



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년01월09일
C07H 15/04 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0666238
	(24) 등록일자	2007년01월02일

(21) 출원번호	10-2003-7000034	(65) 공개번호	10-2003-0068120
(22) 출원일자	2003년01월03일	(43) 공개일자	2003년08월19일
심사청구일자	2005년06월30일		
변역문 제출일자	2003년01월03일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2000/018219	(87) 국제공개번호	WO 2002/02127
국제출원일자	2000년07월03일	국제공개일자	2002년01월10일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 중국, 일본, 대한민국, 싱가포르,

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

(73) 특허권자 더 바이오멤브레인 인스티튜트
미국 98040 워싱턴 머서 아일랜드 에스이 78번가 3040 피오박스 1344

(72) 발명자 레버리,스티븐
미국98122워싱턴시애틀브로드웨이720바이오멤브레인인스티튜트내

하코모리,센-이치로
미국98122워싱턴시애틀브로드웨이720바이오멤브레인인스티튜트내

스트라우드,마크
미국98122워싱턴시애틀브로드웨이720바이오멤브레인인스티튜트내

(74) 대리인 조담
박미숙
정태련

심사관 : 김기연

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 종양관련항원으로서의 연장된 1형 사슬 스펡고당지질

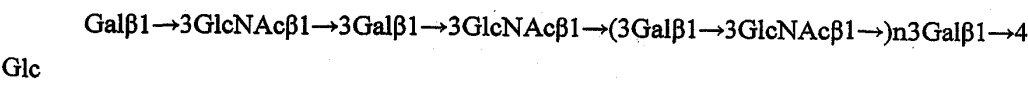
(57) 요약

항원과 종양 표지자로서 유용한 여러가지 화합물들이 제공된다. 본 발명은 암의 탐지와 관련된 방법을 개시한다. 락토-시리즈 1형 사슬의 연장형이 여러가지 암 조직에 존재하는 것으로 나타난다. 본 발명은 또한 그들로부터 만들어진 세포계와 단일클론성 항체를 제공한다. 그러한 항체는, 진단적 또는 치료적 방법을 포함하는 여러가지 용도를 가진다.

특허청구의 범위

청구항 1.

하기 식을 가지며,



[여기서, n은 0 또는 1 또는 그보다 큰 정수이고, 둘 이상의 푸코실 잔기가 있으며, Gal은 갈락토스를, GlcNAc은 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)을, Glc는 글루코스를 나타내고, 여기서 푸코스(fucose)는 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 결합을 통해 GlcNAc 잔기 또는 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 결합을 통해 터미널 Gal 잔기에 결합됨],

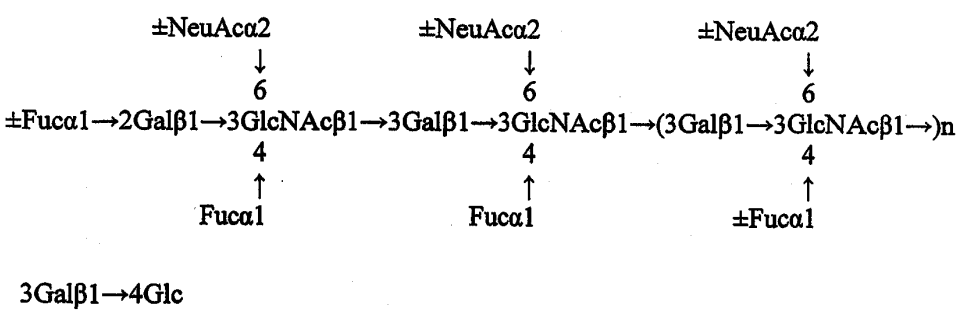
$\alpha 2 \rightarrow 3$ 결합을 통해 터미널 Gal 잔기 또는 $\alpha 2 \rightarrow 6$ 결합을 통해 하나 또는 그 이상의 서브터미널 GlcNAc 잔기에 결합된 하나 또는 그 이상의 N-아세틸뉴라민산(시알릭산) 잔기들을 더 포함하여 구성되는 유리 화합물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 둘 이상의 시알릴 잔기가 있는, 유리 화합물.

청구항 3.

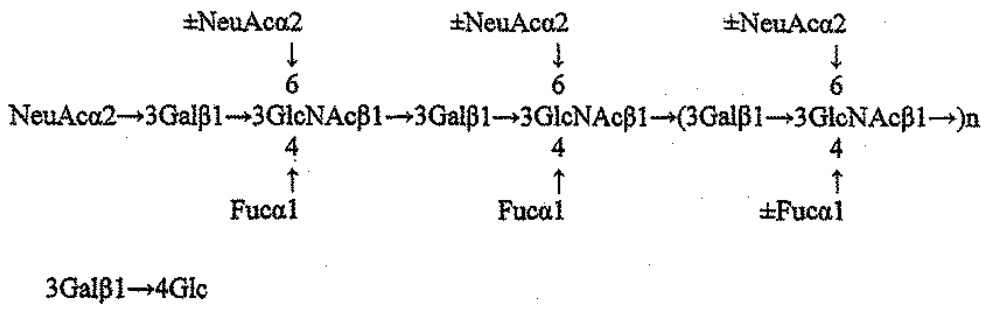
제1항에 있어서, 하기 식을 갖는, 유리 화합물.



[여기서, Fuc는 푸코스를 나타내고, NeuAc는 N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid)을 나타냄.]

청구항 4.

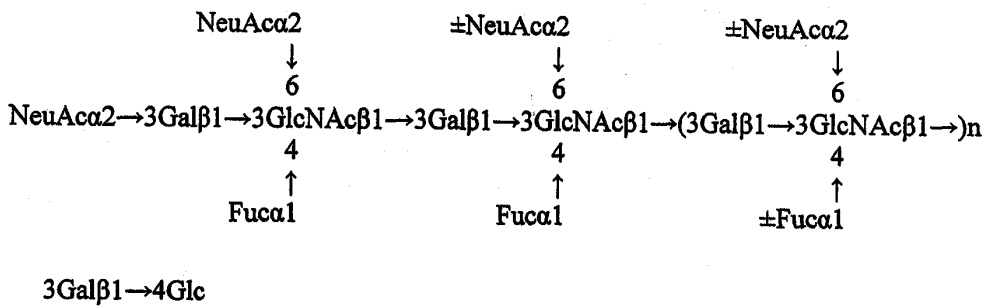
제1항에 있어서, 하기 식을 갖는, 유리 화합물.



[여기서, Fuc는 푸코스를 나타내고, NeuAc는 N-아세틸뉴라민산을 나타냄.]

청구항 5.

제1항에 있어서, 하기 식을 갖는, 유리 화합물.



[여기서, Fuc는 푸코스를 나타내고, NeuAc는 N-아세틸뉴라민산을 나타냄.]

청구항 6.

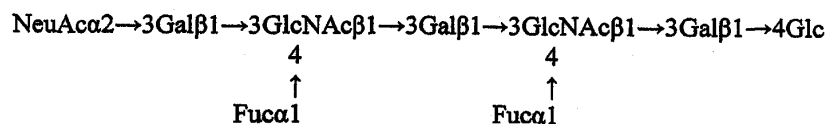
삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

하기 식을 갖는 유리 화합물.



[여기서, NeuAc는 N-아세틸뉴라민산을 나타내고, Fuc는 푸코스를 나타냄.]

명세서

기술분야

본 발명은 신규한 인간 종양관련항원(human tumor-associated antigens)에 관한 것이다. 본 발명은 더욱 상세하게는 연관된 1형 사슬 스펅고당지질(glycosphingolipids)과 그 용도, 예를 들어 항원과 종양 표지자(tumor markers)로서의 용도에 관한 것이다.

배경기술

재정적 그리고 인적 자원의 막대한 투자에도 불구하고, 암은 여전히 죽음의 주된 원인중의 하나이다. 현재의 암 요법은 악성 종양을 나타내는 환자들의 약 50% 만을 치료한다. 대부분의 인간 악성종양(malignancy)에 있어서, 전이(metastasis)가 죽음의 주된 원인이다.

전이는 원거리 부위에(at a distant site) 2차적(a secondary) 종양 콜로니(colony)를 형성하는 것이다. 대부분의 인간 악성종양에 있어서, 원거리 전이는 종종 1차(the primary) 종양의 치료시에 찾아내기에(detect) 너무 작다. 더욱이 전이 콜로니들의 광범위한 초기발생(initiation)은 일반적으로 전이성 질병의 임상적 증상이 분명하게 나타나기 전에 일어난다. 전이의 크기 및 수명의 다양성(variation), 그들의 분산된 해부학적 위치 및 그들의 불균일한 조성(heterogeneous composition)은 모두, 외과적 제거(removal)를 방해하고 전이성 콜로니로 전달될 수 있는 항암제의 농도를 제한하는 모든 요소이다. 따라서, 1차 부위로부터의 종양 세포의 전염에 앞서 악성종양을 찾아내는 것이 현재의 암 요법의 효과를 높이기 위하여 필요하다.

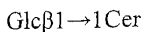
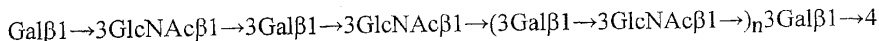
이상 당화(aberrant glycosylation)는 대부분의 암 형태의 공통 특성인 것으로 관찰되어 왔다. 인간 암의 진단을 위해 사용되는 탄수화물 항원의 대부분은, 예를 들어 Gal β 1 \rightarrow 3/4GlcNAc 를 포함하는 폴리락토사민(polylactosamine) 구조를 가진다. 폴리락토사민은 대개 그들의 폴리락토사민 단위 구조에 따라 두가지 카테고리로 분류된다. Gal β 1 \rightarrow 2GlcNAc 구조를 가지는 폴리락토사민은 1형 사슬로 불리우고, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc 구조를 가지는 것은 2형 사슬로 불리운다. 대다수의 인간 암에서 발견된 가장 일반적인 종양관련항원은, 대개 시알릴화(sialylated) 및/또는 푸코실화(fucosylated)된 락토시리즈 2형(lacto-series 2 type) 사슬 구조를 가진다. 1형 사슬 항원은 정상 세포와 조직에 많고, 또한 암과 관련되어 있다. 예를 들어, 2 \rightarrow 3 시알릴화된 Le^a 항원[N 19-9 항체에 의해 정의되는(defined) CA 19-9 항원]은 암관련 1형 사슬-항원이다. 그러나, 이 공지된 항원들의 탐지(detection)에 의한 암 진단 방법들은 고 가양성(high false positive) 및/또는 고 가음성 발생빈도(high false negative incidences)에 의해 방해되어 왔다.

암 진단에 대한 현재의 접근법에 있어서의 어려움으로 인하여, 개량된 화합물(compositions)과 방법이 필요하다. 본 발명은 이 요구를 충족시키고 더 나아가 다른 관련된 장점을 제공한다.

발명의 상세한 설명

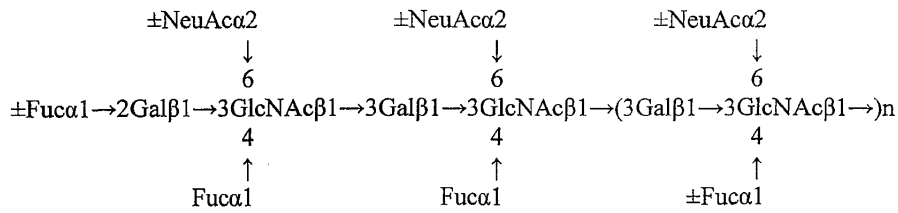
발명의 요약

간단히 설명하면, 본 발명은 유리(isolated) 화합물과 그러한 화합물을 검출함에 의해 암을 선별하는(screening) 방법을 제공한다. 일측면에 있어서, 본 발명은 푸코실(fucosyl) 및/또는 시알릴(sialyl) 잔기(residues)가 있거나 없는, 하기 식을 가지는 유리 화합물을 제공하며:



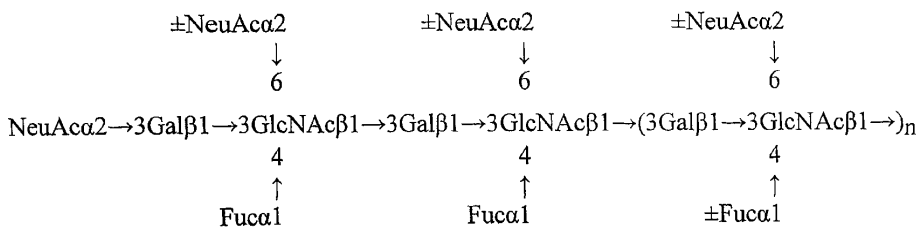
여기서, n은 0 또는 1 이상의 정수이고, 적어도 2개의 푸코실 및/또는 하나 또는 그보다 많은 시알릴 잔기가 있으며, Gal은 갈락토스를, Glc는 글루코스를, GlcNAc은 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)을, Cer는 세라마이드(ceramide)를 나타내며, 여기서, 상기 적어도 두개의 푸코실 잔기들은 α 1 \rightarrow 4 결합(linkage)을 통해 GlcNAc 잔기 및/또는 α 1 \rightarrow 2 결합을 통해 터미널 Gal 잔기에 결합되고, 상기 하나 이상의 시알릴 잔기들은 α 2 \rightarrow 3 결합을 통해 터미널 Gal 잔기 및/또는 α 2 \rightarrow 6 결합을 통해 하나 이상의 서브터미널 GlcNAc 잔기에 결합된다.

다른 측면에 있어서, 본 발명은 하기 식을 가지는 상술한 유리 화합물을 제공하며:



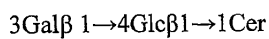
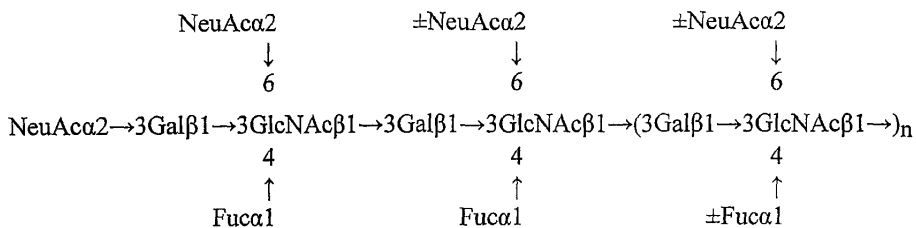
여기서, Fuc는 푸코스를 나타내고, NeuAc은 N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid)을 나타낸다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 하기 식을 가지는 첫번째로 설명된 화합물(the first described compound)을 제공하며:



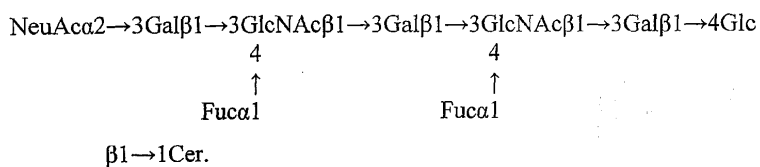
여기서, Fuc는 푸코스를 나타내고, NeuAc는 N-아세틸뉴라민산을 나타낸다.

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 하기 식을 가지는 첫번째로 설명한 화합물을 제공하며:

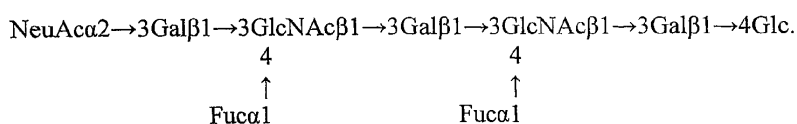


여기서, Fuc는 푸코스를 나타내고, NeuAc는 N-아세틸뉴라민산을 나타낸다.

또 다른 실시예에 있어서, 본 발명은 하기 식을 가지는 유리 화합물을 제공한다.



또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 하기 식을 가지는 에피토프(epitope)를 포함하는 유리 화합물을 제공한다.



또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 화합물은 다클론성 또는 단일클론성 항체를 만들기 위한 항원으로서 사용될 수 있다.

본 발명의 다른 측면에 있어서, 암을 가려내는(screen) 방법이 제공된다. 이 방법은 (a) 온혈동물로부터 생물학적 샘플을 분리하는 단계와; (b) 어떤 화합물의 존재 또는 그 양을 알기 위해 이 샘플을 시험하는(test) 단계를 포함하여 구성된다.

실시예

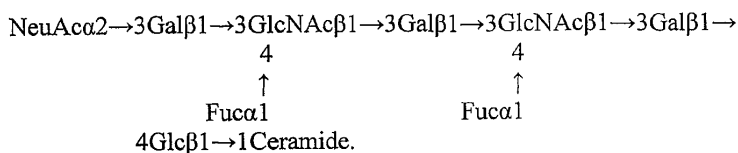
발명의 상세한 설명

본 발명은 일반적으로 암의 탐지와 관련된 화합물 및 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명의 설명은 락토-시리즈 1형 사슬이 암 조직에서 연장형(extended form)으로 발생된다는 것을 보여준다.

상술한 바와 같이, 1형 사슬 락토사민(Galβ1 →3GlcNAc)은 정상 세포와 조직에 많은 것으로 알려져 있다. 하나의 연장된 2형 사슬[예를 들어 Galβ1 →4GlcNAc 핵 구조(core structure)가 반복됨]을 가지는 폴리락토사민 항원이 검출되었다고 하더라도, 연장된 1형 사슬을 가지는 것들은 검출되지 않았다. 따라서, 종래에는 락토-시리즈 1형 사슬이 연장형으로 발생되지 않는 것으로 생각되어 왔다.

본 발명에서 개시된 바와 같이, 락토-시리즈 1형 사슬의 연장형[예를 들어 시알릴 및/또는 푸코실 잔기가 있거나 없는 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 2\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow (3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 2\text{GlcNAc}\beta \rightarrow)_n 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{R}$]은 암 조직에 존재한다. 락토-시리즈 1형 사슬의 두개의 대표적인 연장형이, (중양 세포로부터 추출된) 당지질 분획(glycolipid fraction)을 예비 컬럼(preparative column) 및 박막 크로마토그래피시킵에 의해 분리되었다.

저속이동(slow migrating) 시알릴-루이스^a(sLe^a) 활성 스핑고당지질 (glycosphinglipid; GSL)이 결장 선암종 세포계 (colonic adenocarcinoma cell line) Colo205의 단일시알릴 갱글리오사이드(monosialyl ganglioside) 분획으로부터 균질하게 정제되었다. 이 화합물은 두개의 상이한 용매 시스템의 HPLC 와 예비(preparative) HPTLC에 의해 정제되고, α-sLe^a 단일클론성 항체 (MAb) NKH-1를 사용하는 TLC 면역스테이닝(immunostaining)에 의해 강하게 스테이닝되었다(stained). 마일드 산(mild acid) 가수분해(1% 아세트산, 1시간동안 100℃)는, 이량체-Le^a 표준 GSL과 같이 이동되는 고속이동성분(faster migration component)을 수득하였고, α-이량체 Le^a MAb ST-421에 의해 진하게 스테이닝되었다. 그 구조는 ¹H-NMR 분광기에 의해 시알릴-이량체 Le^a(하기 구조 참조)로 확인되었다.



상기에 나타낸 특정 당지질에 더하여, $\text{Le}^a\text{-Le}^a$ 와 $\text{Le}^b\text{-Le}^a$ 에피토프가 추가 $[\text{3Gal}\beta 1 \rightarrow \text{3GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{n}]$ 단위를 가지는 연장된 1형 사슬로 존재할 수 있다. 더욱이, 당단백질, 예를 들어 고분자량 뮤신-유사 세럼(mucine-like sera) 당단백질이 $\text{Le}^a\text{-Le}^a$ 와 $\text{Le}^b\text{-Le}^a$ 에피토프를 가질 수 있다.

본 명세서의 가르침에 따라, 이 분야에서 통상의 지식을 가진 사람들에게는 락토-시리즈 1형 사슬 화합물의 다른 연장형 이, 암 조직과 같은 생물학적 출발 물질로부터 유리되거나 구조 확인(structural identification) 후에 화학적으로(및/또는 효소적으로) 합성될 수 있음이 명백하다고 하겠다. 간단히 말하면, 지질 또는 단백질 중 어느 하나에 결합된(bind) 탄수화물의 구조는 분해(degradation), 전자-충격 직접-탐침(electron-impact direct-probe; EI)과 고속 원자 충격(fast atom bombardment; FAB)을 포함하는 질량 분광법(mass spectrometry) 그리고 메틸화 분석[하기 설명된 기술, 예를 들어, 누델만(Nudelman) 등, J. Biol. Chem. 261:5487-5495, 1986년]에 기초하여 결정될 수 있다. 분해 분석은 화학적으로 및/또는 효소적으로, 예를 들어 글리코시다제(glycosidases)에 의해 수행될 수 있다. 분해 분석에 의해 제안된 탄수화물 서열(sequence)은 과메틸화된 당의 화학적 이온화 질량 분광법[예를 들어, 스텔너 등(stellner et al.), Arch. Biochem. Biophys. 155:464-472, 1974년; 레버리 등(Revery et al.), Meth. Enzymol. 138:13-25, 1987년]이 선행되는 메틸화 분석[예를 들어 하코모리(Hakomori), J. Biochem. 55:205-208, 1964년]에 의해 확정(determined)될 수 있

다. 그와 달리, 또는 이 기술과 관련하여, E1 질량 분광법이 과메틸화된 글리칸(glycans)에 또는 무손상 글리칸의 적절한 분해후에[예를 들어, 칸나기 등(Kannagi et al.), *J. Biol. Chem.* 259:8444-8451, 1984년; 누델만 등(Nudelman et al.), *J. Biol. Chem.* 263:13942-13951, 1988년] 수행될 수 있다. 탄수화물 서열의 균질성은, 무손상 또는 메틸화된 글리칸의 원자 NMR 분광법(spectroscopy)과 FAB 질량 분광법(spectrometry)을 포함하는 다양한 화학적 및 물리적 기준들(criteria)에 기초하여 증명될 수 있다. 일단 탄수화물 구조가 확정되면, 탄수화물 또는 그 유도체 또는 그 비탄수화물 기능적 균등물(non-carbohydrate functional equivalents thereof)이 관련 업계에서 잘 알려진 기술을 사용하여 합성될 수 있다.

본 발명의 화합물은 다클론성 및 단일클론성 항체(MAbs)를 만들기 위한 항원으로 사용될 수 있다. 다클론성 항체들은 표준 계통적분류법(standard methodologies)에 의해 만들 수 있다. 예를 들어, 간단히 말하면, 다클론성 항체는 본 발명의 화합물에 의한 동물의 면역(immunization)과 뒤이은 그 혈청(sera)의 수집에 의해 만들 수 있다. 일반적으로, 혈청 수집에 앞서 하나 또는 그 이상의 부스터(boosters)를 사용하는 초기 면역(법)이 선호된다. 이 단일클론성 항체(MAbs)는 일반적으로 코올러(Kohler) 및 밀스테인(Milstein) 방법[네이처(Nature) 256:495-497, 1975년; *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976년]에 의해 만들어질 수 있다. 간단히 말하면, 본 발명의 화합물로 면역된 동물의 림프절(lymph node) 및/또는 지라는 혼성 세포계[하이브리도마(hybridomas) 또는 클론]를 형성하도록 골수종 세포와 융합된다(fused). 각 하이브리도마는, 단일형의 면역글로불린(immunoglobulin)을 분비하고, 골수종 세포처럼, 부정 세포 분할(indefinite cell division)을 위한 잠재성(potential)을 가진다. 하이브리도마를 통한 MAbs를 만드는 대신, 박테리오파지(bacteriophage)와 박테리아를 사용하여 MAb 발현 라이브러리(express libraries)를 만든다[예를 들어, 새스트리 등(Sastry et al.), *Proc. Natl. Acad. USA* 86:5728, 1989년; 휴즈 등(Huse et al.), *Science* 246:1275, 1989년]. 원하는 특이성(specificity)을 나타내는 항체의 선택은 이 분야에서 통상의 지식을 가진 사람들에게 잘 알려진 다양한 방법으로 수행될 수 있다.

그들의 면역원성(immunogenicity)을 증가시키기 위하여, 본 발명의 화합물을 하나의 캐리어(carrier)와 결합하는 것이 바람직할 수 있다. 적절한 캐리어는 불활성 박테리아, 키홀 림피트 혈색소(keyhole limpet hemocyanin), 티로글로불린(thyroglobulin), 소의 세럼 알부민(serum albumin) 그리고 그들의 유도체들을 포함한다. 예를 들어, GSLs Le^a - Le^a 또는 Le^b - Le^a 의 탄수화물 잔기의 전부 또는 일부가 하나의 캐리어와 결합될 수 있다. 본 발명의 화합물은 흡착(adsorption)과 공유결합(covalent attachment)을 포함하는 다양한 방법에 의해 하나의 캐리어와 결합될 수 있다.

항원으로서의 본 발명의 화합물의 용도의 대표적인 예는, Le^b/Le^a 항원에 의한 마우스(쥐)의 면역이다. 간단히 말하면, Colo205 세포로부터 분리된 Le^b/Le^a 가, 산처리된 살모넬라 미네소타(acid-treated *Salmonella minnesotae*)의 현탁액과 혼합된 후 꼬리 정맥을 통해 BALB/c 마우스에게 주사되었고, 10일 간격으로 세차례에 걸쳐 주사가 반복되었다. 마지막 주사 후에, 면역된 마우스의 항체생산세포(splenocytes)가 수집되어 골수종 세포와 융합되었다. 항원과 선호(우선) 반응성(preferential reactivity)을 나타내는 하이브리도마, IMH2가 정착되어(established) 미국균주은행(American Type Culture Collection, 미합중국, 버지니아 20110, 매너사스, 유니버시티 블러바르드 10801)에 ATCC HB11026호로 기탁되었다. 그 하이브리도마는 IgG3 동종형(isotype)을 갖는 MAb 1MH2를 만든다.

Le^a - Le^a 및/또는 Le^b - Le^a 항원과 같은, 1형 사슬 항원의 연장형의 탐지 방법은, 암을 가려내기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, MAb 1MH2와 MAb NCC-ST-421[와타나베 등(Watanabe et al.)에 의해 정착, *Jpn. J. Cancer Res(Gann)* 76:43-52, 1985년]을 사용한 TLC 면역스테이닝(immunostaining)에 의해 각각 탐지된, 여러가지 종양 샘플들로부터 만든 중성 당지질 분석의 GSL Le^b - Le^a 와 GSL Le^a - Le^a 이 있다. 그러한 종양 샘플들은 결장암, 유방암, 호즈킨병(Hodgkin's disease), 담낭암 그리고 배성 횡문근육종(胚性橫紋筋肉腫; embryonal rhabdomyosarcoma)의 조직을 포함한다. 예를 들어, GSL Le^a - Le^a 는, 지라, 간, 신장, 태반 및 폐의 정상조직의 당지질 분석에서 검출되지 않았다. 본 명세서의 가르침에 따라, 이 분야에서 통상의 지식을 가진 사람들에게는 종양관련 연장된 1형 항원을 탐지하기 위한 다양한 방법[GSL Le^a - Le^a 와 GSL Le^b - Le^a 와 같은 종양관련 연장된 1형 항원에 특이적인 결합 파트너의 사용을 포함함]이 본 발명의 방법으로 사용될 수 있음이 명백하다고 하겠다. 예를 들어, Le^a - Le^a 또는 Le^b - Le^a 에피토프에 특이적인(specific) 항체들이 상술한 바와 같이 만들어질 수 있으며, 면역복합체(immunocomplexes)의 존재가, 면역복합체의 형성을 허용하기에 충분한 시간과 조건하에서 그러한 항체들의 생물학적 샘플과의 접촉(예를 들어 배양) 후에 시험될 수 있다.

상술된 항원과 상기 항원에 특이적인 항체 사이에 형성된 면역복합체의 존재의 탐지는, 방사선면역측정법(RIA) 및 효소연관면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)과 같은, 다양한 공지 기술에 의해 수행될 수 있다. 적절한 면역측정법은, 데이비드 등(David et al.)의 이중 단일클론성 항체 샌드위치 면역측정 기술(double monoclonal antibody sandwich immunoassay technique)[미국 특허 제4,376,110호]; 단일클론성-다클론성 항체 샌드위치 측정법

(monoclonal-polyclonal antibody sandwich assays)[와이드 등(Wide et al.), Kirkhan and Hunter, eds., 방사선면역측정방법(Radioimmunoassay Methods) E. and S. 리빙스톤(Livingstone), 에딘버그(Edinburgh), 1970년]; 고돈(Gordon et al.) 등의 특수단백검출검사(western blot) 방법[미국 특허 제4,452,901호]; 표지된 리간드의 면역침강(immunoprecipitation)[브라운 등(Brown et al.), J. Biol. Chem. 255:4980-4983, 1980년]; 예를 들어 레이너스(Raines) 및 로스(Ross)에 의해 설명된 바와 같은 효소연관면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay)[J. Biol. Chem. 257:5154-5160, 1982년]; 형광색소(fluorochromes)의 사용을 포함하는 면역세포화학기술(immunocytochemical techniques)[브룩스 등(Brooks et al.), Clin. Exp. Immunol. 39:477, 1980년]; 그리고 활성의 중화[보웬-포페 등(Bowen-Pope et al.), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2396-2400, 1984년]를 포함한다. 상술된 면역학적 측정법에 더하여, 미국 특허 제3,817,827호; 제3,850,752호; 제3,901,654호; 제3,935,074호; 제3,984,533호; 제3,996,345호; 제4,034,074호 및 제4,098,876호에서 설명된 것들을 포함하는 여러가지 다른 면역학적 측정법이 사용가능하다.

탐지 목적으로, 항체가 표지되거나(labeled) 표지되지 않을 수 있다. 표지되지 않을 경우, 항체들은 응집 분석법(agglutination assays)에서 사용된다. 한편 표지되지 않은 항체들은, 면역복합체와 반응성이 있는 표지된 분자와 결합하여, 또는 면역글로블린에 특이적인 항체와 같은, 화합물에 반대되는(directed against) 항체(제2 항체)와 결합하여 사용될 수 있다. 그와 달리, 항체들은 직접적으로 표지될 수 있다. 그들이 표지될 경우, 정보제공 그룹(reporter group)은 방사선 동위원소, 플루오로포어(fluorophores), 효소, 냉광체(luminescers), 또는 염료 입자를 포함할 수 있다. 이들 그리고 다른 표지들은 업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제3,766,162호; 제3,791,932호; 제3,817,837호; 제3,996,345호; 그리고 제4,233,402호에 개시되어 있다.

면역복합체를 탐지하기 위한 하나의 바람직한 실시예에 있어서, 하나의 정보제공 그룹이 항체에 결합된다(bound). 면역복합체를 탐지하는 단계는, 비결합된(unbound) 항체를 실질적으로 제거하고 그 다음에 정보제공 그룹의 존재를 탐지하는 단계를 포함한다. 비결합된 항체는 항원에 결합되지 않은 항체이다.

다른 바람직한 실시예에 있어서, 하나의 정보제공 그룹은, 항원에 특이적인 항체에 결합할 수 있는 제2 항체에 결합된다. 면역복합체를 검출하는 단계는, (a) 비결합된 항체(예를 들어, 항원에 결합되지 않은 항체)를 실질적으로 제거하는 단계와, (b) 제2 항체를 추가하는 단계와, (c) 비결합된 제2 항체를 실질적으로 제거하는 단계와, (d) 정보제공 그룹의 존재를 탐지하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 항원에 특이적인 항체가 마우스로부터 유도되는 경우에, 제2 항체는 하나의 항-마우스 항체(anti-murine antibody)이다.

면역글로블린을 탐지하기 위한 제3의 바람직한 실시예에 있어서, 하나의 정보제공 그룹이 면역복합체에 결합될 수 있는 하나의 분자에 결합된다. 탐지하는 단계는 (a) 분자를 추가하는 단계와, (b) 결합되지 않은 분자를 실질적으로 제거하는 단계와 그 다음에 (c) 정보제공 그룹의 존재를 탐지하는 단계를 포함한다. 면역복합체에 결합할 수 있는 분자의 예는 단백질 A 이다.

일반적으로 면역복합체와 반응성 있는 표지된 항체들, 표지된 제2 항체들 또는 표지된 분자들의 용도의 다른 것으로는, 표지된 항원을 사용하는 면역학적 측정이다. 그러한 측정법["간접(indirect)" 또는 "경쟁적(competitive)"]에 있어서, 샘플에 존재하는 항원은 항체에 대해 표지된 항원과 경쟁할 것이다.

이 분야에서 통상의 지식을 가진 사람들에게는 면역복합체를 탐지하기 위한 다양한 방법이 본 발명의 범위내에서 사용될 수 있음이 명백하다. 상기 방법에서의 사용에 적합한 정보제공 그룹은 방사선동위원소, 플루오로포어, 효소, 냉광체 및 염료 입자를 포함한다. 한편, 본 발명의 종양관련 연장된 1형 항원에 특이적인 결합 파트너(binding partner)[항체가 아닌 것]는 그러한 항원에 대한 시험에 사용될 수 있으며, 그러한 결합 파트너와 항원 사이에 형성된 복합체는 그러한 면역복합체에 대해 상술된 것들과 동일한 기술에 의해 탐지될 수 있다.

다음의 실시예들은 제한이 아닌 설명을 위하여 제공된다.

실시예

실시예 1

종양 및 정상 조직으로부터 준비된

중성 당지질의 MAB NCC-ST-421을 사용한

HPTLC 면역스테이닝 및 면역학적 측정

A. 단일클론성 항체 및 면역학적 측정

MAB ST-421은 전술한 바와 같이[와타나베 등(Watanabe et al.), *Jpn. J. Cancer Res(Gann)* 76:43-52, 1985년] 정착되었다(established). 1형 사슬 N-아세틸락토사민(N-acetyllactosamine)[Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow R]을 정의하는 MAB MNH-1 은, 본 발명자들의 실험실에서 준비되었고; 2형 사슬 N-아세틸락토사민[Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow R]을 정의하는 MAB 1B2 는, 전술한 바와 같이[영 등(Young et al.), *J. Biol. Chem.* 256:10967-10972, 1981년] 정착되었다(established). 항-Le^a MAB(anti-Le^a MAB)는 켐바이오테드 엘티디.(Chembiomed Ltd.; 캐나다 앨버타 에드몬톤)로부터 구입했다. 항-Le^y MAB AH6 가 전술한 바와 같이[아베 등(Abe et al.), *J. Biol. Chem.* 258:11793-11797, 1983년] 정착되었고, Le^b와의 교차-반응성(cross-reactivity)을 나타내지 않았다. 항-Le^b MAB는 켐바이오테드 엘티디.(캐나다 앨버타 에드몬톤)로부터 구입했으며, 1형 사슬 H와 교차-반응성을 나타내었다. 다른 항-Le^b MAB는 모노카브(Monocarb; 스웨덴 룬트)로부터 구입했으며, Le^b, 1형 사슬 H 및 Le^y 와 반응을 나타내었다. HPTLC 면역스테이닝은, 마그나니 등(Magnani et al.)에 의해 처음으로 설명된 방법[마그나니 등(Magnani et al.), *Anal. Biochem.* 109:399-402, 1980년]의 변형된 버전[칸나기 등(Kannagi et al.), *J. Biol. Chem.* 257:4438-4442, 1982년; 칸나기 등, *J. Biol. Chem.* 257:14865-14874, 1982년]에 의해 와트만(Whatman) HPTLC 플레이트(HP-KF)를 사용하여 수행되었다.

B. 당지질 준비

사용된 모든 당지질 샘플들이 효소적으로 분리되거나 합성되었다. VI³NeuAcnLc₆, IV³NeuAcIII⁴FucLc₄, VI²FucnLc₆, 및 IV²FucLc₄ 가, 폴크 분배(Folch partition), DEAE-세파덱스(Sephadex) 크로마토그래피, 그리고 아이에트로비즈(Iatrobeds) 6RS-8010 컬럼에서의 HPTLC[마그나니 등(Magnani et al.), *J. Biol. Chem.* 257:14365-14369, 1982년; 와타나베 등(Watanabe et al.), *J. Biol. Chem.* 254:8223-8229, 1979년; 하코모리 등(Hakomori et al.), *J. Immunol.* 98:31-38, 1967년; 스텔너 등(Stellner et al.), *Biochemistry* 12:656-661, 1973년]에 선행된 IHW (55:25:20)를 사용한 추출 후에 인간 태반, 간 선암종, 인간 O형 적혈구, 그리고 돼지의 장으로부터 각각 분리되었다. nLc₆ 및 III⁴FucLc₄ 는, 100°C에서 1시간동안 1% 아세트산에서 샘플들을 가열함에 의한, VI³NeuAcnLc₆와 IV³NeuAcIII⁴FucLc₄, 각각의 탈시알릴화(desialylation)에 의해 만들어졌다. IV³GlcNAcLc₄, IV³Gal β 1 \rightarrow 3-GlcNAcLc₄, IV³Gal β 1 \rightarrow 3[Fuc1 \rightarrow 4]GlcNAcLc₄ 및 IV³Gal β 1 \rightarrow 3[Fuc1 \rightarrow 4]GlcNAcIII³FucnLc₄(Le^a-Le^x)는 효소적 합성에 의해 만들어졌다. IV³Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAcIII³FucnLc₄는, IV³Gal β 1 \rightarrow 3[Fuc1 \rightarrow 4]GlcNAcIII³FucnLc₄의 α -푸코시다제(α -fucosidase) 처리에 의해 만들어졌다[예를 들어 100 μ g의 당지질이 0.05 유닛(units)의 소의 신장 α -L-푸코시다제[시그마 케미컬 씨오.(Sigma Chemical Co.), 미주리주 세인트 루이스(St. Louis, Mo.)]를 포함하는 0.2M 구연산염 완충액(pH 4.5)으로 37°C에서 2시간동안 배양되었다]. IV²III⁴Fuc₂Lc₄, V³III³Fuc₂nLc₆ 및 VI²V³Fuc₂nLc₆ 는, Colo205로부터의 α 1 \rightarrow 3/4 푸코실전이효소(fucosyltransferase)를 사용하는 기질로서 IV²FucLc₄, nLc₆와 VI²FucnLc₆ (각각)의 α 1 \rightarrow 3 푸코실화(fucosylation)에 의해 생합성적으로 만들어졌다. α 1 \rightarrow 3/4 푸코실전이효소는, 4°C의 포터-엘브렘 균질기(Potter-Elvehjem homogenizer)에서 50mM 헤페스 완충액(Hepes buffer)[pH 7.0], 0.5 M 수크로즈, 1 mM의 EDTA, 그리고 1% 트리톤(Triton) CF-54의 두 볼륨(volumes)으로의 균질화(homogenization)에 의해 Colo205 세포로부터 용해되었다(solubilized). 균질액이 100,000 X g 에서 1시간동안 원심분리되었고, 상층액이 여막분석(dialysis)에 의해 세포의 원래 부피로 농축되었다. 효소 조제물(enzyme preparation)은 필요할 때까지 -80°C로 저장되었다.

효소에 의한(enzymatic) α 1 \rightarrow 3/4 푸코실화는 1mg의 스팅고당지질(glycosphingolipids; GSL) 기질, 1mg의 데옥시타우로담즙산염(deoxytaurocholate), 10 μ mol의 MnCl₂, 25 μ mol의 헤페스 완충액(Hepes buffer)[pH 7.0], 5 μ mol의 CDP-콜린(CDP-choline), 6 μ mol의 GDP-푸코스, 그리고 500 μ l의 효소 조제물(enzyme preparation)을 전체 부피 1ml로 함유하는 반응 혼합물에서 수행되었다. 반응 혼합물은 37°C에서 16시간동안 배양된 다음에 동결탈수되고, 초음파 분해(sonication)에 의해 이소프로판올-헥산-물(isopropanol-hexane-water; IHW)(55:25:20)로 추출된 다음 원심분리되었다. 상층액은 200분 이상 55:40:4 부터 55:25:20 까지의 IHW의 기울기 용리(gradient elution)를 사용하는 아이에트로비

즈(Iatrobeds) 6RS-8010 컬럼에서 HPLC 되었다. 2ml 분획이 수집되었고 최종 생성물을 포함하는 튜브가 클로로포름-메탄올-물 50:40:10에서의 HPTLC 이동에 따라 채워졌다. GSL 밴드는 오르시놀 스프레이 시약(orcinol spray reagent)에 의해 시각화되었다(visualized).

특징지어진(defined) 구조를 가지는 각 GSL은 특정 MAb(s), 예를들어, 항(anti)-Le^y MAb AH6이 아닌 항-Le^b MAbs와 반응된 Le^b/Le^a 항원; 항-Le^b도 항-Le^x MAbs도 아닌 AH6와 반응된 Le^y/Le^x; MAb ST-421과 함께 항-Le^a MAb와 반응된 Le^a/Le^a 및 Le^a/Le^x와의 반응성에 의해 특징지어졌다.

C. TLC 면역스테이닝

다양한 종양 샘플로부터 준비된 중성 당지질 분획의 TLC 면역스테이닝은 Le^a-활성 세라마이드 펜타사카라이드(Le^a-active ceramide pentasaccharide)보다 더 느리게 이동하고(migrating) 항-Le^a MAb 와 교차-반응하는(cross-reacting) 양성 밴드의 존재를 나타내었다. 이 밴드는 NAb NCC-ST-421에 의해 강하게 스테이닝되었고(stained), 시험한 대부분의 종양에서 나타났다. 결장암, 유방암, 호즈킨병, 담낭암 그리고 배성 횡문근육종으로부터의 예(examples)가 그것이다.

실시예 2

이량체 Le^a 항원 및 Le^b-Le^a 항원의 분리(isolation)

A. 종양 조직의 준비

Colo205 세포 (ATCC) [샘플 등(Semple et al.), *Cancer Res.* 38:1345-1355, 1978년]를 10% 우태아혈청(fetal calf serum)을 함유하는 RPMI 1640 배지에서 성장시켰다. 세포들은 거의 7일마다 채취되어 패스되었다(passed). 채취된 세포들은 tripsin처리되고, 원심분리되고, 인산염-완충 식염수(phosphate-buffered saline)(pH 7.4)로 두차례 세척된 다음 혈구계(hemocytometer)를 사용하여 카운트되었다. 4×10^6 세포들이 6마리의 흉선없는 마우스[athymic (nude) mice]의 각각에 피하 주사되었다. 종양(각각 약 2ml)이 2주후에 절제되어 필요할 때까지 -80°C에서 냉동되었다.

B. Colo205 종양으로부터의 저속-이동, Le^a-활성 성분[이량체 Le^a]의 분리

약 200g의 종양이 이소프로판올-헥산-물(IHW)(55:25:20)으로 추출된 다음, 폴크 분배(Folch partition), DEAE-세파덱스(DEAE-Sephadex) 크로마토그래피, 그리고 아이아트로비즈(Iatrobeds) 6RS-8010 컬럼에서 HPTLC 처리되었다. 상부-상(upper-phase) 중성 분획의 기율기 용출이 55:40:5 에서 55:25:20 까지의 IHW 에서 200분 이상 수행되었다. 2-ml 분획이 수집되어 클로로포름-메탄올-물 (50:40:10)에서의 HPTLC 이동에 따라 채워졌다. 저속-이동 Le^a-활성 분획 [TLC 면역스테이닝에 의해 나타남]은 머크(Merck) HPTLC 플레이트[독일, 담스타트, 머크, 실리카 겔 60]에서의 예비 TLC에 의해 더 정제되어, 구조적 확인(characterization)을 위해 사용되었다.

C. Le^b-Le^a 항원의 분리

이량체 Le^a 항원 바로 아래로 이동하는 양성 밴드(실시예 1에 따른 MAb NCC-ST-421로 면역스테이닝에 의한)가 상기 B 섹션에서 설명된 방법을 사용하여 정제되었다.

실시예 3

이량체 Le^a 및 Le^b-Le^a 항원의 확인

A. 효소적 분해(Enzymatic Degradation)

1mg의 이량체 Le^a의 효소적 분해가 0.5 유닛의 α -푸코시다제(소의 신장), 0.5 유닛의 β -갈락토시다제[잭빈(jackbean)], 그리고 0.5 유닛의 β -N-아세틸글루코사미니다제(소의 부고환)[시그마 케미칼 씨오.(Sigma Chemical Co.), 미주리 세인트 루이스]를 사용한 연속적인 가수분해에 의해 수행되었다. 모든 반응이 37℃의 수조에서 4시간동안 0.2M 구연산나트륨(pH 4.5)에서 저어주면서 수행되었다. 각 분해 생성물의 정제가 예비 HPTLC에 의해 수행되었다.

B. IMH2의 시험관내 세포파괴(Cytotoxicity)

1. 세포계

Colo205는 처음에 미국균주은행(American Type Culture Collection; ATCC)으로부터 구입되어, 10% 우태아혈청, mM L-글루타민, 100 IU/ml 페니실린 그리고 10 μ g/ml 스트렙토마이신이 보충된 RPMI-1640 배지에서 배양되었다. 인간 표피모양암종(epidermoid carcinoma) A431 세포계[맥리어드 등(MacLeod et al.), *J. Cell. Physiol.* **127**:175-182, 1986년]는 처음에 캐롤 맥리어드 박사(Dr. Carol MacLeod)[캐나다, 샌디에고, UCSD 의학부, 길드레드 암 기관(Gildred Cancer Facility)]에 의해 기증되었다. 이 세포계는 EGF 수용기의 Le^a, Le^b, Le^x, Le^y, 그리고 ALe^b를 나타낸다[구이 등(Gooi et al.), *Biosci. Reports* **5**:83-94, 1985년]. A431 세포들은 5% 우태아혈청, 1mM 글루타민, 110 mg/l 피루브산 나트륨, 100 IU/ml 페니실린, 10 μ g/ml 스트렙토마이신이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)[캐나다, 산타 에이나(Santa Ana), 어빈 사이언티픽(Irvine Scientific)]에서 배양되었다. 세포들(약 5×10^5 /ml)은 살포되어 EDTA 처리에 의해 컨플루언시에서(at confluency) 수득된 다음 Ca²⁺와 Mg²⁺를 포함하는 PBS로 세척되었다. 이들은 시험관내 세포파괴(세포독성) 측정에서 표적 세포로 사용되거나 또는 5×10^6 세포의 피하접종에 의해 nude 마우스(nude mice)에서의 종양형성(tumorigenicity)을 시험하기 위하여 사용되었다. 인간 적백혈병(erythroleukemia) K562 세포들[로지오 등(Lozzio et al.), *Blood* **45**:321-334, 1975년]이 측정 시스템(assay system)에서 사용된 림프구의 자연 살해(natural killer; NK) 활성화에 대한 대조구(controls)로 사용되었다.

2. 항체-의존성 세포파괴(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC) 및 보체-의존성 세포파괴(Complement-Dependent Cytotoxicity; CDC)

ADCC 측정을 위해, 인간 말초 혈액 백혈구(human peripheral blood leukocyte; HPBL)[효과기 세포(effector cell)로 사용]를 건강한 자원공혈자(volunteer donor)의 혈액의 백혈구연층(buffy coat) 분획으로부터 얻었다. 간단히 말하면, 단일클론성 세포들이 2000 rpm에서 20분동안 피콜 하이파큐(Ficoll Hypaque) 기울기 용출을 통한 원심분리에 의해 분리되었다[미셸 등(Michell et al.), Mishell, B.B 및 Shiigi, S. M.(판), *Selected Methods in Cellular Immunology*, pp. 3-27, W.H. Freeman & Co., 캐나다 샌프란시스코, 1980년]. 마우스 항체생산세포 및 마우스 복강대식세포(효과기 세포)가 미셸 등에 의해 앞서 설명된 바와 같이, 다음과 같이 다소 변형되어, 준비되었다. 표적 세포(5×10^6)가 37℃에서 90분동안 100 μ l의 ⁵¹Cr을 사용한 배양에 의해 표지되었다. 세척(3X)과 배양(37℃에서 1시간) 후에, 세포들(1×10^6 /ml)이 25mM HEPES 완충액과 3% 소의 혈청 알부민이 보충된 RPMI-1640에 부유되었다. 20 μ l의 표지된 세포들, 100 μ l의 IMH2 또는 ST-421, 및 100 μ l의 효과기 세포 현탁액이 마이크로타이터 U-기부 플레이트(Microtiter U-bottom plates)[코닝(Corning), 뉴욕(NY)]로 혼합되었다. 비-특이성 마우스 Ig[시그마(Sigma), 미주리, 세인트 루이스]가 음성 대조구(control)로 사용되었다. 4시간의 배양후에, 플레이트가 원심분리기에 조립된 현수 플레이트-홀더(hanging plate holder)로 원심분리되었고(500 X g, 2분), 각 웰(well)의 100 μ l 상층액의 방사능이 감마 계수기(gamma counter)로 측정되었다. 각 시험 그룹을 세번씩 테스트했다. 퍼센트 특정 용해(percent specific lysis)가 식 「([A-B] X 100)/C, A = 용해된 시험 세포들에서의 cpm; B = 용해되지 않은 표적 세포들에서의 cpm; C = 전체 표적 세포들에서의 cpm」에 따라 계산되었다. 자연적인 방출(spontaneous release)은 결코 최대 방출가능 표지 방사능의 15%를 초과하지 않았다.

CDC를 위하여, 100 μ l의 묽은 인간 혈청이 효과기 세포 대신에 보체원(complement source)으로서 첨가된 것을 제외하고는 ADCC의 것과 동일한 방법을 사용하는 Cr-방출 분석이 수행되었다. 혈청을 56℃에서 30분 동안 불활성화하여, 대조구로 사용했다. 퍼센트 특정 용해가 상술한 바와 같이 계산되었다.

Colo205 세포들이, MAbs ST-421과 IMH2와 각각 강하게 반응하는 연장된 1형 사슬 Le^a/Le^a 및 Le^b/Le^a 항원을 발현하는 것으로 확인되기(characterized) 때문에, Colo205에 대한 IMH2의 세포파괴 효과가 평가되어(evaluated) ST-421의 것과 비교되었다. 두 MAbs는 Colo205 세포들의 현저한(striking) ADCC 살해(killing)를 나타내었다. 이 살해는 효과기 : 표적 세포 (E : T) 비율 및 MAb 농도와 서로 관련이 있었다. 세포 독성 효과가, 100 : 1 - 200 : 1의 E : T 비율에서, 그리

고 35 - 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MAb 농도에서 최대였다. 대조구 마우스 IgG와 다른 비-특이성 MABs는 E : T 비율 또는 MAb 농도와 관계없이 세포파괴 효과를 나타내지 않았다. 동일한 세포파괴 시험이 마우스 항체생산 세포에 수행되었을 때, 상응하는 값은 단지 7% 와 17% 용해였다(E : T 비율은 200 : 1, MAb 농도는 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). MAb는 A431 세포들에 대한 약한 세포파괴 효과를 나타냈다(표). Colo205, A431 및 K562 세포의 최대 IMH2-의존성 용해의 비교가 표에 나타나 있다. 높은 용해 값(예를 들어, Colo205 세포들은 IMH2 및 ST421과 각각 65% 및 94% 용해)들이 HPBL의 존재하에서만 나타났고(pronounced); 앞서 ST-421로 관찰된 바와 같이[와타나베 등, Cancer Res. 51:2199-2204, 1991년], 그 값들은 마우스 항체 생산 세포를 가진 것보다 더 작았다. IMH2 및 ST-421에 의해 조정된(mediated) CDC는 보정 농도(complement concentration) 및 MAb 농도와 유사하게 서로 관련되었다(correlated).

(표)

MAbs ST-421 및 IMH2에 의한 Colo205, A431, 그리고 K562 세포에서의 MAb-의존성 세포파괴 효과

표적 세포	항체/ 반응성 ^b	퍼센트 용해 ^a		
		효과기 세포+ MAb+	효과기 세포+ MAb-	효과기 세포- MAb+
Colo205	ST-421+	94.5	2.7	0.8
	IMH2+	65.0	2.7	0.7
A431	ST-421±	14.4	10.9	1.1
	IMH2±	7.6	9.2	0.6
K562 ^c	ST-421-	48.2	36.2	0.5
	IMH2-	44.8	36.2	0.3

a. IMH2(35 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 ST-421 [100배로 희석된 복수(腹水)(X100 diluted ascites)]를 사용한 100 : 1의 E : T (효과기 : 표적 세포) 비율에서의 퍼센트 용해.

b. 유식세포측정(flow cytometry)에 의해 판정됨. +, 양성; ±, 약하게 양성; -, 음성.

c. K562 세포의 높은 세포파괴 효과가 MAb가 없어도 또한 관찰되고, 자연 살해 세포 활성(natural killer cell activity)을 반영한 것이라고 여겨짐.

C. 생체 조건에서의(in vivo) 종양 억제

생체 조건 시험을 위해 사용되는 Colo205 및 A431 세포들을 시험관내에서 성장시켜 배지로 2 X 세척되고, 원하는 세포 농도의 PBS에서 재구성되었다(reconstituted). 세포들(5 X 10⁶/100 μl)은 5 ~ 7주령(5- to 7-week-old)의 흉선없는 BALB/c 마우스의 등(backs)으로 피하 주사되었으며, MAb의 복강내 투여가 주사 후에 즉시 시작되었다. 1 마리당 0.2ml의 투여량에서(at a dosage of 0.2ml/animal) IgG (1.1-1.2ng/ml)의 농도를 가지는 복수액(腹水液)(ascites fluid)에서 정제된 IMH2(1.1mg/ml) 또는 ST-421이, 2주동안 1X/일(day)로 복막내(intraperitoneally) 주사되었다. 종양의 폭과 길이는 동일한 관찰자에 의해 일주일에 3번(3X/week) 측정되었다. 종양 무게는 「(폭² X 길이)/2」로 계산되었다. 대조구 동물들은, BALB/c 마우스의 마우스 골수종 세포계 NSI에 의해 만들어진 복수(腹水) 단백질을 받아들였다(received). 그룹당 7 마우스가 각 시험을 위해 사용되었고, 시험은 두차례 실시되었다. 두차례의 시험에 근거한 종양 무게의 평균값(mean values)이 그래프로 작성되었다.

MAb IMH2 및 ST-421가 모두, 누드 마우스에서 Colo205 종양 성장의 현저한 억제를 나타내었다. 대조적으로, 두 MAb는 A431 종양 성장에 대해 최소 억제 효과를 나타냈다. 따라서, 특정된(defined) 항원의 높은 발현은 생체내에서의 종양 성장의 항체-의존성 억제에 대한 민감성(susceptibility)에 필수적인 것으로 보인다.

D. IMH2의 여러가지 종양과 정상 조직과의 반응성(Reactivity)

여러가지 종양과 인접한 정상 조직들을 포르말린으로 고정되고 파라핀 매입된(paraffin-embedded) 외과 표본들(surgical specimens)로부터 얻었다. 한편, 정상 조직들과, 뇌, 흉선, 폐, 간, 위, 결장, 신장, 부신선, 지라, 췌장, 자궁(자궁 내막이 있는) 및 피부로부터의 종양 조직들을 사고 희생자들의 첫번째 검시(fresh necropsy)에 의해 얻었다. 외과 및 검시 표본은 모두, 와싱턴, 시애틀, 스웨디쉬 메디칼 센터(Swedish Medical Center), 병리학부와 더 바이오멤브레인 인스티튜트(The Biomembrane Institute)의 미즈. 데이비 베넷(Ms. Debbie Bennet)의 허가를 받아 제공되었다. 샘플들은 절개하여(3 μ M 두께), 자일렌(xylene)으로 파라핀을 제거하였고, 에탄올에서 탈수되었고, 1차 MAb로 처리되었으며, 그 다음에 바이오티닐화된 2차 MAb(biotinylated secondary MAb)와 페록시다제-결합 아비딘(oxidase-conjugated avidin)으로 처리되었고, 3',3'-디아미노벤지딘(diaminobenzidine)으로 스테이닝되었다. 절편들의 0.3% H₂O₂를 사용한 20분동안의 절단 처리에 의해 내인성 페록시다제 활성(endogenous peroxidase activity)을 차단하였다. 일부 절편들(sections)을 음성 대조구로서의 마우스 IgG로 배양했다. 바이오티닐화된 고우트 항-마우스(biotinylated goat anti-mouse) IgM, 아비딘(avidin), 및 바이오틴(biotin)이 벡타스테인(Vectastain)[캘리포니아, 버링엄(Burlingame)] 제품이였다.

MAb IMH2는, 결장, 직장, 간, 췌장 및 자궁내막으로부터의 종양과 강하게 그리고 높은 발병률로 반응하였다(표 1). 대조적으로, MAb IMH2는 움 영역(crypt region)과 배상 세포를 포함하는 말단 결장 및 직장의 정상 근육관(mucosae)과 반응성을 나타내지 않았으며, 그것은 큰 세포 또는 작은 세포 암종과 반응하지 않고 폐 선암종과 반응하였다. 편평세포암종의 5 경우중의 하나는 강한 양성 반응성을 나타냈다. MAb IMH2는 정상 뇌, 폐, 지라, 피부 또는 과립백혈구를 포함하는 여러 가지 혈액 세포들과 반응하지 않았다.

정상 조직에서 강하게 스테이닝된 것으로 관찰된 위치는: 해셀체(Hassall's bodies)와 흉선의 상피세포(흉선 세포는 음성); 점액성 상피 세포와 위 점막층의 분비샘[고유층(lamina propria), 장막, 그리고 근육층은 음성]; 부신선의 양 연수(medulla)와 피질이다. 중등도(moderate)로부터 약하기(weak)까지의 양성 스테이닝을 가지는 정상 조직의 위치는: 신장의 몸쪽 및 말단 뇌회(convolution)의 상피 세포(다른 부분은 음성); 췌장의 랑게르한스섬의 세포(췌장의 다른 부분은 음성); 맹장 점막층; 요로상피이다. 매우 약한 스테이닝이 간세포[간의 다른 부분, 하소엽(infralobular) 결합 조직, 중심 정맥, 담관 및 별큰포식세포(Kupffer's cell)는 음성]에 대해 관찰되었다. 이 결과들은 표 1에 요약되어 있다.

[표 1]

정상 조직과 암종(carcinomas)의 MAb IMH2에 의한 면역조직학적 스테이닝 (immunohistological staining)

조직	염색	위치결정(localization)/주해
정상		
뇌		
폐		
지라		기관지폐포성(broncheolar) 상피를 포함
직장	-	
결장	-	움 영역(crypt area) 포함
맹장	-	-11/12, \pm 1/12
피부	-	
과립백혈구	-	
림프구	+	
췌장	-	
간	-	랑게르한스섬에서 +; 다른것들은 -
흉선	-	간세포는 희미하게 +/-; 다른것들은 - -
위	+	해셀체(Hassall's bodies), 상피 및 망상 세포에서 ++;
신장	±	흉선 세포에서 -
부신선	++	점막층, 선 세포(텍스트 참조)
자궁/자궁내막	+++	관상 상피(tubular epithelia)에서 약하게 +(텍스트 참조)
	+	자궁내막에서 - 또는 약하게 +; - 9/15, \pm 2/15, +4/15
암종	+++	(전체 양성 케이스 4/15 = 27%)
결장/직장	-/+	
간(1차)		
췌장		
폐 선암종	+/+++	
편평세포(squamous)	++	
	+++	

대 세포 소 세포 자궁내막	-	1/5
	-/+++	0/3
		0/5
	+++4, ++11, +6/24, ±-3 (전체 양성 케이스 21/24 = 88%)	

E. 알려진 루이스(Lewis) 및 분비자(secretor) 상태(status)를 가진 환자의 정상 및 악성의 대장 및 방광 조직과의 IMH2의 반응성

일부 종양에서 루이스 항원의 발현이 호스트 루이스 상태(host Lewis status)와 관련되어 있지 않는 반면[(Ørntoft et al.), Lab. Invest. 58:576-583, 1988년; (Ørntoft et al.), Blood 77:1389-1396, 1991년], Le^b 및 Le^y 결정자(determinants)의 발현은 개체의 분비자 상태(secretor status)와 상호 관련되어 있다[사카모토 등(Sakamoto et al.), Molec. Immun. 21:1093-1098, 1984년; (Ørntoft et al.), J. Urol. 138:171-176, 1987년]. 따라서, 알려진 루이스(Lewis) 및 분비자 상태를 가진 환자의 정상 및 악성의 대장 및 방광 조직과 MAb IMH2의 반응성을 연구하였다. 그 결과들이 표 2 및 3에 요약되어 있다. IMH2는 정상 직장 조직이 아닌 직장 종양과 반응성이 있었고, 이 반응성은 분비자 상태와 관련이 없었다. 역으로, IMH2는 정상 맹장과 반응성이 있었으며, 연구된 단일 맹장 종양 샘플과는 반응성이 더 적었다. 이 결과들은 정상 및 악성 대장 조직에서의 IMH2 에피토프 발현의 경향이 ABH 항원의 잘-정착된(well-established) 발현 패턴과 유사함을 암시한다. 진성 루이스-음성(Le^{a-b-}) 개체들[(Ørntoft et al.), Lab. Invest. 58:576-583, 1988년]은, 정상 및 악성 대장 조직에서 IMH2 에피토프를 발현했다(표 2 및 3).

IMH2 에피토프가 정상 요로상피에서 발현되었으나, 그 발현은 방광 종양에서 다양한 정도로(to varying degrees) 감소되었다. 거기에는 비정형의 정도(grade of atypia)와 상호관계가 있는 것으로 보이는데, 예를 들면 IMH2 에피토프 발현이 고도의 침습성(invasive) 종양에서 가장 낮다. 다시 말하면, 이 경향은 정상 및 악성 방광 조직에서의 ABH 항원 발현의 경우와 유사하다. 그러나, 대장 조직과 비교하면, 혈액 그룹 A 개체들로부터의 방광 조직에서의 IMH2 에피토프 발현은 분비자 상태와 상호관련된다. 진성 루이스-음성(Le^{a-b-}) 개체들은 정상 및 악성 방광 조직 모두에서 IMH2 에피토프를 발현했다.

【표 2】

정상 및 악성 대장 조직의 MAb IMH2에 의한 면역조직학적 스테이닝: 호스트 루이스 상태(host Lewis status)와의 관계

	정상	악성
	직장 맹장	직장 맹장
A Le ^{a-b+}	0/5 1/1	3/4 1/1
A Le ^{a+b-}	0/4 ND	2/2 ND
O Le ^{a-b+}	0/2 ND	2/3 ND
O Le ^{a+b-}	0/2 ND	1/1 ND
진성(genuine) Le ^{a-b-}	0/1 1/1 ^a	1/1 0/1
비-진성(non-genuine) Le ^{a-b-}	0/2 ND	1/1 0/1

숫자는 시험실시된 전체 표본에 의해 나누어진 양성 표본들을 나타낸다. "ND"는 "판정되지 않음(not determined)"을 나타낸다. Le^{a-b-} 개체들(진성 및 비-진성)에 있어서, 표현형 상태(phenotypic status)는 타액에서의 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 푸코실화전이효소 활성과 항-Le^a 및 Le^b MAb와의 적혈구 반응성에 의해 결정되었다. 표현형(phenotypes)의 정의는 홈즈 등(Holmes et al.)[Arch. Biochem. Biophys. 274:14-25, 1989년, 및 (Ørntoft et al.), Lab. Invest. 58:576-583, 1988년]에서 찾을 수 있다.

^a 비-분비자(non-secretor)

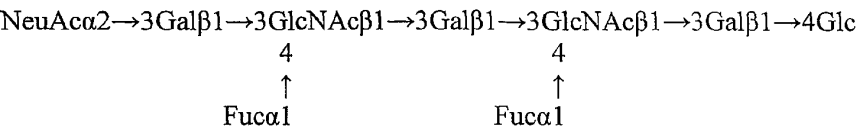
[표 3]
정상 및 악성 방광 조직의 MAb IMH2에 의한 면역조직학적 스테이닝: 호스트 루이스 상태와의 관계

	정상	방광 암종
		비침습성 침습성
A Le ^{a+b+}	4/4	1/1 1/2
A Le ^{a+b-}	0/2	1/2 1/3
O Le ^{a+b+}	1/1	1/1 1/2
O Le ^{a+b-}	2/2	1/1 0/1
진성 Le ^{a+b-}	2/2	ND 0/1
비-진성 Le ^{a+b-}	ND	ND ND

주요한 각주는 표 2의 것과 같음.

F. 연장된 시알릴-Le^a (또는 S Le^a-Le^a)의 분리

Colo205 세포들의 단일시알로-갱글리오사이드(monosialo-ganglioside) 분획의 시험은, 고 효율(high performance) 박막 크로마토그래피 기술에 의해 하나의 메이저 갱글리오사이드(one major ganglioside)의 분리로 이끌거나 분리를 가져왔다. 메이저 밴드가 추출되어 특징지어졌다(characterized). 그 구조는 다음과 같이 확인되었다(identified).



이 구조는 ¹H-NMR에 의해 검증되었다(varified).

SLe^a - Le^a 구조의 연장된 시알릴-Le^a는, 단일 클론성 항체 ST-421을 사용한 면역스테이닝 크로마토그래피에 의해 확인된 Le^a - Le^a와 동일한 화합물을 얻기 위한 시알리다제(sialidase)를 사용한 효소적 분해(enzymatic degradation)에 의해 검증되었다. 원래의 시알릴 Le^a - Le^a 또는 연장된 Le^a는 MAb ST-421과 반응성을 나타내지 않는다. 그러나, 이 화합물은, N-19-9, NKH-1 및 NKH-2와 같은 시알릴-Le^a로 다이렉트되는(directed) MAb와 반응성을 나타내었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 당(sugar) I(Glc), II(Gal), III(GlcNAc), IV(Gal), V(GlcNAc) 및 VI[F_{III}로 나타낸 III GlcNAc에 결합된 푸코스(fucose)와 F_{IV}로 나타낸 V GlcNAc에 결합된 푸코스 외에 Gal도]를 포괄하는, 4.20 ppm 내지 5.60 ppm에서 화학적 이동(chemical shift)에 따른 연장된 시알릴 Le^a의 ¹H-NMR 스펙트럼이다. 이 스펙트럼에서, F_V과 F_{III}의 모든 아노머 양성자 스펙트럼(anomeric proton spectrum)은 F_{V-1}과 F_{III-1}로 표시되어 있다. 한편 푸코스의 스펙트럼 C5 양성자는 F_{III-5}와 F_{V-5}로 표시된 다중 결합으로 표시되어 있다. Cis로 표시된 스펙트럼은 하나의 Cis 스펅고신(spingosine)의 이중 결합이고, R-5와 R-4는 스펅고신의 스펙트럼을 나타낸다.

도면

도면1

