 낮았으며(<3% I.D./g), 항체의 특성에 따라 신장 흡수율은 낮거나 중간 정도였다.

결장 암 환자에 있어서의 초기 연구는 방사능표지된 항체가 종양 전이부에 편재되어 있다는 것을 보여주었다.

[참조 문헌]

프린츠버그, 에이. 알., 아브람스, 피. 쥐., 뷔마이어, 피. 엘. 등, Proceedings of National Academy of Services, USA, 85: 4025~4029(1988).

페이크, 씨. 에이취., 팜, 엘., 흥, 제이.제이., 수하미, 엠. 에스., 헬드, 에스. 씨., 레바, 알.씨., 스테이그만, 제이. 및 엑켈만, 더블유. 시., International Journal of Nuclear Medicine and Biology, 12: 3~8(1985). 페이크, 씨. 에이취., 엑켈만, 더블유. 씨. 및 레바, 알. 씨., Nuc. Med. Biol., 13:359~362(1986).

로데, 비. 에이., 토베스타드, 디.에이., 브레슬로우, 케이., 버키엘, 에스. 디블유., 리드, 케이. 에이., 및 오스티오르, 알. 더블유. In: 에스. 더블유. 버키엘 및 비.에이. 로데스. "Tumor Imaging", p. 111, New York, Masson Publishing, USA, 1982.

(57) 청구의 범위

청구항 1

항체 또는 F(ab')₂ 항체 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 테크네튬-99m으로 표지화시키는 방법으로서, 먼저, 반응 혼합물에서 공유 결합 또는 배위 결합에 의하여 글루카르산염에 결합된 환원성 금속과 상기 단백질을 접촉시켜서, 단백질상의 디설파이드를 환원시켜서 1내지 3개의 설프히드릴기를 생성시키는 단계; 및 그 다음, 반응 혼합물에 퍼테크네이트를 첨가하고 항온처리하여, 항체와 F(ab')₂ 항체 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질에 환원된 테크네튬-99m을 결합시켜서, 그 단백질의 테크네튬-99m으로의 표지화가 90% 이상이 되도록 하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 환원성 금속은 주석, 아연, 루테늄 및 코발트로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 글루카르산염에 결합된 환원성 금속은 반응 혼합물에서 환원성 금속의 염을 글루카르산과 반응시켜서 제조되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 반응이 90% 이상 완결된 후에, 단백질상의 설프히드릴기와 환원된 테크네튬-99m의 반응이, 반응 혼합물에 칼레이트제를 첨가하여 결합되지 않은 테크네튬-99m과 반응시킴으로써 퀸칭(queching)되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 단백질은 F(ab')₂ 항체 단편이고, 테크네튬-99m으로의 표지화 후, 단백질이 F(ab')₂ 항

체 단편의 형태로 유지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 테크네튬과 단백질의 결합이 95% 이상 완결되는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

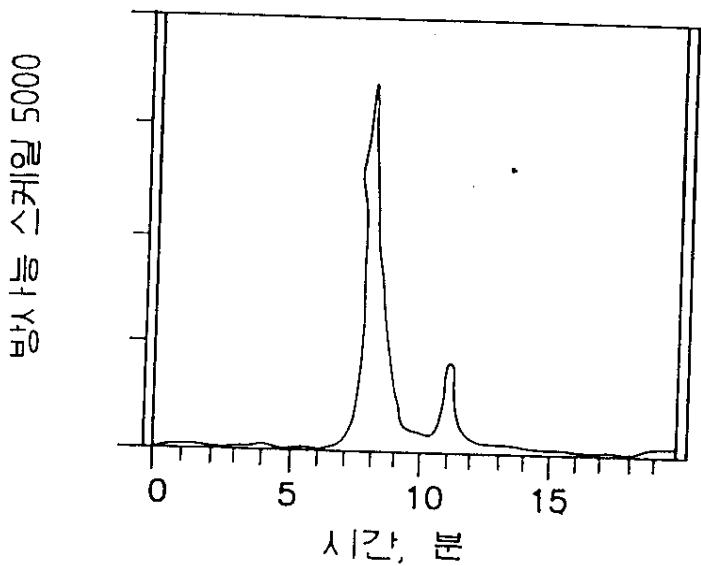
도면1

| 시간 | 결합량 % |
|-------|-------|
| 0 시간 | 95% |
| 1 시간 | 94% |
| 3 시간 | 94% |
| 24 시간 | 95% |

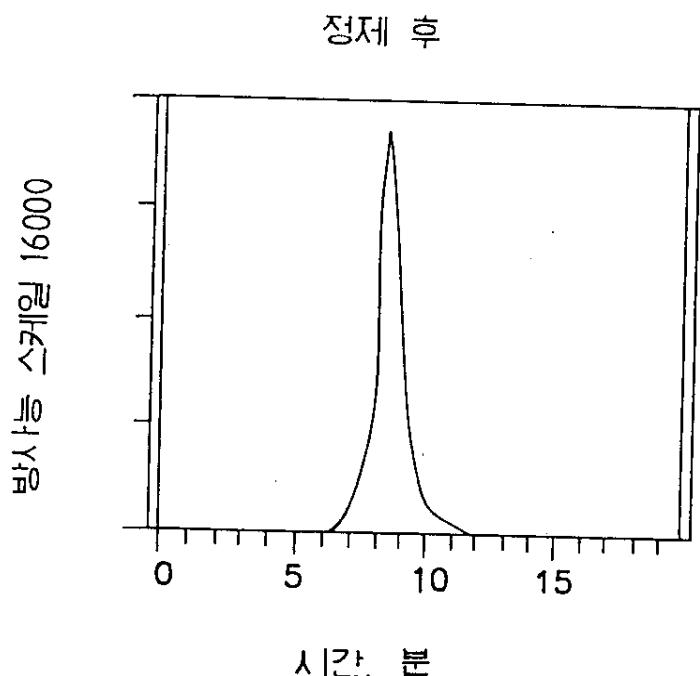
37°C의 과량의 DTPA (I_G :DTPA = 1:1000)를 함유한
식염수내에서 안정성을 실험했다.

도면2a

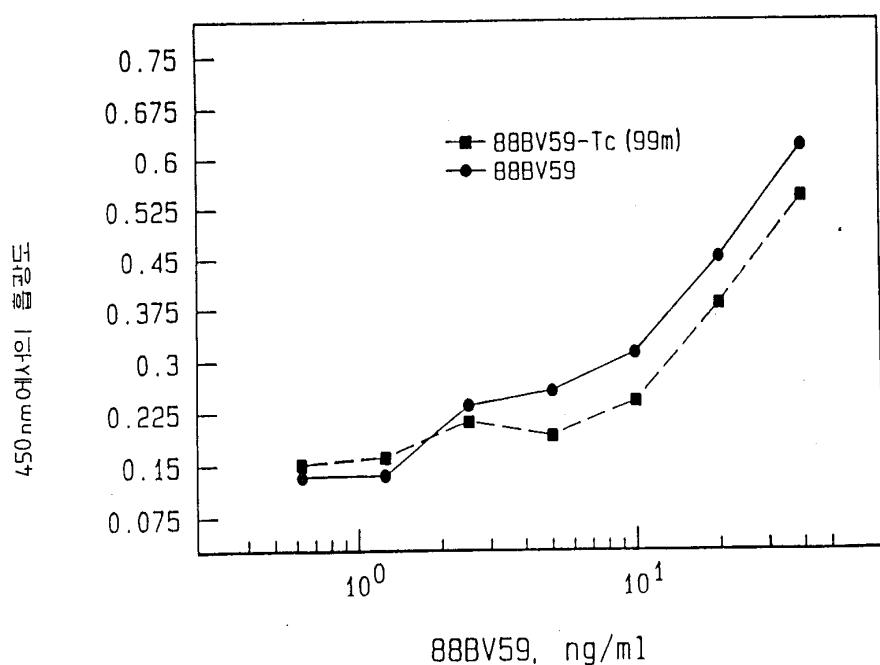
정제 전



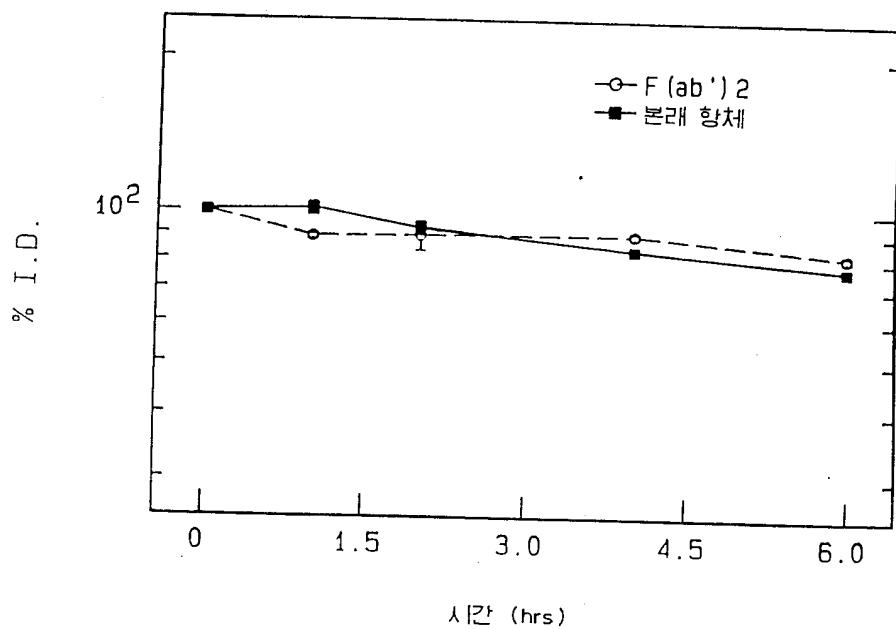
도면2b



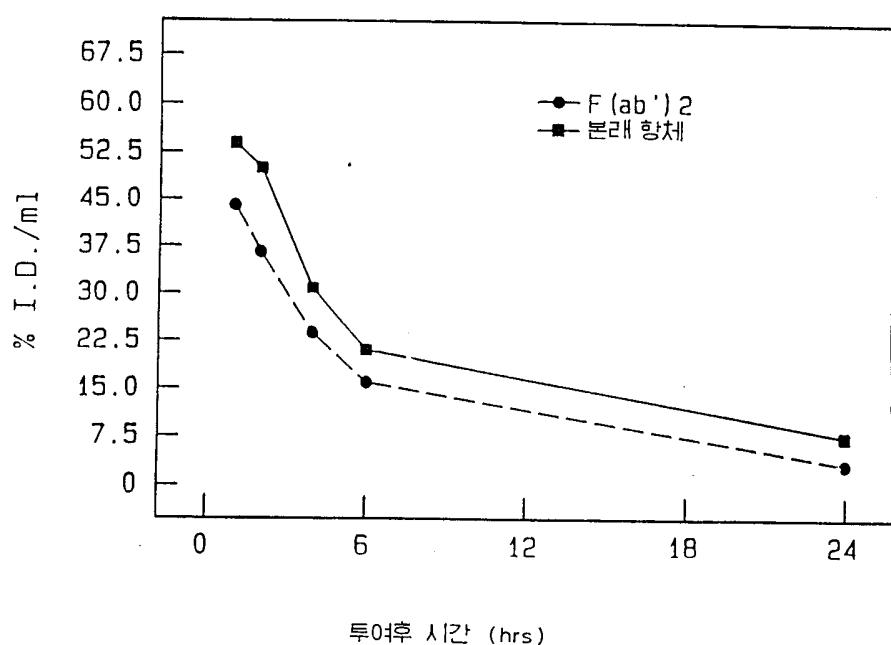
도면3



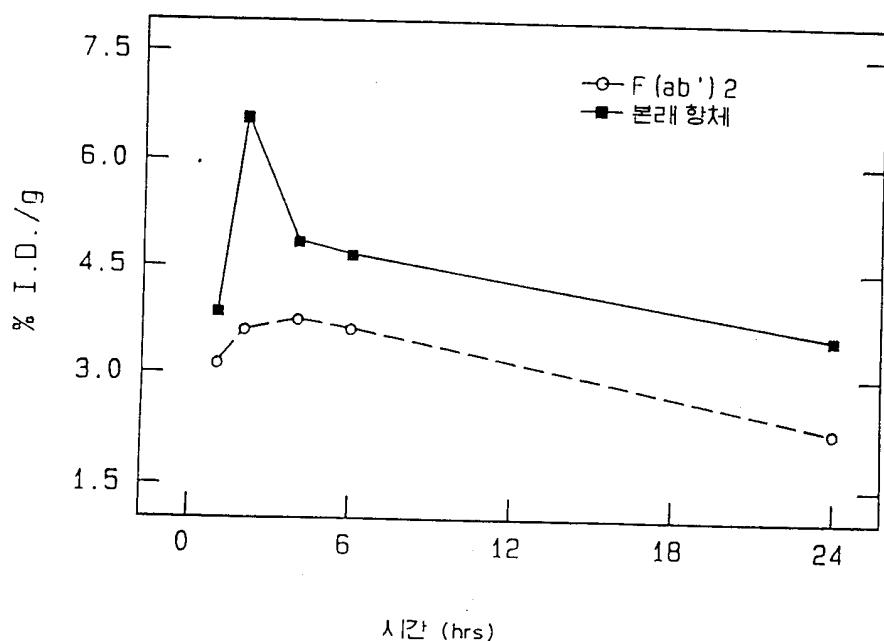
도면4a



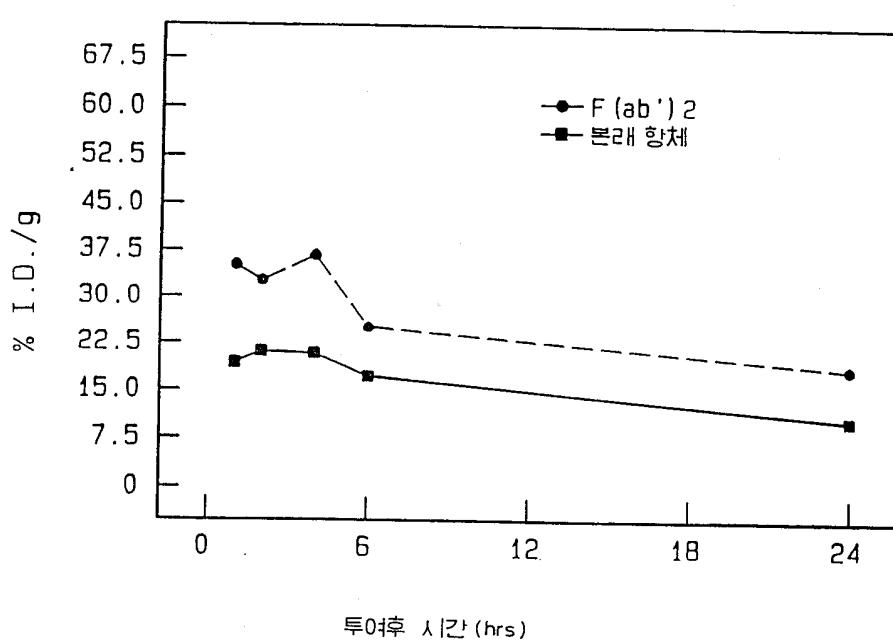
도면4b



도면4c



도면4d



도면4e

