

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ A61K 51/00 A61K 49/00	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	1998년 12월 01일 특0162259 1998년 08월 29일
(21) 출원번호 (22) 출원일자 번역문제출일자 (86) 국제출원번호 (86) 국제출원일자 (81) 지정국	특 1992-701323 1992년 06월 04일 1992년 06월 04일 PCT/US 90/06972 1990년 10월 04일 국내특허 : 오스트레일리아 브라질 덴마크 핀란드 일본 대한민국 노르웨이	(65) 공개번호 (43) 공개일자 (87) 국제공개번호 (87) 국제공개일자
(30) 우선권주장 (73) 특허권자 (72) 발명자 (74) 대리인	446,546 1989년 12월 05일 미국(US) 임유노메딕스 인코포레이티드 미합중국 뉴저지 07950 모리스 프레인스 아메리칸 로오드 300 골덴버그, 데이비드 엠 미합중국 뉴저지 07078 슛 힐스 롱 힐 드라이브 397 한센, 한스 존 미합중국 뉴저지 08087 미스틱 아일랜드 노쓰 버지이 드라이브 2617 윤동열	특 1992-703110 1992년 12월 17일 W0 91/07987 1991년 06월 13일 노르웨이

심사관 : 류종훈

(54) 감염성 병변 및 염증성 병변을 검출 및 치료하기 위한 키메라 항체

요약

본 발명의 백혈구 유착 병소를 타게팅하기 위한 키메라 항체-시약 접합체는 과립구에 특이적으로 결합하는 항원-결합 추가변 영역 및 인간 단핵 림포이드 세포상의 수용체에 대한 친화력이 높은 Fc 부위를 갖는 인간 면역글로불린의 불변 영역을 함유하며, 적어도 하나의 진단제 또는 치료제에 접합되어 있다. 염증 또는 감염 병소에 영상화제 또는 치료제를 타게팅하는 방법은 타게팅에 유효한 양의 상기 키메라 항체-백혈구 접합체를 포유동물에게 비경구적으로 투여하는 것을 특징으로 한다.

명세서

[발명의 명칭]

감염성 병변 및 염증성 병변을 검출 및 치료하기 위한 키메라 항체

[기술분야]

본 발명은 키메라 항체 및 이 항체를 이용하여 적어도 하나의 진단제 또는 치료제를 염증성 또는 감염성 병변에 타게팅시키는 방법에 관한 것이다. 이 키메라 항체는 인간 과립구상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원-결합 가변 영역 (antigen-binding variable region) 및 인간 단핵 림포이드 세포상의 수용체에 대해 높은 친화성이 있는 Fc 부위를 갖는 불변 영역(constant region)을 포함한다. 이러한 키메라 항체는 감염 부위나 염증 부위에 타게팅시키기 위한 적절한 진단용 표지 또는 치료제에 결합되어 있다.

[배경기술]

육안으로 안 보이는 감염 및 염증을 검출하는데 있어서 방사성 핵종으로 표시화된 과립구가 갖는 가치가 얼마전부터 인식되어 오고 있다. 각종의 In-111염 또는 In-111 우리 리간드와 함께 보온시킴으로써 과립구, 단핵 혈구 및 혈소판 등을 표지화하고 있는데, 이 방법은 표지화하기 전에 혈액으로부터 세포를 분리해야 하기 때문에 노력과 시간이 많이 소모된다.

최근에는, 예비 표지화한 과립구 대신에, 방사능 표지된 쥐과 동물의 항-과립구 항체도 역시 눈에 보이지 않는 감염을 영상화하는데 효과적이라는 것이 입증되고 있다. 이 표지화 항체는 세포를 분리하는 작업을 할 필요없이 직접 혈관계 내에 주입할 수 있다.

본 명세서에 그 전체가 참고용으로 삽입되어 있는 미국 특허 4,634,586호(Goodwin et al.)에서는, 항-백혈구 단특이적 항체와 감마선 방출의 방사성 금속 킬레이트와의 면역반응성 비(非)유코시딘 접합체를 환자에게 주입하고, 접합체가 백혈구에 집중되기를 기다린 후, 환자에게 접합체에 대한 항체를 주입하여 집중화 되지 않은 배경 접합체를 혈액으로부터 제거하고(clear) 신틸레이션 스캐닝에 의해 백혈구를 가시화(可視化)함으로써 백혈구를 방사면역영상화시키고 있다.

또한 눈에 보이지 않는 감염 및 염증을 영상화하는데 방사능표지화된 인간의 다클론성 IgG를 사용할 수

있다는 것도 알려져 있다. 이들 항체는 방사능표지화된 IgG의 부차 집단중의 Fc 부위와 질병 부위에 존재하는 단핵 세포와의 상호작용에 의해 감염 및 염증에 집중되는 것으로 보인다.

눈에 보이지 않는 감염이나 염증을 검출하기 위해 과립구에 대한 항체를 사용함에 있어 그 실용화를 제한하고 있는 문제점은, 질병이 진행되면 병변내의 과립구 집단이 감소되고 대신 Fc 수용체에 대해 높은 친화력을 갖는 것으로 나타나는 단핵 림포이드 세포(mononuclear lymphoid cells, MLC), 즉 단구, T-세포, B-세포 및/또는 비특이적 킬러 세포(NK-세포류)로 대체된다는 사실이다. MLC에 대한 과립구의 비율도 또한 병변을 일으키는 감염제의 종류의 함수로서 현저하게 변화한다. 따라서, 항-과립구 항체는 감염 후기 단계를 영상화하는데 있어서는 초기의 보다 급성인 단계에서처럼 효과적이지 못하고, 또는 다른 이유 때문에 과립구 농도가 낮은 병변을 영상화하는 데에도 효과적이지 않다.

나아가, 비특이적 IgG도 특정 종류의 암에서는 집중화되는 것이 밝혀져 있기 때문에 (예를 들면, Rubin et al., N. Eng. J. Med., 321 : 935~940, 1989), 본 발명이 접합체의 과립구 특이성을 이용하면 암 병변과 암이 아닌 병변을 보다 잘 구별할 수 있게 된다.

종래 기술에서는 표적 대 배경의 비가 낮았기 때문에 백혈구의 영상화 기술이 상당히 제한을 받아왔다. 집중화 비율은 예를 들면 이차항체 정화법(second antibody clearance)을 이용하여 증가시킬 수 있다는 것이 밝혀져 있다. 그러나, 각각의 타게팅 항체가 통상 특정 백혈구 세포 타입, 즉 과립구, 단구, B-림파구 타입이나 T-림파구 타입의 세포에 결합하기 때문에 항-백혈구 항체를 사용하는 경우에는 표적 대 배경의 비가 계속 문제로 남는다. 따라서, 감염이나 염증의 부위에 특정 백혈구 세포 타입이 유의할만한 수준으로 존재하지 않기 때문에, 배경중에는 특정 백혈구 세포에 대해 매우 반응성이 크며 특이적인, 표적 부위에 결합하지 않은 많은 항체가 존재하게 된다.

상술한 문제점에 대한 한가지 해결책이, 본 발명에 그 전체가 참고용으로 삽입되어 있고, 공동 계속중이며 본 출원에서와 동일한 출원인에게 양도되어 있는 한센등(Hansen et al.)의 미국특허출원 제07/226,180호(1988년 7월 29일 출원)(1990년 5월 15일에 미국특허 제4,925,648호로 발행)에 개시되어 있다. 이 특허출원은 한 타입 이상의 백혈구에 대해 친화력을 갖는 다특이성 항체 복합 접합체를 개시하고 있다. 이러한 접합체를 이용하여 타게팅된 진단제 또는 치료제는 병변 부위에서 우세를 점하고 있는 특정 타입의 백혈구에 덜 의존적으로 병변에 집중화된다.

이러한 문제점에 대해 다른 선택적이거나 또는 보다 확장된 해결책에 대한 요구가 있어왔다.

[발명의 상세한 설명]

[발명의 목적]

본 발명의 한가지 목적은 과립구에 특이적으로 결합하고 또한 여러 타입의 백혈구에 선택적으로 결합하며, 감염 및 염증 병변을 타게팅 하는데 사용할 수 있는 키메라 항체-시약 접합체를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 증강된 표적 대 배경의 비율로써 진단제 또는 치료제를 감염 및 염증 병변에 타게팅 시키는 방법을 제공하는 것이다.

그외 본 발명의 다른 목적들은 다음의 설명으로부터 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 보다 잘 인식될 것이다.

[발명의 개요]

상술한 그리고 그외 본 발명의 다른 목적들은, 과립구에 특이적으로 결합하는 항원-결합 추가변(hypervariable) 영역과 인간 단핵 림포이드 세포에 대해 높은 친화력을 갖는 Fc 부위를 갖는 인간 면역글로불린의 불변(constant)영역을 포함하며, 적어도 하나의 진단제 또는 치료제에 접합되어 있는 재조합 키메라를 함유함을 특징으로 하는, 백혈구 유착 병소를 타게팅하기 위한 키메라 항체-시약 접합체를 제공함으로써 달성된다.

본 발명은 또한 타게팅에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 상기 키메라 항체-시약 접합체를 포유동물에게 비경구적으로 주입함을 특징으로 하는 진단제 또는 치료제를 감염이나 염증 병변에 타게팅시키는 방법을 제공한다.

덧붙여, 본 발명은 상기 방법을 실시하는데 사용하기 위한 멸균 주사제제 및 키트(kit)를 제공한다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 백혈구 유착 병소를 타게팅하기 위해 키메라 항체-시약 접합체를 사용함으로써 선행기술인 구드윈등의 영상화 방법을 개량하고 한센등의 특허출원 07/226,180호(1990년 5월 15일에 미국특허 제4,925,648호로 발행)의 방법을 확장하였다.

감염 또는 염증 병변의 발전단계에 포함되어 있는 T-세포, B-세포, 과립구 및 단구는, 종종 병변의 발달을 유발시킨 시약의 특성 및/또는 병변의 연령에 따라 감염 또는 염증부위에서 현저하게 상이한 비율로 존재한다. 구드윈이 교시한대로 단특이성 항체를 사용하면, 병변 부위의 백혈구 집단중 일부만이 타게팅 항체와 결합하는 경우에는 병변의 타게팅이 불충분해지고, 이는 또한 표적 대 배경의 비율 (또한 집중화율(localization ratio)이라고도 한다)을 감소시키게 된다. 여러 백혈구 특이성을 갖는 항체의 혼합물을 사용하면, 옳은 비율의 특이성을 이용하는 경우에는 주입된 시약량중 표적 부위에 도달하는 비율을 약간 향상시킬 수 있긴 하지만, 이는 또한 병변이 주로 단일 백혈구 세포 타입을 함유하는 경우에는 비교적 백혈구에 대한 결합을 증가시킬 수도 있다.

본 발명은 적어도 두가지의 다른 백혈구 타입에 결합할 수 있는 키메라 타게팅 항체를 사용함으로써 이러한 딜레마를 해결하였다.

이에 의하여 항체-시약 접합체중의 영상화제 성분은 각종 타입의 백혈구의 비율에 관계없이, 보다 높은

효율 및 증강된 표적 대 배경의 비율로써 표적 부위에 집중화된다.

본 발명의 항체-시약 접합체의 키메라 타게팅 항체 성분은 지금은 당업계에 주지되어 있는 수많은 여러 기술에 의해 만들 수 있다.

항-과립구 단클론성 항체(monoclonal antibodies, Mab)는 인간이외의 포유동물, 예를들면, 생쥐, 쥐, 토끼, 영소등에서 생산할 수 있으며, 이러한 Mab의 추가변성 도메인의 전부, 그러나 바람직하게는 필수적인 항원-결합 영역만을 코딩하는 분리된 DNA가 인간 면역글로불린의 나머지 부분을 코딩하는 DNA에 삽입되어 있다. 이러한 키메라 인간 Mab의 생산은 포유동물 Mab의 하나 또는 둘 모두의 중(重) 및 경(輕) 가변성 영역의 전부나 일부를 코딩하는 DNA 서열을 절취해내고 이것을 그 영역이 결손된 인간 면역 글로불린 DNA에 공지 방법에 의해 도입시키는 과정을 포함한다. 이어서 분리된 이 DNA를 적절한 벡터내에 클로닝하고 숙주세포, 예를 들면 이. 콜리 또는 배양된 포유동물의 골수종 세포내에서 형질발현시킨 후, 과립구에 결합하는 키메라 인간 Mab를 생산하는 것에 기초하여 선별할 수 있다. 이러한 Mab는 이. 콜리(예를들면, Riechmann et al., Nature, 332:323~327, 1988; Ward et al., Nature, 341 : 544~546, 1986) 또는 형질감염된 쥐과 동물의 골수종 세포(예를 들면, Morrison, Science, 229 : 1202~1210, 1986; Sahagan et al., Biotechnol., 7:799-804, 1989; Nakatani et al., Biotechnol., 7: 805-810, 1989) 같은 세포내에서 공지된 방법(예를들면, Ausubel et al., Eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Wiley Interscience, New York, 1987, 1989, § § 1.1~6.8)을 이용하여 발현시킬 수 있다.

과립구 에피토프를 인식하고 거기에 결합되는 Mab는 시판되는 것을 구입하거나 또는 코올러(Kohler, B.)와 밀스타인(Milstein, C.)이 최초로 기술하였고(C., Nature (1975), 256 : 495~497), 케네트(Kennet, T. J.)등이 충분히 검토한 (Monoclonal Antibodies, Plenum (1980)) 체세포 하이브리드화 기술로 제조할 수 있다. 인간 과립구 항원에 대한 항체는 숙주, 예를 들면 생쥐, 토끼, 영소, 바분 또는 다른 포유동물 종에 인간 과립구 또는 그로부터 얻은 막 제제를 접종시켜 제조할 수 있다. 면역화된 숙주로부터 비세포(脾細胞)를 취하여 상기 체세포 하이브리드화 기술을 이용하여 적절한 골수종 세포와 융합시켜 항-과립구 항체를 생산하는 하이브리도마를 생산할 수 있다. 이들 하이브리도마는 분리하여 서브클로닝한 후 배양시켜 단클론성 항체를 생산할 수 있다.

몇몇 항-과립구 Mab는 시판되는 것을 구입할 수 있다. 예를 들면, 임뮤노텍크사(Immunotech, 프랑스 마르세이유 소재, 미국의 펠 프리즈, 브라운 디어, 위스콘신을 비롯한 전세계적 판매망을 갖고 있음)의 카타로그에는 시판되는 항-과립구 Mab가 열거되어 있는데, 이들중 많은 수가 본 발명에 따른 키메라 항체를 제조하는 데 적절히 이용할 수 있는 것들이다. 어떤 항체들은 하나 이상의 타입의 백혈구, 예를 들면 단구와 과립구, B-세포와 과립구, T-세포와 과립구에 공통적인 에피토프에 결합한다. 임뮤노텍크사에 의해 생산 및 판매되고 있는 항체들은 다른 곳에서 구입할 수 있는 클론에서 얻어지는 다른 항체들과 유사하다. 본 발명에 따른 접합체를 제조하기 위해 사용되는 적절한 항체는 종이나 Ig 분류에 의해 제한되는 것은 아니지만, 시판되는 항-과립구 Mab는 전형적으로는 쥐과에서 유래된 것이며 전형적으로는 IgG 또는 IgM이다.

특정 항-T-세포 항체, 특히 단구와 과립구 항원 모두에 결합되는 항체, 즉 CDW14 항원에 결합하는 단클론성 항체가 본 발명에서 유리하다. CD 항원은 특정 백혈구 특이성을 갖는 항체를 정의하는 백혈구 결정 인자이다. 동일한 CD 항원상의 동일한 에피토프에 결합하는 한 쌍의 항체는 동일한 백혈구 세포 타입에 교차 불특정 결합할 것이다. 과립구와 예를 들면 T-세포, B-세포, NK-세포 및/또는 단구에 공통적인 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 추가변성 영역을 이용하여 다특이성 키메라 항체를 생산할 수 있으리라 생각된다. 그러나, 그 원리는 과립구(및 또한 임의로 단구, T-세포, B-세포 및/또는 NK-세포)를 표적으로 하는 항체, 및 Fc부위 또는 MLC상의 수용체에 대해 높은 친화력을 갖는 Fc부위의 단백질 단편으로부터 얻은 특이적 항원 결합 영역을 단일 키메라 항체에 삽입시키는 것과 동일하다. 생성된 타게팅 키메라 항체는 단일 타게팅 분자내에 있는 복수개의 결합 특이성 때문만이 아니라 복수개의 여러 다양한 양의 임파구가 있는 병변에 타게팅되기 때문에 감염이나 염증의 병소를 보다 효과적으로 타게팅하고, 주입된 타게팅 접합체중 병변부위 근처에 있는 정상 조직중에 존재하는 백혈구에 기인하는 비병소 배경에 남아 있게 되는 접합체의 비율이 낮아지게 된다.

상술한 재조합 키메라 항체를 제조하기 위해 과립구에 대한 상당한 결합 친화력을 갖는 단편을 유전자로부터 절취해내고, MLC상의 수용체에 대해 높은 친화력을 갖는 단편을 수집하여 실질적으로 키메라 항체와 균등한 타게팅 기능을 갖는 보다 작은 단백질로 발현시키는 것은 당업자에게 공지된 기술이다. 이러한 트림 키메라 단백질(trimmed chimeric proteins)은 본 발명에서 사용되는 용어인 키메라 항체의 범주에 포함된다.

과립구와 기타 백혈구에 대해 높은 결합 친화력을 갖는 면역글로불린-유사 단백질을 코딩하는 유전자 단편들과, 인간 면역글로불린 이디오타입 또는 이소타입의 하나 이상의 수용체-결합 Fc 단백질 서열을 코딩하는 단편과를 진단제 및/또는 치료제를 감염 또는 염증 병소로 옮기기 위한 다특이성(즉, 삼(3) 특이성 또는 그 이상의 특이성)타게팅 분자의 발현을 통제하는 단일 재조합 DNA 내에 결합시킬 수 있다.

키메라 항체를 만드는데 사용되는 DNA는, 인간 면역글로불린-생산 세포에서 유래될 수 있는데, 이들 세포는 예를 들면 면역형광법으로 검사했을 때 인간 MLC상의 수용체에 대해 높은 친화력을 갖는 면역글로불린을 생산하는 것으로 알려진 것이면 어느 것이든 무방하다. MLC에 대해 높은 친화력을 갖는 다클론성 인간 항혈청이 알려져 있다. Fishman et al., J. Nucl. Med., 30 : 1095~1100, 1989 ; Rubin et al., J. Nuc. Med., 30 ; 385~389, 1989 참조. 이러한 항혈청은 MLC가 결합된 친화력 컬럼에 통과시켜 더 정제된 후 회수 및 분리할 수 있다.

본 발명에서 키메라 인간 또는 인간화된(humanized) 항체를 사용하게 된 것은 특정의 인간 면역글로불린 이소타입의 Fc 영역중에 인간 단핵 림포이드 세포의 특정 집단 또는 부차집단에 있는 Fc 수용체에 대해 높은 결합 친화력을 나타내는 영역들이 있다는 것을 발견했기 때문이다. 이상적으로는, 이러한 목적을 위해 전체가 모두 인간의 것인 단클론성 항-과립구 항체를 사용하여야 하지만, 당업계의 현재 기술 상태로는 안정한 인간 단클론성 항체-생산 세포주를 생산하는 것이 어렵고 또한 종종 신뢰성이 떨어진다.

그럼에도 불구하고, 장래의 기술발달에 의해 이러한 인간 단클론성 항체의 생산이 가능해지고 신뢰성 있는 것으로 될 수 있을 것이며, 이러한 단클론성 항체들은 본 발명에 따른 접합체의 생산을 위해 키메라 항체와 균등한 것으로 인식되어야만 할 것이다.

인간 Mab를 제조하기 위한 현존하는 방법중 한 가지에 따르면, 생쥐에 존재하는 인간 림포이드 세포를 과민면역화 하기 위하여, 인간 과립구 전체 또는 바람직하게는 이러한 세포에서 얻은 막 성분 분획중 어느 하나를 인간 림포이드 세포로 재집단화시킨 중증 복합 면역 결핍증(severe-combined immunodeficient, SCID)이 있는 생쥐에 7도입시킨다. 예를 들면 Mosier et al., Nature, 335 : 256~9(1998)참조. 과민면역화된 세포를 이어서 분리한 후, 예를 들면 엡스타인-바르 바이러스(EBV) 감염에 의해 불사화(不死化)세포로서 배양한 인간 골수종 세포에 융합시켜 하이브리도마를 만들 수 있다. 예를 들면 James et al., J. Immunol, Meth., 100 : 5~40(1987)참조. 생성된 하이브리도마를 예를 들면 유동 세포측정기를 이용하여 스크리닝하여 인간 과립구에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 선택한다. 일단 유용한 양의 항-과립구 Mab를 생산하는 하이브리도마가 선택되면, 공지 방법에 의해 약학적으로 허용되는 Mab를 정제 및 회수하는 근원으로서 배양 상층액을 사용한다. 이러한 기술이나 그 변형예에 의해서 안정한 인간 Mab를 제조할 수 있는 한도내에서는, 이 Mab는 본 발명에 따른 접합체의 적절한 타게팅 성분이 될 것이다.

본 발명의 키메라 접합체를 만드는데 사용되는 항체의 면역학적 프로필을 조절하여 감염이나 염증 병변에 최적의상태로 결합되고 표적이 아닌 부위에는 최소한으로 결합되는 것을 보장할 수 있다. 접합체를 사용하고자 하는 진단이나 치료 용도에 따라, 백혈구 세포 타입 특이성, 항원 특이성 및 특정 세포 타입에 존재하는 항원상의 에피토프에 대한 특이성의 조합 뿐만 아니라 표적 항원 및/또는 세포 타입에 대한 결합 상수등의 조합을 사용하여 본 발명에 따른 시약의 선택성 및 타게팅 효율을 정교하게 조절할 수 있다. 이점은 환자의 비용을 최소화할 뿐만 아니라 환자에게 조사하는 방사선 량을 최소화할 수 있는 점에서 유리한데, 이는 방사선면역치료법에 있어서 중요하다.

일반적으로, 상당히 높은 면역반응성, 즉 적어도 약 10^5 /몰, 바람직하게는 적어도 약 10^7 /몰의 결합 상수 및 높은 면역특이성, 즉 적어도 약 40%, 바람직하게는 적어도 약 60%, 보다 바람직하게는 적어도 약 70~95%의 과립구 에피토프에 대한 면역 특이성을 갖는 키메라 항체를 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명에 있어서, 특정 용도에 있어서는 조금은 낮은 결합 상수를 갖는 항체를 사용하는 것이 바람직할 수도 있다. 높은 결합 상수를 갖는 항체는 감염 또는 염증 부위에 있는 백혈구 뿐만 아니라, 순환계, 골수 및 정상 조직에 있는 백혈구에 대해서도 단단하게 결합하는 것 같다. 한편, 낮은 결합 상수를 갖는 항체는 양작용(量作用)효과에 의해 병변 부위에 집중되어 있는 백혈구 병소에 주로 유착되는 경향을 갖는다. 이러한 것은 영상화 표지가 미리 제거되거나 표적이 아닌 곳에 유착되는 것을 감소시키며, 후술하는 치료학적 응용에서는 치료제가 미리 제거되거나 표적이 아닌 곳에 유착되는 것을 감소시킴으로써 병변을 유효하게 타게팅하는 양을 증가시킨다.

본 발명에 따른 키메라 항체 접합체는 유리하게는 골수염을 진단 및 치료하기 위하여 단구 및 과립구에 : 만성 감염을 진단 및 치료하기 위하여 T-세포, B-세포, 단구 또는 과립구에 : 원인이 알려지지 않은 열, 예를 들면 육아종증 감염, 결절의 병변, 진균 감염 등을 치료하기 위하여 Ia(dr)조직 적합 항원 및 과립구에 타게팅될 수 있다.

표적 부위는 감염성 병변, 염증성 침사 또는 비교적 집중된 병소에 존재하는 백혈구를 갖는 눈에 보이지 않는 병변일 수 있다. 백혈구를 함유하는 병변의 집중하는 항체-시약 접합체가 비경구적으로 투여되는 때에 병변에 존재하던 백혈구와 항체-시약 접합체와의 반응을 통하여 직접 일어날 뿐만 아니라 표지화된 백혈구가 병변에 들어감으로써 일어날 수도 있다.

키메라 타게팅 항체는 진단용 영상화제로 사용되는 신틸레이션 그래프 영상화제 또는 자기 공명 증강제 용의 방사성 동위원소로 표지화하거나 또는 접합시키거나 또는 접합되도록 변형시킬 수 있다. 적절한 영상화 방사성 동위원소로는 감마선 방출원소, 양전자 방출원소 및 X-선 방출원소 등이 포함된다. 항체를 표지화하는데 적합하면서도 편리한 방사성 동위원소로 요오드-131, 요오드-123, 인듐-111, 갈륨-67, 테크네튬-99m 및 볼소-180이 포함되는데, 이들에만 국한된 것은 아니다.

생체내에서 사용하기 위하여 단백질을 표지화하는데 적절한 통상의 방사능표지화법이면 어느 것이나 일반적으로 키메라 항체를 표지화하는데 적합하다. 표지화는 공지의 기술이나 보다 더 정밀한 방법을 이용하여 예를 들면 할로겐 또는 금속이온의 방사성 동위원소로 직접 표지화하거나, 또는 방사성금속 또는 강자성 이온용의 킬레이터를 부착시킴으로써 행할 수 있다. 이러한 킬레이터 및 이들을 항체에 부착시키는 방법은 당업자에게 주지되어 있으며, 예를 들면 Childs et al., J. Nuc. Med., 26:293(1985) ; 및 Goldenberg의 미국특허 4,331,647호, 4,348,376호, 4,361,544호, 4,468,457호, 4,444,744호 및 4,624,846호에 개시되어 있다. 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 및 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DPTA)가 전형적인 것이다. 이들은 전형적으로 측쇄에 작용기를 갖는데 이것에 의해 킬레이터가 항체에 부착될 수 있다. 또는 공지방법으로 킬레이터상의 카르복실기나 아민기를 활성화한 후 키메라 항체에 결합시킬 수도 있다. 예를 들면, Ga-67용 킬레이터인 데페록사민은 유리 아민기를 갖는데, 이 유리아민기를 적절한 링커로 활성화시켜 활성화카르복실, 이소티오시아네이트등의 기능을 갖게 한 후 항체의 아민을 결합시킬 수 있다.

킬레이터는 항체에 있는 하나 이상의 작용기, 예를들면 아민, 카르복실, 페닐, 티올 또는 히드록실기에 직접 결합하므로써 또는 짧거나 긴 사슬링커 부위를 통하여 키메라 항체에 결합할 수 있다. 각종의 통상의 링커를 사용할 수 있는데, 예를 들면 디아소시아네이트, 디아소티오시아네이트, 카르보디이미드, 비스-히드록시숙신이미드 에스테르, 말레이미드-히드록시숙신이미드 에스테르, 글루타르알데히드등이 있으며, 바람직하게는 미국특허 4,680,338호에 개시되어 있는 무수물-이소티오시아네이트 링커 같은 선택적 서열성 링커이다.

요오드-131(I-131) 또는 요오드-123(I-123)으로 표지화하는 것은, 예를 들면 그린우드등 [Greenwood et

al., Biochem. J., 89, 114(1963)]에 의해 보고되고 맥코나히등 [McConahey et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 29, 185(1969)]에 의해 변형된 방법대로, 방사성 요오드칼륨 또는 요오드 나트륨과 항체와의 혼합물을 클로라민-T로 처리하는 산화적 방법을 이용하여 쉽게 실시할 수 있다. 이 방법에 의하면, 시약의 비율 및 반응조건에 따라, 항체 분자상의 수소원자, 아마도 티로신 잔기에 있거나, 또 트립토판과 심지어 페닐알라닌 잔기에 있을 수도 있는 수소원자가 직접 요오드 원자로 치환된다. 또는 페테아누[Feteanu, 상동 문헌, p303]의 논문 및 거기에 언급된 참고문헌에 기재된 대로 팩토퍼옥시다제 요오드화법을 사용할 수도 있다.

좀더 진전된 표지화 방법은 현재 출원중인 미국특허출원 742,436호 (85년 6월 7일 출원; 89년 4월 25일자로 미국특허 4,824,659호로 발생), 084,544호(87년 8월 12일 출원) 및 176,421호(88년 4월 1일 출원; 91년 10월 29일에 미국특허 제5,061,641호로 발행)에 개시되어 있다. 상기한 모든 특허와 특허출원의 개시내용은 본 명세서의 그 전체가 참고용으로 삽입되어 있다. 광범위한 표지화 기술이 페테아누의 문헌[Labeled Antiodies in Biology and Medicine, p. 214~309, McGraw-Hill Int. Book Co., New York et al., 1978]에 개시되어 있다. 각종 금속 방사성 동위원소를 도입하는 것은 공지기술 [Wagner et al., J. Nucl. Med., 20,428(1979); Sundberg et al., J. Med. Chem., 17, 1304(1974); 및 Saha et al., J. Nucl. Med., 20,428(1979) : Sundberg et al., J. Med. Chem., 17, 1304(1974) : 및 Saha et al., J. Nucl. Med., 6,542(1976)]에 따라 행할 수 있다. 상기한 것은 당업자에게 알려진 단백질을 방사선표지화하는 많은 방법중에서 단지 예시한 것에 불과하다.

MRI 영상 증강에 유용한 화합물의 예에는 강자성 이온, 예를 들면 Gd(III), Eu(III), Dy(II), Pr(III), Pa(IV), Mn(II), Cr(III), Co(III), Fe(III), Cu(II), Ni(II), Ti(III) 및 V(VI)이온, 또는 니트록사이드 등의 라디칼이 포함되며, 이들은 강자성이온 킬레이터를 갖는 기질에 결합되거나, 이온의 경우에는 SH, NH₂, COOH 같이 노출된 킬레이트 작용기에 결합되거나, 또는 라디칼 결합물의 경우에는 링커에 결합된다. MRI 증강제는 합리적으로 도달할 수 있으며 환자의 안전과 기기의 설계에 적합한 크기의 자기장을 이용하여, 외부 카메라로 검출할 수 있기에 충분한 양으로 존재하여야만 한다. 이러한 시약에 대한 필요조건은 매질중의 물분자에 영향을 주는 시약과 관련된 분양에 주지되어 있으며, 예를 들면 문헌 [Pykett, Scientific American, 246 : 78(1982) : 및 Runge et al., Am. J. Radiol., 141 : 1209(1987)]에 개시되어 있다.

금속을 직접 또는 킬레이트의 형태로서 항체에 도입시키는 방법중 많은 방법들이 본 발명의 키메라 항체에 MRI 시약을 도입시켜 감염성 병변용 영상화제를 제조하는데 적합하다. MRI 시약은 유리하게는 영상을 증강시키기 위하여 다수의 강자성 이온 또는 라디칼을 가져야 한다. 이러한 이온을 다수 도입시키는 한 가지 방법은 담체 고분자와 킬레이터를 로딩하고 담체를 항체에, 바람직하게는 키메라의 환원 결합부위와 Fc수용체 결합부위로부터 먼 곳에 부위 특이적으로 결합시키는 것이다. 이 방법은 항체상의 적은 부위에 더 많은 수의 킬레이터를 부착시켜서 면역 반응성을 심각하게 상쇄시키지 않는 장점을 갖는다. 항체에 킬레이터를 로딩시키는데 유용한 고분자의 예로는 폴리올류, 다당류, 펩티드류등이 포함된다. 미국특허 4,699,784호(Shih et al.) 및 4,046,722호(Rowland)참조. 다당류중 한 종류는 덱스트란이다. 킬레이트는 덱스트란 히드록실기에 대한 반응성기, 예를 들면 무수물, 이소시아나이드 또는 이소티오시아나이드등을 포함하도록 관능화할 수 있다. 또는, 덱스트란을 수많은 방법, 예를 들면 아미노덱스트란으로 전환시키는 방법 등에 의해 유도체화할 수 있다. 이하에 보다 상세히 논의하는 바와 같이, 다수의 약제 분자를 항체 또는 항체 복합체에 로딩시키는데 있어서 유사한 방법들이 유용하다는 것이 드러난다.

아미노덱스트란(AD) 담체를 갖는 항체 접합체를 제조하는 방법은 통상 덱스트란 고분자, 유리하게는 평균 분자량(MW)이 약 10,000~100,000 바람직하게는 약 10,000~40,000 그리고 보다 바람직하게는 약 15,000인 덱스트란으로부터 출발한다. 이 덱스트란을 산화제와 반응시켜 그 탄수화물 고리중 일부를 통해 산화시켜 알데히드기를 생성시킨다. 산화반응은 통상의 방법에 따른 예를 들면 NaIO₄등의 글리콜 첨가분해성 화학시약을 이용하여 통상적으로 실시된다.

분자량이 약 40,000이며 다른 분자량의 덱스트란과 대략 동일한 알데히드기 비율을 갖는 덱스트란의 경우, 약 50~150, 바람직하게는 100 알데히드기가 생성되도록 산화제의 양을 조절하는 것이 편리하다. 알데히드기의 수가 많을수록, 그에 따라 아민기의 수가 많아질수록 덜 유리한데 그 이유는 아민기의 수가 많으면 고분자가 폴리아민처럼 행동하기 때문이다. 수가 적은 경우에도 킬레이트나 봉소 부가물의 로딩이 덜 유리하게 이루어지는 결과를 낳는다.

산화된 덱스트란을 폴리아민, 바람직하게는 디아민, 그리고 보다 바람직하게는 모노-또는 폴리-히드록시디아민과 반응시킨다. 적절한 아민의 예에는 예를 들면 에틸렌디아민, 프로필렌디아민 또는 유사한 폴리메틸렌디아민, 디에틸렌트리아민 또는 유사한 폴리아민, 1,3-디아미노-2-히드록시프로판 또는 기타 유사한 히드록실화 디아민 또는 폴리아민등이 포함된다. 알데히드 작용기가 실질적으로 완전히 쉬프 염기(이민기)로 전환되도록 하기 위하여 알데히드기에 대해 과량의 아민을 사용할 수 있다.

생성된 쉬프 염기 중간체는 환원제, 예를 들면 NaBH₄, NaBH₃CN 등과 반응시켜 환원시킴으로써 안정화할 수 있다. 이민기가 실질적으로 완전히 이차 아민기로 환원되고 반응되지 않은 알데히드기가 히드록실기로 환원되도록 하기 위하여 과량의 환원제가 사용된다. 생성된 부가물은 통상의 크기 컬럼에 통과시켜 교차-결합된 덱스트란을 제거함으로써 더 정제시킬 수 있다. 칭량한 AD 시료를 트리니트로벤젠설포산과 반응시키고 420nm에서의 광학 밀도를 표준값을 이용하여 보정함으로써 AD상에 있는 사용가능한 아미노기의 수를 계산해낼 수 있다. 이 방법에 의하면 통상은 AD 상에 있는 계산된 수치의 알데히드기가 실질적으로 완전히 이차 아민기로 전환된다.

또는, 예를 들면, 덱스트란을 브롬화 시아노겐과 반응시킨 후 디아민과 반응시킴으로써 아민기를 도입시키는 통상의 방법으로 덱스트란을 유도체화할 수 있다. AD는 활성화된 형태, 바람직하게는 예를 들면 디시클로헥실카르보디이미드(DCC) 또는 그의 수용성 변형체를 이용하는 통상의 방법에 의해 제조된 카르복실-활성화 유도체 형태의 특정 약제 또는 킬레이터 유도체와 반응시켜야만 한다.

본 발명의 신틸레이션 그래픽 영상화 방법은 신틸레이션 그래픽 영상화에 유효한 양의 방사능 표지화된 키메라 항-백혈구 항체를 포유동물, 바람직하게는 인간에게 비경구투여함으로써 실시할 수 있다. 비경구적이란 용어는 예를 들면 정맥내, 동맥내, 피질내, 근육내, 질간(質間) 또는 동내(洞內) 투여방법을 의미한다. 피투여자는 약 1mci 내지 50mci의 방사능표지화 접합체를 투여받게 되는데, 이 투여량은 방사성동위원소의 종류 및 투여방법에 의해 결정된다. 적절한 감마선 방출 동위 원소로는, 예를 들면 50~500KeV 범위에서 방출하는 방사성 동위원소의 예를 들자면 I-131, I-123, Tc-99m, In-111 및 Ga-67이다. 정맥내 투여의 경우에 그 양은, I-131의 경우에 약 2~10mci, 바람직하게는 약 2~5mci : I-123의 경우에는 약 5~10mci, 바람직하게는 약 8mci : Tc-99m의 경우에는 약 10~40mci, 바람직하게는 약 20mci : In-111 또는 Ga-67의 경우에는 약 2~5mci, 바람직하게는 약 4mci 이다.

방사능표지화된 키메라 항-백혈구 항체는 통상적으로, 백혈구를 함유하는 감염 또는 염증 병변에 신틸레이션 그래픽 영상화제를 타게팅하기 위한 포유동물용 주사제제, 바람직하게는 인체용 멸균주사제제로서 제공되며, 바람직하게는 제약학적으로 허용되는 멸균 주사 부형제, 바람직하게는 생리적 pH 및 농도를 갖는 인산염-완충 염수(PBS)에 용해시킨 방사능표지화 복합체를 유효량 함유하는 멸균 주사액이다. 비경구적으로 투여하고자 하는 부위에 따라 필요한 대로 다른 통상의 약학적으로 허용되는 부형제를 사용할 수 있다.

본 발명에 따라 제공되는 비경구 투여용의 제제로서 대표적인 예는 통상 유리하게는 예를 들면 0.9% 염화나트륨을 함유하는 0.04M 인산염 완충액(pH 7.4 : Bioware 제품) 1ml당 약 10mg의 인간 혈청 알부민(1% USP ; Parke-Davis 제품)을 함유하는 멸균 용액에 용해시킨 방사능표지화 키메라 항체를 약 0.1~20mg, 바람직하게는 약 2mg을 함유하는 것이다.

일단 충분한 양의 동위원소가 표적 부위에 침착되면, 통상의 플래너 및/또는 SPECT 감마선 카메라를 이용하거나, 또는 외부나 내부에서 사용되는 수동 감마선 카메라를 이용하여 스캐닝을 행하여 염증이 나 병변에 집중화시킨다. 신틸그램은 통상 50~500KeV 범위의 에너지를 검출하기 위한 하나 이상의 창이 있는 감마 영상화 카메라에 의해 찍힌다. 고에너지의 베타선 또는 양전자를 방출하는 방사성동위원소를 사용할 수도 있으며, 이 경우에는 적절한 검출기가 있는 영상화 카메라를 사용하여 하며, 이러한 것들은 모두 당업계에서 통상적인 것들이다.

영상화제가 방사성 동위원소가 아니라 MRI 증강제를 함유한다는 점만을 제외하면 신틸레이션 그래픽 영상화방법과 유사하게 자기공명 영상화법(MRI)을 실시한다. 자기공명 현상은 신틸레이션 그래픽법과는 다른 원리로 일어난다는 것이 알려져 있다. 보통은, 발생한 시그널은 영상화하고자 하는 영역내의 물분자의 수소원자의 핵에 있는 양성자의 자기 모멘트의 이완시간과 관련되어 있다.

자기공명 영상 증강제는 이완속도를 증강시켜 영상화제가 유착되어 있는 영역내의 물분자와 체내 다른 곳에 있는 물 분자사이의 콘트라스트를 증가시키는 작용을 한다. 그러나, 이 시약의 효과는 T_1 과 T_2 를 모두 증가시키는데, 전자는 콘트라스트를 크게하지만 후자는 콘트라스트를 작게 한다. 따라서, 이 현상은 농도-의존적이며, 통상 최고의 효율을 얻기 위한 강자성 시약의 최적의 농도가 있기 마련이다. 최적의 농도는 사용되는 시약의 종류, 영상화하는 위치, 영상화 방법, 즉 스핀-에코, 포화-회복, 전화-회복 및 기타 T_1 또는 T_2 에 매우 심하게 의존하는 영상화 기술, 및 시약이 용해 또는 현탁되어 있는 매질의 조성에 따라 달라진다. 이러한 요인과 이들 요인의 상대적인 중요성은 당업계에 공지되어 있는 것들이다. 예를 들면 Pykett의 상기 기재 문헌 및 Runge et al. 의 상기 기재 문헌 참조.

본 발명의 MRI 법은 키메라 항-백혈구 항체와 MRI 증강제로 이루어진 본 발명의 접합체를 자기공명 영상화에 유효한 양으로 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여함으로써 실시할 수 있다. 피투여자에게 투여되는 표지화 접합체의 양은 병변 부위의 MRI 시그널을 적어도 약 20%, 바람직하게는 50~500% 증강시키기에 충분한 양이며, 이 양은 강자성 시약의 종류 및 투여방법에 따라 다르다.

표지화 접합체는 편리하게는 백혈구를 함유하는 감염 또는 염증 병변에 MRI 시약을 타게팅하기 위한 포유동물용 주사제제, 바람직하게는 인체용 멸균 주사제제로서 제공되며, 바람직하게는 제약학적으로 허용되는 멸균 주사 부형제, 바람직하게는 생리적 pH 및 농도를 갖는 인산염-완충 염수(PBS)에 용해시킨 유효량의 표지화 키메라를 함유하는 멸균 주사액이다. 비경구적으로 투여하고자 하는 부위에 따라 필요한 대로 다른 통상의 약학적으로 허용되는 부형제를 사용할 수 있다.

본 발명에 따라 제공되는 비경구 투여용의 제제로서 대표적인 예는 통상 유리하게는 예를 들면 0.9% 염화나트륨을 함유하는 0.04M 인산염 완충액(pH 7.4 Bioware 제품) 1ml당 약 10mg의 인간 혈청 알부민(1% USP ; Parke-Davis 제품)을 함유하는 멸균 용액에 용해시킨 표지화 키메라 항체 약 0.1~20mg, 바람직하게는 약 2mg을 함유하는 것이다. 일단 충분한 양의 MRI 시약이 표적 부위에 침착되면, 통상의 MRI 카메라를 이용하여 스캐닝을 행하므로써 병변을 영상화한다.

본 발명의 바람직한 구현예에서는, 그 개시내용이 전체로서 본 명세서에 참고삼아 삽입되어 있는 골덴버그의 미국특허 4,624,846호에 개시되어 있는대로, 비표지화 이차 항체를 사용하여 표적에 도달하지 않고 순환하는 접합체를 소거하고 그 정화를 촉진함으로써 일차 표지화 키메라 항체-시약의 집중화율을 향상시킬 수 있다. 이 기술은 또한 후술하는 바와 같이 치료제에 접합된 키메라 항-백혈구 항체에도 비슷하게 적용할 수 있다. 집중화율이란 용어는 통상의 의미 그대로 사용되었다. 즉 타게팅된 항체 접합체 대 타게팅되지 않은 항체 접합체를 비율을 의미한다.

일반적으로, 이차 항체는 일차 항체 접합체의 집중화율을 적어도 약 20%, 그리고 전형적으로는 50% 이상 증강시킬 수 있는 양으로 사용된다.

이차 항체는 순환 접합체 및 타게팅되지 않은 접합체로부터 일차 항체 접합체보다 빠르게 정화되는 착제를 형성하기 위해 일차 항체 접합체와 결합할 수 있는 것이면 온전한 IgG 또는 IgM 또는 IgG나 IgM의 단편 일 수 있다. 바람직하게는, 이차 항체는 온전한 IgG 또는 IgM이다. 일차 항체가 IgG 또는 IgM의 단편인 경우에는 일차/이차 착제가 보체 캐스캐이드를 활성화할 수 있는 능력을 보유할 수 있도록 이차 항

체가 온전한 IgG 또는 IgM인 것이 바람직하다. 반대로, 일차 항체가 온전한 IgG인 경우에는, 이차 항체는 착체가 보체-고정화능을 보유하는 한, 단편이어도 무방하다. 일차/이차 쌍중 적어도 하나가 온전한 IgG 또는 IgM인 것이 바람직하다. IgM을 사용하는 한 가지 장점은 일차 항체 또는 이차 항체, 즉 약제, 킬레이트화제, 방사성 핵 등의 진단 및/또는 치료 성분과 고분자량 착체를 형성한다는 점이다.

이러한 착체 형성은 특히 혈액으로부터 타게팅되지 않은 일차 항체 및/또는 성분을 정화하는 비율 및 효율을 증가시킨다. 이차 항체는 상술한 골덴버그의 미국특허 4,624,846호에 기재된 방법에 따라 제조할 수 있다. 본 발명의 방법에서는 단클론성 항-종(種) IgG도 사용할 수 있는데 유리하게는 이차 항체로 사용된다. 비공속 접합체, 예를 들면 방사능요오드화된 연결기 또는 니트록사이드와 같은 유기 강자성 시약도 역시 이차 항체가 특이성을 갖는 합텐으로 사용될 수 있다.

이차 항체는 일차 항체-시약 접합체를 투여한 후 백혈구가 이들을 최대 포획할 수 있기에 충분한 시간, 전형적으로는 최초 투여후 약 2~72시간, 바람직하게는 후 투여후 약 24~48시간 후에 피투여자에게 투여된다. 일차 항체가 정맥내 투여되지 않은 경우에는, 이차 항체중 적어도 일부만이라도 동일한 비경구적 경로로 투여하는 것이 바람직하다. 그러나, 순환계에 확산되어 있는 일차 항체의 정화를 촉진하기 위하여 이차 항체중 적어도 일부만이라도 정맥내 투여하는 것이 유리하다.

순환하고 있는 표지화 일차 항체를 정화하고 일차 항체의 집중화율을 향상시키기 위한 이차 항체의 사용은 상기 골덴버그의 특허 및 그안에 인용된 참고문헌에 개시된 영상-증강 공제(image-enhancing subtraction) 기술을 이용하여 더욱 개선할 수 있다. 이 기술은 독립적인 검출을 가능하게 하는 방사 핵종으로 표지화된 미분화(未分化)한 항체 또는 단편을 사용하는 기술로서 당업계에 공지되어 있다. 이 항체는 영상화에 필요한 기간동안 일차 항체와 실질적으로 동일한 분포 역학 및 대사 역학을 갖는다. 이러한 항체의 투여는 Tc-99m-표지화 혈청 알부민 같은 통상의 공제시약보다 유리하지만, 상기 통상의 시약도 배경을 보강하여 영상 프로세싱을 향상시키는데 적합하다. 공제시약으로서 방사능표지화된 미분화 항체를 사용하면 순환계로부터 항체를 정화하는데 영향을 주는 기관의 비(非)표적 배경 방사선을 컴퓨터로 보정할 수 있다. 당업계의 통상의 지식을 가진 자는, 이차 항체가 표적이 아닌 구역에서 실질적으로 동일한 비율로 일차 단클론성 항체 및 미분화 항체 면역 글로불린을 제거할 수 있도록, 공제시약으로 사용되는 미분화 항체와 일차 키메라 항체가 동일한 종(種) 또는 골수종 세포/하이브리도마에서 유래되는 것이 바람직하다는 것을 알 것이다. 또한, 이차 항체는 일차 및 미분화 면역글로불린 항체의 불변 영역에 대해 특이성을 갖는 것이 바람직하다.

이차 항체의 도입량은 일반적으로 순환하는 일차 항체를 2~72시간내에 10~85%를 감소시킬 수 있는 양이다. 제거율에 영향을 미치는 이차 항체 대 일차 항체의 비율은 이차와 일차 항체 쌍의 결합 특성에 따라 결정된다. 적절한 비율을 정하기 위하여 시험관내에서 환자의 혈액을 미리 스크리닝할 수 있다. 예를 들면, 쥘 확산 시험에서 침전 밴드를 얻는데 필요한 이차 항체 대 일차 항체의 비율을 결정하기 위하여 스크리닝을 이용할 수 있다. 이것은, 생체내에 적용할 때 시험관내 시험에서 얻어지는 값보다 높은 이차 항체 대 일차 항체의 비율이 요구될 수도 있기 때문에, 상기 비율의 하한치의 기준으로 삼을 수 있다.

실제로, 이차 항체 대 일차 항체의 몰비율은 일반적으로 약 5~50이지만, 반드시 제한적인 것은 아니다. 일차와 이차 항체 모두가 온전한 IgG인 경우, 이차 항체 대 일차 항체의 몰비율이 15~25, 바람직하게는 20~25인 것이 유리하다는 것이 밝혀졌다.

키메라 항체는 치료제를 감염이나 염증 부위에 타게팅하기 위해 사용될 수 있다. 방사성 동위원소 또는 약제/독소 등 어느 것이든 타게팅할 수 있다. 치료에 적합한 방사성 동위원소는 통상 베타선 방출 원소, 알파입자 방출 원소 및/또는 오제 전자 방출원소이며, 구리-67, 요오드-125, 요오드-131, 레늄-186, 레늄-188, 비스무트-212, 아스타틴-211 등이 포함되는데 이들에만 국한되는 것은 아니다. 이들 방사성 동위원소와의 접합체는 당업계에 공지된 기술을 이용하여, 영상화 접합체 제조방법과 유사한 방법으로 제조할 수 있다. 이들은 가장 유리하게는 약제에 대해 내성을 나타내고 방사선치료법의 사용을 정당화할 만큼 충분히 급성이면서 쇠약한 감염증의 치료에 사용된다.

본 발명에 따라 타게팅하면 전신 치료에 비하여 방사선약학의 치료 지수를 현저하게 낮추며, 전에는 정당화할 수 없었던 이러한 형태의 치료법을 정당화할 것이다.

인간에게 감염되어 병변을 일으킬 수 있는 세포 또는 미생물에 대하여 세포 독성 효과를 갖는 많은 약제가 알려져 있다. 이들은 머크 인덱스 등과 같이 쉽게 입수할 수 있는 당업계에 주지된 약제 및 독소에 대한 이람표에 기재되어 있다. 이러한 항생물질 약제는 어느 것이든 키메라 항-백혈구 항체에 접합시켜 본 발명에 따른 치료제를 만들 수 있으며, 감염증 병변의 부위에 항생물질 약제를 타게팅시키는 것을 향상시켜 부위중의 유효 농도를 높이기 위해 이러한 접합체를 사용하는 것도 본 발명의 일부를 이룬다. 하나 이상의 항생물질 약제를 고분자 당체에 접합시킨 후 이를 다시 키메라 항체에 접합시켜 치료에 사용한다. 경우에 따라서는, 약제가 순환되고 있는 도중에 항체 접합체의 일부를 이루는 약제를 부분적으로 또는 완전히 탈독화할 수 있는데, 이렇게 하면 약제의 전신 부작용을 줄이고 약제의 전신 투여가 허용되지 않는 경우에도 약제를 사용할 수 있다. 고분자에 접합시킨 후 다시 항체에 접합된 하나 이상의 약제를 투여하면 전신 독성을 완화시키면서 치료를 행할 수 있다.

본 발명의 방법은 일차 키메라 항체를 항생물질 약제에 접합시키므로써 감염증 병변을 치료하는데에도 적용할 수 있다. 항생물질 약제를 면역글로불린에 접합시키는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면 문헌 [Drug Carriers in Biology and Medicine에 실린 O'Neill의 The Use of Antibodies as Drug Carriers, G. Gregoriadis, ed., Academic Press London, 1979; Arnon et al., Recent Results in Cancer Res. 75:236, 1980; and Moolton et al., Immunology, Res. 62:47, 1982]에 기술되어 있다. 이들 방법은 각종 병원성 미생물, 예를 들면 세균, 바이러스, 진균 및 각종 기생충에 대해 효과적인 약제를 그 생산물 또는 항원이 병변과 관련되어 있는 이들 미생물에 대항하여 발달된 항체에 커플링시키기 위해 이용되는 방법과 아주 유사하다.

이러한 항균제, 항바이러스제, 항기생충제, 항진균제 및 관련 약제, 예를 들면 설펜아미드, 페니실린, 세팔로스포린, 아미노글리코시드, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 피페라진, 클로로퀸, 디아미노피리딘, 메트로니아지드, 이소니아지드, 리팜핀, 스트렙토마이신, 설펜, 에리트로마이신, 폴리믹신, 니스타틴, 암포테리신, 5-플로오로시토신, 5-요오드-2'-데옥시우리딘, 1-아다만탄아민, 아데닌 아라비노시드, 아미니딘 및 아지도티미딘(AZT)이 적절한 특이항체들/단편과 항체/단편 복합물에 커플링시키기에 바람직하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 기타 다른 강력한 항미생물제는 굿맨등의 문헌[Goodman et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Sixth Edition, A.G. Gilman et al., eds., Macmillan Publishing Co., New York, 1098]에 열거되어 있는데 이들은 당업계에게 공지된 것들이다. 약제를 특이적 표적 부위에 타게팅하기에 적합하며 바람직한 여러 조건들은 트로우엣 등의 문헌 [Trouet et al., Targeting of Drugs, G. Gregoriadis et al., eds., Plenum Press, New York and London, 1982, pp. 19 ~30]에서 검토된 바 있는데, 이 문헌은 이러한 타게팅에 관한 임상학적 지식이 감염증 병변으로 고생하는 환자에게 도움이 되는 것을 보여준다.

상술한 바와 같은 이차 항체의 이용은 진단을 위한 영상화 접합체의 경우에서와 마찬가지로 본 발명에 따른 치료제의 효율성을 향상시킬 것이다. 치료제의 효율성은 치료 지수(therapeutic index)로 표시되는데, 이 치료지수는, 통상 사용되는 대로, 치료 효과 대 바람직하지 않은 부작용의 비율로 정의된다. 이것은 때때로 표준 모델 시스템에 있어서 정량적으로 측정된 효능 대 독성, 예를 들면 중간 치사량(LD₅₀) 대 중간 유효량(ED₅₀)의 비율로 정의되기도 한다. 본 명세서의 기술된 대로 이차 항체를 사용하면, 타게팅되지 않은 일차 항체 및/또는 이탈된 치료 성분이 정화됨으로써 항-백혈구 키메라 항체 접합체의 치료 지수가 증가한다. 치료 제제의 경우에는, 이차 항체는 상술한 대로 일차 키메라 항체에 대해 특이적일 뿐만 아니라 치료제에 대해서도 특이성을 가질 수 있다. 이차 항체는 또한 치료제용의 담체에 대해서도 특이성을 나타낼 수 있다.

본 발명에 포함되는 치료 제제는 비경구 투여에 적합한 부형약에 용해시킨, 치료학적으로 유효한 방사성 동위원소 또는 약제에 접합된 상기 키메라 항-백혈구 항체를 함유한다. 치료 제제는 또한 별도로 포장된 상술한 바와 같은 항체를 포함할 수 있다. 적절한 부형약은 당업계에게 공지되어 있으며, 예를 들면 상기에서 논의한 바 있는 진단용 영상화제의 투여에 사용되는 것들과 유사한 멸균 PBS 용액이 포함된다.

본 발명에 따른 키메라 항-백혈구 항체 영상화 접합체 및 치료 접합체는, 편리하게는 백혈구 병소를 포함하는 감염 또는 염증 병변에 항체를 타게팅하기 위한 치료용 키트 또는 진단용 키트의 형태로 제공될 수도 있다. 전형적으로 이러한 키트는 친유성 제제의 형태이거나 또는 주사용 부형약에 용해시킨 본 발명의 키메라 항체 접합체를 함유하는 바이알 ; 접합체를 신틸레이션 그래프 영상화 또는 방사선 면역치료법에 사용하고자 하는 경우에는, 본 발명의 접합체는 방사선표지화 시약 및 부속품과 함께 저온 접합체로서 제공되는데 이들은 각각 별도의 용기에 들어 있게 되며, 반면 MRI 시약과 치료제 접합체는 일반적으로 강자성 물질 또는 미리 키메라 항체에 접합시킨 항생물질과 함께 공급된다. 이 키트는 키메라 항체나 치료제, 치료제의 담체, 또는 방사능핵종 또는 강자성 이온에 대한 킬레이트화제에 대해 특이적인 비표지화 이차 항체 또는 항체 단편을 별도의 용기에 더 함유할 수 있다.

본 발명의 영상화 제제 및 방법은 적어도 In-111-표지화 백혈구를 사용하는 눈에 보이지 않는 농약을 확인하기 위한 공지의 시약만큼 효과적이며, 비용, 시약의 잠재적인 독성, 취급의 용이함, 그리고 무엇보다도 증가된 표적 특이성의 면에서 보아 통상의 시약보다 훨씬 유리하다. 본 발명의 치료제와 방법은 미생물 감염부위에 방사성 동위원소 또는 항생물질 약제를 타게팅하는 수단을 제공하여 약제 또는 방사성 동위원소의 치료지수를 개선하고, 전신 부작용을 줄이고 그 효능을 증가시킨다.

당업계의 통상의 지식을 가진 자라면, 더 이상의 설명이 없어도 전술한 논의에 의거하여 본 발명을 모든 범위까지 확장시켜 이용할 수 있으리라 믿어진다. 따라서, 하기의 바람직한 구체적인 구현에는 단지 예시일 뿐이고, 본 개시의 나머지 부분을 어떠한 방법으로도 제한하지 않는 것으로 추정되어야 한다. 하기 예에서, 모든 온도는 보정하지 않은 섭씨 온도이며, 다른 언급이 없는 한 모든 부와 백분율은 중량을 기준으로 한다.

[실시예 1]

[키메라 항-백혈구 항체]

상기한 모리슨 등(Morrison et al.)의 방법에 의해 과립구 세포에 대해 매우 높은 특이성을 갖는 쥐 단클론성 항체를 생성하는 하이브리도마에서 분리한 DNA와 그의 Fc 부위가 인간 단구의 Fc 수용체에 대해 높은 결합 친화력을 갖는 인간 IgG을 코딩하는 DNA로부터 재조합 키메라 항체를 제조하였다.

키메라 항체를 이. 콜리 세포내에서 발현시킨 후 과립구가 결합되어 있는 친화력 컬럼을 이용해 분리하였다.

키메라 항체를 방사성 동위원소 또는 MRI 증강제용 킬레이터에 임의로 접합시키거나, 아니면 상기 킬레이터 또는 약제 분자를 항체에 접합시키기 위한 보조시약으로 처리하였다.

[실시예 2]

[신틸레이션 그래프 영상화 키트]

진단용 영상화 키트는 고무 격막이 있고, 실시예 1에 따른 키메라 항체 용액의 동결건조물을 함유하는 제1멸균 바이알 : 집중화후에 순환하고 있는 표지화 복합물을 신속하게 정화하기 위한, 예를 들면 친화력 컬럼으로 정제한 도끼 항-인간 IgG인 이차항체를 함유하는 임의의 제2멸균 바이알(격막으로 밀봉) : 및 부가적으로 격막-밀봉된 멸균 바이알과, 예를 들면 I-123, In-111 또는 Tc-99m-퍼테이크네테이트로 표지화하고 표지화 접합체를 주입하기 위한 멸균 주사기를 함유한다.

[실시예 3]

[진단을 목적으로 하는 영상화]

30세된 여성 환자가 제왕절개에 의해 여자 아기를 낳은 지 일주일 후에 열이 나고 복부에 통증이 있었다. 2주간 I.V. 항생제 치료를 하였으나 발열과 복부 통증이 계속되었다. CAT 스캐닝을 실시하였으나 비정상적인 덩어리를 발견할 수 없었다. 통상의 방사성요오드화 방법과 원자로에 의해 생산한 요오드화 나트륨에 적합하도록 한 실시예 2의 키트 성분을 이용하여 직접 I-123 방사성 동위원소로 표지화한 실시예 1의 키메라 항-과립구 항체를 이용하여 면역신틸레이션 그래프법을 실시하였다. 20mci의 방사능 표지화 키메라를 주입하고, SPECT방식의 감마선 카메라를 이용하여 환자를 스캐닝하였다. 환자의 복부를 스캐닝한 결과 I-123이 응고된 병소가 관찰되었다. 수술을 하자 I-123 활성 부위에서 농양이 관찰되었다. 농양을 배액(排液)하고 병리해부한 결과 화농 물질에 단구, B-임파구 및 활성화 T-임파구 뿐만 아니라 다수의 과립구가 존재하는 것이 증명되었다. 2일후, 환자의 열과 고통이 수그러들었다.

[실시예 4]

[진단을 목적으로 하는 영상화]

시우신염의 치료를 받아온 62세 남성 환자에게 발열 및 급격한 척추의 동통이 생겼다. 척추 골수염으로 추정되었지만 척추를 방사선 촬영한 결과 정상이었다. 키메라 항체를 금속티오네인 말단 펩티드에 접합시키고 염화주석으로 예비 처리하고, 또 발전기에 의해 생산된 과테크네튬산 나트륨으로 처리한 실시예 2의 키트 성분을 이용하여 직접 Tc-99m 방사성 동위원소로 표지화한 실시예 1의 키메라 항-과립구 항체를 이용하여 면역신틸레이션 그래프법을 시행하였다. 20mci의 방사선 표지화한 키메라 항체를 주입한 후 표지화 복합물을 투여한지 24시간 후 평면 영상화 방식의 감마 카메라를 이용하여 환자를 스캐닝하였다. 스캐닝 결과, 척추가 끝나는 점 바로 위에 Tc-99m 이 많이 모여 있는 병소가 관찰되었다. 표적 부위에서 척추궁절제술을 시술하고 척수경막외강을 배액하였다. 배액된 액체의 화농성 물질을 병리해부한 결과 다수의 단핵 림포이드 세포와 소수의 과립구를 함유하는 육아 조직이 관찰되었다.

Gd(III) 이온이 로딩된 변형 디에틸레이트리아민펜타아세트산(DTPA) 킬레이트가 평균 100 분자 결합된 아미노덱스트란에 접합시킨 동일 키메라를 MRI 스캐닝에 사용하였을 때에도, 역시 다른 지역과 대조를 이루어 명확하게 윤곽이 드러나 척수 경막외강에 염증 병소가 드러나 있었다.

[실시예 5]

[치료법]

42세의 남성 AIDS 환자에게 좌우측 폐렴이 발병하여 통상의 광범위 스펙트럼 항생물질 치료에 대해 반응을 나타내지 않았다. 임상학적 진찰과 객담의 세포진단 법에 의하면 뉴모시스티스 카리니이(Pneumocystis carinii)에 의한 폐렴이 상당히 진행된 것으로 나타났으면 환자에게 극심한 호흡 장애를 일으킬 것으로 예측되었다. 과립구 항원과 단구의 Fc 수용체에 결합시킨 실시예 1의 키메라 항체를 담체에 접합된 메토크세이트인 트리메토프린(Wellcome 제품)을 평균 25분자 함유하는 분자량 약 15,000의 아미노덱스트란 담체 평균 한 분자에 상기한 시이(Shin)등의 특허방법을 채용하여 부위-특이적으로 결합시켰다. 약 25mg의 항체 접합체를 느리게 정맥내 주입시켜 치료량의 항생물질을 폐의 병변에 전달시키고, 이 조작을 3일간 연속하여 반복하였다. 이를 후 환자는 증세가 호전되고 열이 내렸으며, 이러한 증세의 호전은 3일후에 찍은 흉부 X-선 사진에 의해 확인되었다. 일반적인 지지 요법과 함께 항체-약제 접합체 치료를 행한지 2주 이내에 대부분의 폐렴이 용해되었다.

상기 실시예에서 사용된 반응물과 조작 조건을 본 발명에서 구체적으로 또는 일반적으로 기술한 반응물 및/또는 조작 조건으로 대치함으로써 상기 실시예와 비슷한 성공률로 반복할 수 있다.

당업계의 통상의 지식을 가진 자는 상기 설명으로부터 본 발명의 요지를 쉽게 확인할 수 있으며, 또한 본 발명의 취지와 범위에서 벗어나지 않고 각종의 용도 및 조건에 적합하도록 본 발명을 변화 및 변형시킬 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

백혈구 유착 병소를 타게팅하기 위한 키메라 항체-시약 접합체 (chimeric antibody-agent conjugate)로서, 상기 키메라 항체는 항원-결합 추가변 영역(antigen-binding hypervariable region) 및 인간 면역 글로불린의 불변 영역(constant region)을 갖고 있으며, 상기 항원-결합 추가변 영역은 과립구에 특이적으로 결합하는 특징을 갖고, 상기 불변 영역은 단핵 림포이드 세포상의 수용체에 대한 친화력이 높은 Fc 부위를 갖는 특징을 가지며, 상기 시약은 50-500KeV 범위의 감마선을 방출하는 방사성 동위원소, 양전자-방출 방사성 동위원소 또는 자기 공명 영상 증강제(magnetic resonance imaging enhancing agent)에서 선택된 적어도 하나의 진단용 영상화제 ; 또는 방사성 동위원소 또는 항미생물제에서 선택된 적어도 하나의 치료제임을 특징으로 하는 키메라 항체-시약 접합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 진단용 영상화제로 사용되는 방사성 동위원소는 테크네튬-99m(Tc-99m), 요오드-123(I-123), 갈륨-67(Ga-67), 인듐-111(In-111) 또는 요오드-131(I-131)에서 선택된 것임을 특징으로 하는 접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 자기 공명 영상 증강제는 가돌리늄 또는 망간 이온을 함유하는 것임을 특징으로 하는 접합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 추가변 영역이 Ia(DR) 항원에 특이적으로 접합되어 있음을 특징으로 하는 접합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 치료제로 사용되는 동위원소는 구리-67, 요오드-125, 요오드-131, 레늄-186, 레늄-188, 비스무트-212 또는 아스타틴-211에서 선택된 것임을 특징으로 하는 접합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 치료제는 방사성 동위원소와 항미생물제의 조합물(combination)임을 특징으로 하는 접합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항미생물제는 항균제, 항바이러스제, 항진균제 또는 항기생충제로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 접합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 치료제는 텍스트란 또는 아미노텍스트란에서 선택된 고분자 담체를 이용하여 상기 키메라 항체에 접합되어 있음을 특징으로 하는 접합체.

청구항 9

진단용 영상화제를 염증 또는 감염성 병변에 타게팅하는데 사용되는 조성물로서 특허청구의 범위 제1항, 2항, 3항 또는 4항에 따른 키메라 항체-시약 접합체를 함유함을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

치료제를 염증 또는 감염성 병변에 타게팅하는데 사용되는 조성물로서 특허청구의 범위 제1항, 5항, 6항, 7항 또는 8항에 따른 키메라 항체-시약 접합체를 함유함을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 키메라 항체의 추가변성 영역이 과립구의 Ia(DR) 항원에 특이적으로 결합함을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제1항, 2항, 3항 또는 4항에 있어서, 상기 접합체에 특이적으로 결합하는 비(非) 표지화된 이차 항체 또는 항체 단편을, 비경구적으로 투여할 때 2-72시간 이내에 상기 접합체의 집중화율을 적어도 약 20% 증가시키는 양으로 함께 사용함을 특징으로 하는 접합체.

청구항 13

제1항, 5항, 6항 7항 또는 8항에 있어서, 상기 병변 부위에 있는 백혈구가 선택적으로 최대한의 접합체를 포획할 수 있는 시간이 지난 후, 상기 접합체에 특이적으로 결합하는 비(非) 표지화된 이차 항체 또는 항체 단편을, 비경구적으로 투여할 때 상기 치료제의 치료지수를 적어도 약 10% 증가시키는 양으로 함께 사용함을 특징으로 하는 접합체.