(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 31 613 T2** 2004.06.17

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 760 685 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 31 613.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/05539**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 919 745.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/033495**
(86) PCT-Anmeldetag: **08.05.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.12.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.03.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **27.08.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.06.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 51/08**
A61K 51/10

(30) Unionspriorität:
253772 **03.06.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Immunomedics, Inc., Morris Plains, N.J., US

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München

(72) Erfinder:
GOVINDAN, Seregulam V., Summit, US; GREBENAU, Ruth, West Orange, US; GRIFFITHS, Gary L., Morristown, US; HANSEN, Hans J., Mystic Island, US

(54) Bezeichnung: **EINFÜHRUNG EINER THIOL-GRUPPE IN PROTEINE FÜR DIE RADIOIMMUNDETEKTION UND RADIOIMMUNTHERAPIE AUF DER BASIS VON RADIONUKLIDEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Ein-Fläschchen-Verfahren (engl. „one-vial methods") und Kits zur Radiomarkierung eines Proteins mit einem Radiometallion eines Radionuklids, das fest an Sulfhydrylgruppen bindet, durch Generierung von Sufhydrylgruppen am Protein unter Verwendung eines terziären Thiol enthaltenden Chelatbildners. Die Verwendung eines ein terziäres Thiol enthaltenden Chelatbildners stellt ein Protein zur Verfügung, das ein t-Thiol enthaltendes Derivat enthält, das geschützt werden kann, um freie Sulfhydrylgruppen zu generieren, welche darin mit einem Radionuklid markiert werden.

2. Beschreibung der verwandten Technik

[0002] Es ist bekannt, dass einige Radiometalle fest an Schwefelliganden binden, einschließlich z. B. Tc-99m aus reduziertem Pertechnetat, Re-186- und Re-188-Ionen, Cu-67-Ionen, Hg-197-Ionen und Bi-212-Ionen. Einige dieser Radiometalle waren an Proteine gebunden, besonders an Antikörper oder Antikörperfragmente. Technetium-99m ist wegen seiner nuklearen Eigenschaften ein ideales Radionuklid für szintigraphische Abbildung. Technetium-99m hat eine Energie eines einzelnen Photons von 140 KeV, eine Halbjahrszeit von ungefähr 6 Stunden, und es ist mit einem ^{99}Mo-^{99m}Tc-Generator leicht verfügbar.

[0003] Das Element unter Technetium im Periodensystem, Rhenium, hat gleiche chemische Eigenschaften und kann unter Verwendung gleicher Techniken an Protein markiert werden. Es gibt etwa 34 Isotope an Rhenium und insbesondere zwei davon, Rhenium-186 ($t_{1/2}$ 90 Stunden, Gamma 137 KeV, Beta 1,07, 0,93 MeV) und Rhenium-188 ($t_{1/2}$ 17 Stunden, Gamma 155 KeV, Beta 2,12 MeV) sind erstklassige Kandidaten für Radioimmuntherapie unter Verwendung monoklonaler Antikörperansätze.

[0004] Zwei Verfahren werden im Allgemeinen verwendet, um Proteine, wie z. B. Antikörper oder Antikörperfragmente, mit Radiometallen zu markieren. Der erste Ansatz ist das direkte Markierungsverfahren, in dem das Radiometall direkt an das Proteinmolekül gebunden wird. Direktes Markieren beinhaltet das Reduzieren des Proteins, um freie Sulfhydrylgruppen zu generieren, und dann das direkte Anhängen eines reduzierten Radionuklids an die freien Sulfhydrylgruppen. Direktes Markieren von Protein wurde unter Verwendung eines „Pre-tinning"-Protokolls durchgeführt, erfordernd schwere Bedingungen und lange „Pre-tinning"-Zeiten, aber Radiomarkierung bei 100% Inkorporation wurde nicht erreicht; Crockford et al., U.S. Patent Nr. 4,323,546 (siehe auch U.S. Patent Nr. 4, 424, 200). In diesem Verfahren gefährdete die Anwesenheit von extrem hohen Mengen an zinnhaltigem Ion über lange Zeiträume hinweg die Immunreaktivität des Antikörpers. Das Verfahren erforderte im Allgemeinen auch eine Aufreinigungssäule nach der Markierung. Andere direkte Markierungsverfahren erfordernn getrennte Röhrchen, eines für den Antikörper und eines für zinnhaltiges Ion, kompliziert an ein Transchelator, wie z. B. ein Phosphat und/oder Phosphonat.

[0005] Ein weiteres Problem, das mit dem direkten Markierungsverfahren verbunden ist, ist, dass von Antikörpern, die direkt mit ^{99m}Tc und/oder Rhenium markiert sind, berichtet wurde, dass sie in vivo unstabil sind, d. h. ein signifikanter Teil des Radionuklids dissoziiert von dem markierten Antikörper ziemlich schnell nach Injektion des markierten Antikörpers in den Blutstrom. Wenn der markierte Antikörper bei externen Aufnahmen verwendet wird, führt diese Instabilität zu einer Anhäufung von Radioaktivität in anderen Orten als an diese, an welche der radiomarkierte Antikörper lokalisiert. Dies reduziert die Auflösung des Verfahrens durch Abschwächen der lokalisierten Radioaktivität und durch Erhöhen der Hintergrundaktivität durch nicht spezifische Verteilung des Radioisotops. Rhodes et al., TUMOR IMAGING, Kap. 12, S. 111–24 (Mason Publ., USA, 1982) offenbart, dass instabile, direkt mit ^{99m}Tc markierte Antikörper unter Verwendung eines aufwendigen permeationschromotographischen Verfahrens aufgereinigt werden könnten, was auch das Verfahren des direkten Radiomarkierens von Proteinen erschwert. Schließlich ist restliches Technetium schwer zu entfernen, da es Kolloide bilden kann, und beides dazu tendiert, zu unerwünschter, nicht spezifischer Hintergrundstrahlung beizutragen.

[0006] Das zweite Verfahren des Radiomarkierens von Proteinen ist das indirekte Verfahren, in dem ein komplexbildendes Agens an das Protein gekoppelt ist, und das Radiometall über das komplexbildende Agens am Protein hängt. Das komplexbildende Agens enthält typischerweise frei oder geschützte Sulfhydrylgruppen, die in der Lage sind, mit dem reduzierten Radionuklid an einem Ende zu komplexieren, und Gruppen, die in der Lage sind, mit dem Protein an dem anderen Ende zu reagieren. Indirekte Markierungsverfahren, die konjugierte chelatbildende Gruppen, wie z. B. Diethylentriaminpenta-Essigsäure (DTPA) (Khaw et al., J. Nucl. Med., 23: 1011–19 (1982)) verwenden oder eine Vielfalt an Schwefel/Stickstoff (S_2N_2) chelatbildende Verbindungen, wie z. B. Bisthiosemicarbazon und ähnliche, sind bekannt. Khaw et al., Science, 209: 295–97 (1980)) offenbart Antikörper gegen Herzmyosin, markiert mit Indium-111 über DTPA und Verwendung der markierten Antikörper, um Herzinfarkt darzustellen. Siehe auch Krejcarek et al., Biochem. Byophys. Res. Commun., 77: 581–85 (1977); Childs, R. L. und Hnatowich, D. J., Nucl. Med., 26: 293 (1985). In einem aktuelleren Ansatz beschreiben Fritzberg et al. J. Nucl. Med., 27: 957 (1986), Baidoo et al., Cancer Research (Suppl.), 50: 799s–803s, (1990) den Gebrauch bestimmter Diamidodithiol- und Diaminodithiol-Gruppen

als reduzierendes Agens.

[0007] Diese Chelatbildner schließen freie Thiolgruppen mit ein, die dazu dienen können, Disulfidbindungen in dem Protein, das markiert werden muss, zu reduzieren. So kann das Markieren in Übereinstimmung mit den in den oben erwähnten Dokumenten beschriebenen Verfahren entweder direkt an den reduzierenden Disulfidbindungen in dem Protein stattfinden oder an den freien Sulfhydrylgruppen in den Chelatbildnern. Diese Verfahren schließen auch typischerweise die Verwendung eines Transchelatbildners, wie z. B. Glucoheptonat, mit ein, um das reduzierende Agens in Lösung zu halten. Die in Fritzberg et al. und Baidoo et al. offenbarten Verfahren sind folglich nicht praxisnah und einfach zu verwenden, und können den Chelatbildner an den anhängenden freien Sulfhydrylgruppen des Chelatbildners nicht spezifisch markieren.

[0008] Viele der oben erwähnten konventionellen chelatbasierenden indirekten Markierungstechniken beinhalten oft aufwendige Synthesen von Chelatbildnern, und benötigen auch oft eine „Vormarkierungs"-Prozedur, um Antikörperradiomarkierung durchzuführen. Diese Bearbeitungsschritte umfassen gewisse Qualitäten, wie z. B. Einfachheit des Gebrauchs und Anwendbarkeit, typischerweise gewünscht in der diagnostischen Industrie. Andere indirekte Markierungsverfahren beinhalten die Thiolierung von Proteinen; Wong, S. S., in CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, S.17–23 (1991). Verfahren, die das Ringöffnen von Iminothiolan, wie z. B. beschrieben in McCall, M. J., Diril H. und Meares, C. F., Bioconjugate Chem. 1: 222–26, (1990) und Goff D. A. und Carroll, S. F., Bioconjugate Chem. 1: 381–86 (1990) verwenden, haben den Nachteil des kontinuierlichen Herstellens von Thiol, resultierend in der Bildung von Aggregaten, so die gleichzeitige Derivatisierung des gebildeten Thiols erfordernd. Es wird auch erwartet, dass die Verwendung von N-Acetylhomocystein-thiolaceton zu ähnlichen Problemen führt. S-acetylmercaptobernsteinsäure-anhydrid wird oft in einer Reaktion mit Lysinresten des Proteins als ein thiolierendes Agens verwendet, wobei das Thiolacetat in einem folgenden Schritt zu Thiol konvertiert. Die Verwendung dieses Reagents resultiert dennoch in eine Änderung des gesamten Ladungsverhältnisses thiolierten Proteins, was Auswirkungen auf die Konformation und Pharmacokinetik des Antikörpers hat, Wong et al., supra. Andere Reagentien, wie z. B. 73-Acetylthiopropionyl)-thiazolidin-2-thion, werden nach Entschützung einer Mercaptogruppe generieren, welche an eine unsubstituierte Methylengruppe angehängt ist.

[0009] Dean, U.S Patent Nr. 5,180,816 offenbart ein Verfahren des Radiomarkierens eines Antikörpers mit Technitium, in dem ein Chelatbildner, der eine primäre Thiolgruppe enthält, dazu verwendet wird, um freie Sulfhydrylgruppen am Antikörper anzuhängen. Infolgedessen wird der Antikörper erst reduziert und in Fragment geschnitten, um freie Sulfhydrylgruppen zu generieren, oder alternativ, das Protein wird z. B. mit 2-Iminothiolan thioliert, um freie Sulfhydrylgruppen zu generieren. Ein Chelatbildner, der eine geschützte Thiolgruppe an einem Ende enthält, wird dann verwendet, um die freien Sulfhydrylgruppen an dem Antikörper an das andere Ende anzuhängen, und wird danach entschützt und mit Technetium in Kontakt gebracht, um Radiomarkierung zu bewirken. Das Verfahren von Dean beinhaltet einen unvorteilhaften Schnitt des Antikörpers, welcher in überschüssigen Fragmentierung oder Zerstörung der Antigen-Bindungsstelle an dem Antikörper resultieren kann.

[0010] Greenfield et al., Bioconjugate Chemistry, Band 1, Nr. 6, 1990, 400–410 beschreibt ein kreuzvernetzendes Agens mit einer N-[(3-Acetylthio)-3-methylbuturyl]-β-alanin-Komponente. Das verbindende Agens ist dafür bekannt, nützlich in der Generierung von Disulfid, welches erhöhte Resistenz gegen Reduktion hat, zu sein.

[0011] US 5,095,111 beschreibt ein metallchelatbildendes Agens, das nützlich für die Modifizierung eines Proteins ist, das zwei tertiäre Thiole und zwei Aminogruppen umfasst.

[0012] Indirektes Markieren eines Proteins ohne Generierung von freien Sulihydrylgruppen, z. B. durch Anhängen des Chelatbildners an z. B. Aminofunktionalitäten an das Protein, ist mit Deans primären Thiol enthaltenden Chelatbildner nicht möglich, obwohl Dean erwähnt, dass ein N-Hydroxysuccinimid-Ester verwendet werden kann, um den Chelatbildner an die Aminofunktionalitäten des Proteins zu binden. Der Grund dafür ist, dass die Proteinaminogruppen nicht nur mit dem N-Hydroxysuccinimid-Carboxylestern reagieren, sondern sie spalten auch die geschützte primäre Thiolgruppe auf der gegenüber liegenden Seite des Chelatbildners. Dieses Spalten resultiert in vorzeitiger Entschützung und Oxydation der generierten freien Thiolgruppen und behindert effizientes und quantitatives Markieren des Antikörpers.

[0013] Andere Probleme, verbunden mit der Verwendung von Chelatbildnern ist, dass Eintopfmarkieren, wo das Protein-Chelatbildnerkonjugat mit Zinn vor der Reaktion mit dem Radionuklid in Berührung kommt, nicht möglich ist. Der Grund dafür ist, dass die Anwesenheit des Zinns die Disulfidbindungen in dem Protein reduziert, dadurch die Chelatspezifität der Radiomarkierung zerstört und möglicherweise die Wirksamkeit des Proteins zerstört. Zusätzlich akkumulieren viele Chelatbildner in toxischen Mengen in der Niere, wenn sie in der Immuntherapie unter Verwendung von Rhenium als das Radionuklid verwendet werden. Bei bilddarstellenden Anwendungen neigen viele radiomarkierte Proteine, z. B. gesamt IgG, radiomarkiert mit Technetium, dazu, in der Leber zu verschwinden und sich dort anzusammeln, und beeinflussen dadurch die Effizienz der Abbildung nachteilig, da viele Tumore über den ganzen Körper

metastasieren können. Auch neigt das Tumor-zu-Nicht-Tumor-Verhältnis bei vielen konventionell radiomarkierten Proteinen dazu, zu niedrig zu sein, wodurch die Effizienz der Abbildung nachteilig beeinflusst wird.

[0014] Dadurch besteht ein Bedarf daran, ein Verfahren zur Markierung eines Proteins unter Verwendung eines Chelatbildners zu entwickeln, das in der Lage ist, einen komplexen mit einer nicht-antigenen Bindungsstelle an einem Portein zu bilden, das nicht reduziert oder thioliert worden ist, und das in der Lage ist, einen Komplex mit einem Radionuklid zu bilden, so dass das radiomarkierte Protein nicht weiter gespalten wird, wenn es mit Zinn in Kontakt kommt und danach gefroren oder lyophilisiert wird. Es existiert auch ein Bedarf daran, ein Verfahren zum Markieren eines Proteins unter Verwendung eines bifunktionalen Chelatbildners, der anhängende geschützte Thiolgruppen enthält, zu entwickeln, wodurch die reaktiven Gruppen am Protein nicht vorzeitig die geschützten Thiolgruppen an dem bifunktionalen Chelatbildner spalten. Es besteht auch ein Bedarf daran, ein Verfahren und ein Kit zur Entwicklung, das einfach zu verwenden ist und das nicht komplizierte Synthese-Verfahren oder mehrere Behälter für das Protein und das reduzierende Agens beinhalten, und das Nichtverwenden eines Transchelators beinhaltet. Es besteht auch ein Bedarf daran, ein Verfahren zur Radiomarkierung eines Proteins für die Verwendung in Radioimmunabbildung oder Radioimmuntherapie zu entwickeln, in dem das radiomarkierte Protein eine gute Tumoraufnahme aufweist, eine niedrige Aufnahme in der Niere und nicht vollständig in der Leber verschwindet, sich breit über den Körper ausbreitet und ein gutes Tumorzu-Nicht-Tumor-Verhältnis für Abbildungszwecke zur Verfügung stellt. Es besteht auch ein Bedarf daran, ein Verfahren zur Radiomarkierung eines $F(ab')_2$ monoklonalen Antikörpers zu entwickeln, das nicht danach $F(ab')_2$ zu F(ab') spaltet, selbst wenn Zinn in dem ein Gefäßmarkierungs-Kit vorhanden ist.

Zusammenfassung der Erfindung

[0015] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren und ein Kit zur Verfügung zu stellen, nützlich zu indirekten Radiomarkierung eines Proteins mit einem Radionuklid unter Verwendung eines Chelatbildners, welche leicht zu synthesieren ist, und ein Verfahren, das keine komplizierten reduzierenden Prozeduren beinhaltet, einschließlich der Verwendung von überschüssigem reduzierenden Agens. Es ist auch eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Ein-Fläschchen-Verfahren und einen Kit zum indirekten Radiomarkieren eines Proteins zur Verfügung zu stellen, welches in der Lage ist, von einem Krankenhausarzt oder Techniker vor dem Gebrauch des markierten Proteins verwendet werden zu können, und welches nicht zu einer vorzeitigen Spaltung des Proteins während Inkubation mit dem reduzierenden Agens für das Radionuklid führt. Eine zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und Kit für indirektes Radiomarkieren eines Proteins zur Verfügung zu stellen, in dem das Radionuklid mit dem Chelatbildner komplexiert ist. Eine zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und Kit für indirektes Radiomarkieren des Proteins für den Gebrauch in Radioimmunabbildung oder Radioimmuntherapie zur Verfügung zu stellen, in dem das radiomarkierte Protein eine gute Tumoraufnahme aufweist, eine niedrige Nierenaufnahme, nicht komplett in der Leber verschwindet, sich breit im gesamten Körper ausbreitet und ein gutes Tumor-zu-Nicht-Tumor-Verhältnis für Abbildungszwecke zur Verfügung stellt. Gemäß dieser und anderer Aufgaben der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Radiomarkierung eines Proteins mit Technetium oder Rhenium zur Verfügung gestellt, umfassend Inkontaktbringen eines Gemisches aus einem Konjugat des Proteins eines für Pertechnetat oder Radioperrhenat reduzierendes Agens, wobei das Proteinkonjugat einen an das Proteinkovalent gebundenen Komplexbildner umfasst und wobei der Komplexbildner eine N-(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente umfasst.

[0016] Gemäß einer weiteren Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Radiomarkieren eines Proteins mit Technetium, umfassend Inkontaktbringen eines Konjugats des Proteins mit reduziertem Radiopertechnetat, wobei das Proteinkonjugat einen an das Proteinkovalent gebundenen Komplexbildner umfasst und wobei der Komplexbildner eine N-(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente umfasst, zur Verfügung gestellt.

[0017] Gemäß eines weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung wird ein Diagnose-Kit zur Verfügung gestellt, geeignet zur Bildung einer an einem Menschen zu verabreichenden Zusammensetzung, der eine sterile Packung umfasst, enthaltend (i) ein Proteinkonjugat, umfassend einen an Proteinkovalent gebundenen Komplexbildner, wobei der Komplexbildner eine N-(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente umfasst; und (ü) ein für Pertechnetat oder Perrhenat reduzierendes Agens, das in einem späteren Schritt zuzufügen ist.

[0018] Gemäß eines weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung wird ein Proteinkonjugat, markiert mit Re-186 oder Re-188 zur Verfügung gestellt, worin das Proteinkonjugat einen Chelatbildner, kovalent an ein Protein gebunden, das spezifisch an einen Tumor oder eine infektöse Läsion bindet, umfasst, worin der Chelatbildner eine N-(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente umfasst, zur Verwendung in einem Verfahren der Radioimmuntherapie durch parenterale Verabreichung an einen Patienten, der an einem Tumor oder an einer infektösen Läsion leidet.

[0019] Gemäß eines weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung wird ein Proteinkonjugat, das mit einem pharmazeutisch inerten Radioisotop des Tech-

netium oder Rhenium markiert ist, zur Verfügung gestellt, wobei das Proteinkonjugat einen Komplexbildner umfasst, der kovalent an ein Protein gebunden ist, welches spezifisch an ein Antigen bindet, produziert durch oder assoziiert mit einem Tumor, einer infektösen Läsion, einem Herzinfarkt, einem Blutgerinsel, einer atherosklerotischen Ablagerung oder normalen Organ oder Gewebe, und wobei der Komplexbildner eine N-(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente umfasst zur Verwendung in einer parenteraler Injektion am Menschen, und nach einer ausreichenden Zeit zur Lokalisation des radiomarkierten Proteins den Nicht-Target-Hintergrund beim Nachweis der Stelle oder Stellen der Zunahme des radiomarkierten Proteins durch eine externe Abbildungskamera aufzuhellen.

[0020] Es ist auch ein Verfahren zum Radioimmunabbilden eines Tumors, einer infektösen Läsion, eines Herzinfarkts, eines Blutgerinsels, einer atherosklerotischen Ablagerung oder eines normalen Organs oder Gewebes beschrieben, in dem ein Protein, ein Antikörper oder ein Antikörperfragment, welches spezifisch an ein Antigen, produziert von oder assoziiert mit dem Tumor usw., bindet, und mit einem pharmazeutisch inerten Radioisotop radiomarkiert ist, das in der Lage ist, extern bestimmt zu werden, parenteral einem Menschen injiziert wird und, nach einer ausreichenden Zeit, um den radiomarkierten Antikörper oder das Antikörperfragment zu lokalisieren und den Nicht-Target-Hintergrund aufzuhellen, die Stelle oder die Stellen der Zunahme des radiomarkierten Proteins, Antikörpers oder Antikörperfragments durch eine externe Abbildungskamera bestimmt werden. Es ist eine Verbesserung, das radiomarkierte Protein, den radiomarkierten Antikörper oder das radiomarkierte Körperfragment wie ein markiertes Protein, einen markierten Antikörper oder ein markiertes Antikörperfragment, hergestellt nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, zu verwenden. Die radiomarkierten Proteine, wenn verwendet in solchen radioimmun-abbildenden Verfahren, leiden also nicht unter den oben erwähnten Nachteilen im Hinblick auf Leber-Clearance und das Target-zu-Nicht-Target-Verhältnis usw.

[0021] Es ist auch ein Verfahren der Radioimmuntherapie beschrieben, einschließend die Schritte: (a) Inkontaktbringen eines Proteins, das spezifisch an ein Antigen, produziert von oder assoziiert mit einem Tumor oder einer infektösen Läsion, bindet, mit einem ein tertiäres Thiol enthaltenden, bifunktionellen Chelatbildner, der in der Lage ist, mit dem Protein an einem Ende des Agens ohne Spalten von Disulfidbindungen an dem Protein zu reagieren, und das in der Lage ist, mit einem Radionuklid am anderen Ende des Agens zu komplexieren, um ein Protein-Acetyl-t-Thiol enthaltendes Konjugat zu bilden. Das Protein-Acetyl-t-Thiol enthaltendes Konjugat wird dann entschützt und mit einem reduzierendem Agens für therapeutisch wirksame reduzierbare Radionuklide gemischt, wobei das reduzierbare Radionuklid in einem anschließenden Schritt zugefügt werden muss, um eine Mischung von reduzierendem Agens und Protein-Acetyl-t-Thiol enthaltendem Konjugat zu bilden. Diese Mischung reagiert dann mit einem therapeutisch wirksam reduzierbaren Radionuklid, wobei die Radionuklide mit angehängten Sulfhydrylgruppen reagieren, die an dem Protein-Acetyl-t-Thiol enthaltendem Konjugat vorhanden sind, um eine Lösung zu produzieren, die ein radiomarkiertes Protein-Acetyl-t-Thiol enthaltendes Konjugat enthält, welches wiederum parenteral einem Patienten verabreicht wird, der an einem Tumor oder an einer infektösen Läsion leidet. Solch ein radiomarkiertes Protein leidet nicht an den oben diskutierten Nachteilen im Hinblick auf überschüssige Aufnahme in der Niere und ähnlichem.

Detaillierte Beschreibung

[0022] Die vorliegenden Erfinder haben herausgefunden, dass ein Protein, z. B. ein Antikörper oder ein Antikörperfragment, das angehängte Sulfhydrylgruppen aufweist, durch die Wirksamkeit der Verwendung eines Chelatbildners, der geschützte angehängte Thiolgruppen enthält, welche anschließend entschützt werden, um freie Sulfhydrylgruppen zu generieren, selektiv Radiometallionen binden kann, um feste Bindugen an Sulfhydrylgruppen zu bilden. Diese radiomarkierten Proteine sind aufgrund ihrer Fähigkeit, sich an den Tumor anzuheften, der Vermeidung einer überschüssigen Aufnahme in der Niere, der Vermeidung einer überschüssigen Leber-Clearance und der Bereitstellung guter Tumor-zu-Nicht-Tumor-Verhältnisse sehr effektiv, wenn sie in radioimmunodarstellenden und radioimmuntherapeutischen Verfahren verwendet werden. Zusätzlich ermöglicht das Verfahren des Radiomarkierens das Eintopfmarkieren des Proteins, das nicht reduziert worden ist, d. h. $F(ab')_2$, in dem das Protein mit einem Chelatbildner konjugiert wird und dann mit einem für das Radionuklid reduzierenden Agens in solche Weise in Kontakt gebracht wird, dass das reduzierende Agens das Protein, d. h. $F(ab')_2$, zu Fab' spaltet. Die vorliegenden Erfinder haben ferner herausgefunden, dass das Protein in der obigen Art und Weise markiert werden kann, ohne das das Protein reduziert werden muss, wodurch man Gefahr läuft, dass zu viele Disulfidbindungen gespalten werden oder dass die Bindungspezivität des Proteins verändert wird. Zusätzlich haben die vorliegenden Erfinder herausgefunden, dass die Verwendung eines tertiären Thiols, welches einen Chelatbildner enthält, das Anheften an einem Protein ohne die Generierung von freien Sulfhydrylgruppen an dem Protein oder Reduzieren des Proteins erlaubt, ohne Spalten der geschützten Thiolgruppen an dem Chelatbildner, dadurch verhindernd die frühzeitige Entschützung und den oxidativen Verlust von freien Thiolgruppen. Beide, das Reagens und die Bedingungen in dem vorliegenden Verfahren sind höchst vereinfacht, und das

Verfahren ist insbesondere geeignet für Technetium- oder Rheniummarkieren, entweder unter Verwendung eines Transchelators, wie z. B. Glucoheptonat oder durch Verwendung von Zinn als ein reagierendes Agens in einem Ein-Fläschchen-Kit.

[0023] Überall in dieser Beschreibung bezeichnet der Ausdruck „Protein" ein Polypeptid, das zwei oder mehrere Aminosäuren hat. Vorteilhafterweise bezeichnet „Protein" einen gesamten Antikörper (d. h. IgC) und Antikörperfragmente, wie z. B. $F(ab')_2$, Fab' oder Fab. Diese gesamten Antikörper oder Antikörperfragmente enthalten sowohl stabile als auch nicht stabile Markierungsstellen fur reduzierte Technetium- oder Rheniumionen. Die „nicht stabile Stelle" (welche eine oder mehrere Stellen sein kann) hat eine hohe Kapazität, aber niedrige Affinität für reduziertes Technetium (nachstehend ist es selbstverständlich, dass Rheniumionen eingeschlossen sind, wenn die häufiger verwendeten Technetiumionen diskutiert werden, da die Technetium- und Rheniumchemie im wesentlichen die gleiche ist für Markierungszwecke, obwohl die Bindungskonstanten etwas unterschiedlich sein können). Diese nicht stabile Stelle macht ungefähr 85% des gesamten Direktmarkierens von $F(ab')_2$-Fragmenten und 76% des Gesamtmarkierens des IgG mit reduziertem ^{99m}Tc aus. Die zweite Stelle fuhrt zu einer stabilen Markierung und macht 15% und 24% des Gesamtmarkierens von $F(ab')_2$ beziehungsweise IgG mit ^{99m}TC aus.

[0024] Die vorliegenden Erfinder glauben, während sie nicht an irgendwelche Theorie gebunden sein wollen, dass indirektes Markieren eines Proteins unter Verwendung eines geschützten, ein tertiäres Thiol enthaltenden Chelatbildners, um ein Acetyl-t-Thiol enthaltendes Proteinderivat zu generieren, das Anheften an eine spezifische nicht-antigene Bindungsstelle an einen Antikörper ohne vorzeitige Spaltung des geschützten Thiols am anderen Ende des ein tertiäres Thiol enthaltenden Chelatbildners und ohne Spaltung der Disulfidbindungen an dem Protein ermöglicht. Zusätzlich haben die vorliegenden Erfinder herausgefunden, dass die Disulfidbindungen in Protein-Chelatbildnerkonjugaten der vorliegenden Erfindung nicht gespalten werden, um kleinere Fragmente zu produzieren, die nicht die erforderliche Bindungsspezifität oder Antigenität haben oder um angehängte Sulfhydrylgruppen an dem Protein zu produzieren, wenn sie mit einem für ein Radionuklid reduzierendes Agens in einem Ein-Fläschchen-Kit vermischt werden. Daher ermöglicht die Verwendung des t-Thiol enthaltenden Chelatbildners der vorliegenden Erfindung das spezifische Markieren an den entschützten angehängten Sulfhydrylgruppen des Chelatbildners und nicht an irgendwelchen freien Sulfhydrylgruppen, die an dem Protein vorliegen. Während sie nicht an irgendwelche Theorie gebunden sind, glauben die vorliegenden Erfinder, dass der geschützte, ein tertiäres Thiol enthaltende Chelatbildner eine erhöhte Resistenz gegenüber acylspaltenden Reaktionen hat, wodurch verhindert wird, dass die reaktiven Funktionalitäten an dem Protein, d. h. die Aminosäurenfunktionalitäten, die Thiolgruppen vorzeitig entschützen, und die Verwendung des erfinderischen Chelatbildners verhindert versehentliche Reduktion von Disulfidbindungen in dem Protein. Das vorliegende Verfahren verhindert ferner im wesentlichen die unerwünschte Bildung von Kolloid während des Markierungsverfahrens, und das vorliegende Verfahren verhindert unter geeigneten Anteilen von reduzierendem Agens und Ausschluss von Sauerstoff die Akkumulation von restlichem Pertechnetat als eine Verunreinigung.

[0025] Es sollte klar sein, dass die Proteine, einschließlich der Antikörper oder Antikörperfragmente, die radiomarkiert werden müssen, Antikörper sein können, die Antigene binden, welche einschließen, aber nicht beschränkt sind auf Antigene, die produziert werden oder verbunden sind mit Tumoren, infektösen Läsionen, Mikroorganismen, Parasiten, Herzinfarkten, Blutgerinsel, atherosklerotischen Ablagerungen oder normalen Organen oder Geweben. Überall in dieser Beschreibung beschreiben die Ausdrücke „Antikörper" oder „Antikörperfragmente" im allgemeinen Immunoglobuline, die spezifisch an Antigene binden, um Immunkomplexe zu bilden. Diese Ausdrücke schließen mit ein herkömmliches IgG, IgA, IgE, IgM und ähnliches, herkömmliche Enzymverdauungsprodukte, wie z. B. $F(ab')_2$-Fragmente, erhalten durch Pepsinverdauung von intakten Immunoglobulinen, Fab-Fragmente, erhalten durch Papainverdauung von intakten Immunglobulinen, herkömmliches monovalentes Fab' und leichte Kettenfragmente, erhalten durch Spaltung der Disulfidbindung von $F(ab')_2$-Fragmenten beziehungsweise intaktem Antikörper, genauso wie Produkte, die im wesentlichen gleiche Eigenschaften wie solche Immunoglobuline und Fragmente haben. Solche gleiche Proteine schließen mit ein Antikörper, Subfragmente, die durch weitere Verdauung oder Manipulation von größeren Fragmenten, in technisch hergestellten Antikörpern und/oder Fragmenten hergestellt wurden, und synthetische Proteine, die eine Antigenerkennungsdomäne haben, welche spezifisch an Antigen in einem im wesentlichen analogen An und Weise zu einem „klassischen" Immunoglobulin binden. Sollte klar sein, dass die Fragmente des Proteins keine freien Sulihydrylgruppen enthalten müssen und vorzugsweise nicht enthalten sollten.

[0026] Das vorliegende Verfahren markiert vorteilhaft Proteine, wie z. B. ganze Antikörper (IgG) oder Antikörperfragmente $F(ab')_2$, Fab' oder Fab und mehr vorteilhaft $F(ab')_2$ monoklonalen Antikörper. Typische Verfahren von direkter oder indirekter Markierung von $F(ab')_2$ beinhalten norinalerweise die Reduktion eines Ganze Antikörpers $F(ab')_2$. Dennoch wurde entdeckt, dass Versuche, teilweise Reduktion von $F(ab')_2$ zu erreichen, resultierend aus enzymatischer Spaltung von intaktem Antikörper, oft in einer beträchtlichen weiteren Spaltung zu Fab' resultiert, und das noch spätere Versuche, Pertechnetat oder Per-

rhenat mit Zinnion zu reduzieren in der Anwesenheit von $F(ab')_2$ durch Reduktion von Disulfidbindung und weitere Spaltung zu Fab' begleitet sind, resultierend in dem Verlust von Marker an das monovalente Fragment, und möglicherweise resultierend in solcher überschüssiger Fragmentierung von $F(ab')_2$, dass die Effizienz zerstört ist. Zusätzlich hat die Verwendung von Chelatbildnern, die freie Sulfhydrylgruppen einschließen, zu einer Disulfidbindungreduktion und versehentlichen Spaltung geführt hat, resultierend in dem Verlust einiger Marker an den Antikörper oder das Antikörperfragment, anstelle mit den freien Sulfhydrylgruppen an dem Chelatbildner zu reagieren. Für die Verbesserung der Herstellung von $F(ab')_2$ Antikörperkonjugaten mit dem bifunktionalen Chelatbildner, im wesentlichen frei von weiteren Fab'-Spaltungsprodukten, wurde es überraschenderweise und unerwarteterweise entdeckt, dass die Reaktion von $F(ab')_2$ und einem geschützten, ein tertiäres Thiol enthaltenden Chelatbildner in einer höchst effizienten Markierung des $F(ab')_2$ resultiert.

[0027] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung schließt das in Kontakt bringendes Protein mit einem geschützten, ein tertiäres Thiol enthaltenden Chelatbildner, um ein Proteinchelatbildnerkonjugat zu produzieren, das mindestens eine tertiäre geschützte Thiolgruppe enthält. Der ein tertiärs Thiol enthaltende Chelatbildner ist kovalent mit dem Protein gebunden und dient dazu, das Protein und das Radiometall nach der Entschützung zu kuppeln. Verfahren, um eine solche kovalente Bindung herbei zu führen, sind dem Fachmann wohl bekannt. Zum Beispiel kann ein aktiver Ester (z. B. N-Hydroxysuccinimidester) oder ein Isothiocyanatderivat des verbindenden Agens verwendet werden, um das Agens in Aminofunktionen an dem Protein zu binden; ein 2-Iodoacetyl oder Maleinmidoderivat des verbindenden Agens können verwendet werden, um das Agens an Sulfhydrylgruppen des Proteins zu binden; ein Hydrazidderivat des Agens kann verwendet werden, um das Agens an oxidierte Carbohydratgruppen an dem Protein zu binden; oder ein Carbodümidreagens, wie z. B. 1-Ethyl-3-(3-diaminopropyl)carbodümid kann verwendet werden, um eine Aminogruppe des Chelatbildners an ein Carboxylgruppe an dem Protein zu binden. Ganze Antikörper (IgG) und Peptide kommen natürlicherweise vor mit Amin- und Carboxylgruppen. Vorteilhafterweise bilden der geschützte, ein tertiärs Thiol enthaltende Chelatbildner der vorliegenden Erfindung einen Komplex mit einer Aminfunktionalität an dem Antikörper, oder Antikörper nicht reduziert oder thioliert worden ist, um freie Sulfhydrylgruppen zu generieren. Noch vorteilhafter bildet der geschützte, ein tertiäres Thiol enthaltende Chelatbildner der vorliegenden Erfindung einen Komplex mit einer Aminfunktionalität an dem Protein, und die Aminfunktionalität reagiert nicht mit der geschützten Thiolgruppe an dem Chelatbildner, was in seiner vorzeitigen Entschützung zu Sulfhydryl resultiert.

[0028] Die geschützten, ein tertiäres Thiol enthaltenden Chelatbildner, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sind jegliche Chelatbildner, die einen elektrophilen oder nukleophilen Teil enthalten, der eine stabile Bindung mit einer Proteinfunktionalität, wie oben beschrieben, bilden kann, und einen komplexfierenden Teil, der mindestens eine geschützte, ein tertiäres Thiol enthaltende Gruppe enthält, wobei dieser Teil ein gewünschtes Radionuklid nach Entschützung zu komplexieren kann, und welcher nicht mit der Proteinfunktionalität reagiert, um die Thiolgruppe vorzeitig zu entschützen. Vorteilhafterweise bildet der ein tertiäres Thiol enthaltende Chelatbildner einen 5- oder 6-Ringkomplex mit dem gewünschten Radionuklid. Noch vorteilhafter bildet der ein tertiäres Thiol enthaltende Chelatbildner der vorliegenden Erfindung ein Acetyl-t-Thiol enthaltendes Derivat, welches entschützt und mit Technetium markiert werden kann. Solche Chelatbildner schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf (N-Hydroxysuccinimidyl)-N-(3-Methyl-3-acylmercaptobuturyl)glucinat und Reaktionsprodukte dieser Verbindung mit Diglycin oder Triglycin.

[0029] Da jegliche angehängte Sulfhydrylgruppen, die im Chelalatbildner anwesend sind, mit einem sulfhydrylselektiven Elektorphil, welches Teil des gleichen Kopplungsagens sein kann, inkompatibel sein kann, kann die Sulfhydrylgruppe entsprechend geschützt werden vor der Reaktion mit der elektrophilen Komponente während des Anhängens des Chelatbildners. Das geschützte Thiol kann dann unter Verwendung von Mechanismen, die dem Fachmann wohl bekannt sind, entschützt werden. Der Ausdruck „geschütztes Thiol", wie hier verwendet, bezeichnet eine thiolhaltige Komponente, in der die Thiolgruppe reversibel derivatisiert ist, so dass das Thiol unreaktiv gemacht wird. Nach dem Anhängen an das Proteinsubstrat kann die chelatbildende Komponente entschützt werden, um die chelatbildende Funktionalität für das Radionuklidbinden zu demaskieren. Insbesondere wird das geschützte Thiol entschützt, um freie angehängte Sulfhydrylgruppen zu generieren, die in der Lage sind, mit dem Radionuklid zu komplexieren.

[0030] Gruppen, die geeignet sind, das Thiol vor Reaktion zu schützen, sind organische und anorganische Gruppen, welche unter milden Bedingungen leicht entfernt werden können, um das freie Sulfhydryl in der Gegenwart des Proteins zu regenerieren, ohne im wesentlichen die Aktivität des Proteins zu verändern. Vorteilhafterweise ist die thiolschützende Gruppe ein Thiolester. Der Fachmann ist mit den Verfahren des Schützens und Entschützens von Thiolgruppen vertraut, und das Durchführen innerhalb der Grenzen der vorliegenden Erfindung zu tun ist innerhalb des Bereichs des Durchschnittsfachmanns.

[0031] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung schließt ein Inkontanktbringen eines entschützten Protein-Chelatbildner-Konjugats mit einem reduzierenden Agens ein, um ein Radionuklid zu reduzieren, wobei das Radionuklid später hinzugegeben wird.

Das entschützte Protein-Chelatbildner-Konjugat und das reduzierende Agens sind typischerweise gefroren oder lyophilisiert, wodurch die Spaltung von Disulfidbindungen in dem Protein aufgrund der Anwesenheit des reduzierenden Agens verhindert wird. Die vorliegende Erfindung schließt auch ein Kit ein, welches ein entschütztes Protein-Chelatbildner-Konjugat und ein reduzierendes Agens zum Reduzieren eines Radionuklids einschließt, wobei das Radionuklid anschließend hinzu gegeben werden muss. Nach Zugabe des reduzierenden Agens kann die Mischung verwendet werden, um das Radiomarkierungsverfahren der vorliegenden Erfindung auszuführen. Ein Radionuklid kann zu dem Kit hinzugefügt werden, um ein radiomarkiertes Protein zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich kann ein entschützendes Agens vor der Zugabe des nicht vorreduzierten Radionuklids zugegeben werden, falls ein geschütztes Protein-Chelatbildner-Konjugat verwendet wird. Die einzelnen Fläschchen oder Kits der vorliegenden Erfindung sind zur Aufbewahrung geeigneten Proteins, des geeigneten Antikörpers, des geeigneten Antikörperfragments oder ähnliches, komplexiert mit dem ein tertiäres Thiol enthaltenden Chelatbildner, für ein bestimmtes immunodiagnostisches oder immunotherapeutisches Vorgehen entworfen worden.

[0032] In Übereinstimmung mit dem vorliegenden Verfahren werden die Fläschchen oder die Kits vorteilhafterweise versiegelt und mit einem Mechanismus zum Einführen oder Herausnehmen von Reagenzien unter sterilen oder semi-sterilen Bedingungen versehen. Vorzugsweise wird in dem vorliegenden Verfahren ein Fläschchen verwendet, das an den Anschluss für Spritzeninjektion enthält. Die Reagenzien in den Fläschchen oder Kits werden typischerweise in wässriger, gefrorener oder lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt. In einer Ausführungsform können die Reagenzien für einige Tage bis einige Wochen bei niedrigen Temperaturen, z. B. im Kühlschrank, gelagert werden, bevorzugt bei einem pH von ungefähr 3,5–5,5, stärker bevorzugt bei pH 4,5–5,0, vorteilhafterweise unter einer Inertgasatmosphäre, z. B. Stickstoff oder Argon.

[0033] Die vorliegende Erfindung umfasst auch die Bereitstellung von Reagenzien in lyophilisierter Form, um Lagerung und Stabilisierung zu erleichtern. Das wird vorteilhafterweise durch eine Lösung eines leicht flüchtigen Puffers bei einem pH von ungefähr 5,5, z. B. Ammoniumacetat bewirkt, und bevorzugt auch in der Anwesenheit eines Stabilisators, um Aggregation zu verhindern, z. B. eines Zuckers wie z. B. Trehalose oder Succharose. Solche Lyophilisierungsbedingungen sind herkömmlich und dem Durchschnittsfachmann wohl bekannt. Die Reagenzien können auch gefroren werden und dann vor Gebrauch aufgetaut werden; aber dieses Verfahren birgt ein größeres Risiko der Reoxidation und Aggregation des Protein-Chelatbildner-Konjugats.

[0034] Das Markierungsverfahren der vorliegenden Erfindung kann dann einfach durch Hinzufügen des Radioisotops, z. B. in der Form von löslichem Natriumpertechnetat, zu dem Fläschchen, das das reduzierende Agens und das entschützte Protein-Chelatbildner-Konjugat enthält, durchgeführt werden. Zusätzlich kann ein entschützendes Agens vor oder während der Zugabe des Radioisotops hinzugefügt werden, falls ein geschütztes Protein-Chelatbildner-Konjugat verwendet wird, um im wesentlichen 100% Inkorporation sicher zu stellen. Der Inhalt des Fläschchens wird dann gemischt und für eine Zeit inkubiert, die ausreichend ist, um Markierung des Proteins herbei zu führen. Die Länge und die Bedingungen der Inkubation sind nicht entscheidend, aber die Inkubation wird typischerweise für eine Zeitspanne ausgeführt, die ausreicht, um im wesentlichen 100% Inkorporation von ^{99m}Tc das Protein zu erhalten. „Im wesentlichen 100% Inkorporation", wie es zum Technetiummarkieren gehört, bezeichnet eine Inkorporation, die größer ist als 98%, vorteilhafter größer als 99% und stärker vorteilhaft 100% Inkorporation. Normalerweise wird die Inkubation über eine Zeitspanne von ungefähr 0,1 bis ungefähr 60 Minuten ausgeführt, und vorteilhafterweise über eine Zeitspanne von ungefähr 1 bis ungefähr 5 Minuten. Das radiomarkierte Protein kann dann aus dem Fläschchen entnommen werden, und sofort verwendet werden, da Separation oder Abtrennung nicht erforderlich ist.

[0035] Das für das Radionuklid reduzierende Agens ist vorteilhafterweise Zinn (II), bevorzugt in der Form von Zinnionen. Typischerweise wird das Protein-Chelatbildner-Konjugat enthaltende Zinnchlorid der Mischung hinzu gefügt. Es ist selbstverständlich für den Fachmann, dass Zinnionen in situ aus Zinnmetall, z. B. Metallfolie, Körner, Puder, Wechsel und ähnliches, durch Kontakt mit löslicher Säure, z. B. HCl, hergestellt werden kann, und wird normalerweise in Form von $SnCl_2$ hinzu gefügt, vorteilhafterweise in einer Lösung, die auch ungefähr 0,1 mM in HCl beträgt.

[0036] Im Allgemeinen ist es vorteilhaft, mit einer Lösung mit einer Proteinkonzentration von ungefähr 0,01–10 mg pro ml, vorzugsweise ungefähr 0,1–5 mg/ml, zu arbeiten, allgemein in Salzlösung, vorzugsweise gepuffert auf einen milden sauren pH von ungefähr 4,0–4,5. In solch einem Fall beträgt die Menge an Zinnionen, die für die Reduktion einer normalen Abbildungsaktivität von Pertechnetat benötigt wird, ungefähr 0,1–50 µg/ml, vorzugsweise ungefähr 0,5–25 µg/ml, im Verhältnis zu der Menge an Protein. Wenn mit der vorhergehenden Menge an Protein markiert wird, ist die Menge von Pertechnetat im allgemeinen 2–50 mCi/mg Protein, und die Reaktionszeit beträgt ungefähr 0,1–30 Minuten. Mit den bevorzugten Protein und Zinnionenkonzentrationen beträgt die Pertechnetatmenge vorzugsweise ungefähr 5–30 mCi/mg, und die Reaktionszeit beträgt bevorzugt ungefähr 1–20 Minuten.

[0037] Pertechnetat wird im Allgemeinen aus einem handelsüblichen Generator erhalten, am häufigsten in Form von $NaTcO_4$, normalerweise in Salzlösung.

Mit geeigneter Modifikation des Verfahrens können andere Pertechnetatformen verwendet werden, wie es vom Lieferanten einer neuen Form von Generator vorgeschlagen werden würde oder wie es dem Durchschnittsfachmann offensichtlich sein würde. Pertechnetat wird im allgemeinen verwendet bei einer Aktivität von ungefähr 0,2– 10 mCi/ml in Salz, z. B. 0,9% („physiologisch") Salz, gepuffert bei einem pH von ungefähr 3–7, vorzugsweise 3,5–5,5, stärker bevorzugt ungefähr 4,5–5,0. Geeignete Puffer schließen z. B. Acetat, Tartrat, Citrat, Phosphat und ähnliches mit ein. Die Reduktion von Pertechnetat wird normalerweise unter einer inerten Gasatmosphäre, z. B. Stickstoff, Argon oder ähnlichem, durchgeführt. Die Reaktionstemperatur wird im allgemeinen bei ungefähr Raumtemperatur gehalten, z. B. 18°C–25°C.

[0038] Überall in dieser Beschreibung bezeichnen die Sätze „reduziertes Pertechnetat" oder „reduziertes Perrhenat" die Form von Technetium oder Rheniumion, die durch Zinnionen gebildet wird, und durch die Thiolgruppe/n chelatisiert wird. Es wird allgemein angenommen, dass reduziertes Pretechnetat in der Form Tc(III) und/oder Tc(IV) und/oder Tc(V) in solchen Chelaten vorliegt, und dass reduziertes Perrhenat in der Form von Re(III) und/oder Re(IV) und/oder Re(V) vorliegt, aber höhere oder niedrigere Oxidationsstufen und/oder mehrere Oxidationsstufen innerhalb des Geltungsbereiches der vorliegenden Erfindung mit eingeschlossen sind.

[0039] Rhenium befindet sich im Periodensystem direkt unter Technetium, hat die gleiche Konfiguration der äußeren Elektronenschale, und man erwartet deshalb, sehr ähnliche chemische Eigenschaften wie Technetium, insbesondere sein Verhalten mit analogen Verbindungen. In der Tat verhalten sich Rheniumverbindungen insofern qualitativ gleich wie Technetiumverbindungen, als Reduktion in Chelierung betroffen sind. Ihre Reaktionsgeschwindigkeiten aber sind ziemlich verschieden, und sie sind in verschiedenen wichtigen Gesichtspunkten unähnlich.

[0040] Trotz dieser Unterschiede ist der Fachmann in der Lage, die vorliegende Erfindung basierend auf der Offenbarung von Technetiummarkierung zu modifizieren, um effizientes Rheniummarkieren zu erreichen (siehe zum Beispiel Griffiths, U.S. Patent Nr.5,128,119, dessen Offenbarung hier in ihrer Gesamtheit durch Bezugnahme aufgenommen ist.

[0041] Das Radioisotop Re-186 ist für die Therapie attraktiv und kann auch für das Abbilden verwendet werden. Es hat eine Halbwertszeit von ungefähr 3,7 Tagen, eine hohe LET-beta-Emission (1,07 MeV) und eine geeignete Gammastrahlungs-Energie (0,137 MeV). Durch Analogie zu Technetium kann Rhenium aus Perrhenat hergestellt werden, und die reduzierten Rheniumionen können nicht spezifisch an Protein binden. Dementsprechend würde ein Verfahren zu Re-186-Markierung von Proteinen von Vorteil sein, in dem das reduzierte Perrhenat an Sulfhydrylgruppen eines Protein-Chelatbildner-Komplexes gebunden ist. Re-188 ist ein mittels eines Generators hergestellter Beta- und Gamma-Strahler mit einer Halbwertszeit von ungefähr 17 Stunden, und ist zur Abbildung und Therapie geeignet. Die Entwicklung von handelsüblichen Generatoren für Rhenium-188 ist gegenwärtig am Laufen; und in einem bevorzugten Szenario wird trägerfreies Rhenium-188 direkt in ein Fläschchen, das Zinnionen und einen Protein-Chelatbildner-Komplex enthält, hinzu gefügt, um ein rhenium-radiomarkiertes Protein zu produzieren, welches in weniger als ungefähr 2 Stunden für den Gebrauch bereit ist.

[0042] Im Allgemeinen wird die Konzentration von unkomplexiertem Protein, z. B. Antikörper, die Reaktionszeiten, Perrhenataktivitäten und andere Bedingungen, im wesentlichen die gleichen sein, wie für Re-186- oder Re-188-Markierung, außer dass eine größere Menge an Zinnionen verwendet wird. Wenn das Radioisotop in dem Radioperrhenat im wesentlichen trägerfreies Re-188 ist, ist die Konzentration an Antikörper oder Antikörperfragment in der Lösung vorteilhafterweise ungefähr 1–20 mg/ml, bevorzugt ungefähr 10–20 mg/ml und die Menge an Zinnionen ist ungefähr 500–10,000 µg/ml, bevorzugt ungefähr 500–5,000 µg/ml. Wenn das Radioisotop in dem Radioperrhenat auf einem Träger hinzugefügtes Re-186 bei der gleichen Konzentration an Antikörper oder Antikörperfragment ist, beträgt die Menge an Zinnionen ungefähr 5–1,000 mg/ml, bevorzugt ungefähr 50–500 mg/ml.

[0043] Kupferionen sind auch fest chelatisiert durch schwefelhaltende chelatbildende Verbindungen. Cu-67 ist ein weiteres attraktives Radionuklid fdr Abbildung und Therapie. Es hat eine Halbwertszeit von ungefähr 2,6 Tagen, ein Beta-Emission (0,57 MeV), und eine Gamma-Emission (0,185 MeV), obwohl die Beta-Energie relativ niedrig ist. Cu-67 ist relativ teuer und gegenwärtig nicht einfach verfügbar, obwohl sich solche Bedingungen mit der entwickelnden Nachfrage verändern können. Cu-67 hat den Vorteil, dass es feste Chelate mit Thiolen bildet, das Markieren einfach und schnell ist, und kein reduzierendes Agens für das Radiometall erfordert.

[0044] Andere Radionuklide mit ähnlichen Chelatationseigenschaften wie, z. B. Quecksilber, Silber und Blei, könnten auch an Thiol enthaltende Verbindungen gemäß des Verfahrens der vorliegenden Erfindung gebunden werden. Hg-197 hat eine Halbwertszeit von ungefähr 1,5 Tagen, und emittiert Gamma-Strahlung in einem Energiebereich von 78-268 KeV, und Pb-203 ist ein starker Gamrna-Strahler bei ungefähr 275 KeV, mit einer Halbwertszeit von ungefähr 51 Stunden, Quecksilber und Eisen geeignet machend für Gamma-Szintigraphie. Ag-111 hat eine Halbwertszeit von ungefähr 7 Tagen und emittiert Beta-Strahlung von ungefähr 1,02 MeV, und Bi-212 ist ein Alpha-Strahler mit einer Halbwertszeit von ungefähr einer Stunde und eine Energie von 6,09 MeV, diese zu beträchtlichem Interesse für in vivo Therapie machend. Bi-212 wird in situ aus einem Pb-212-Vorläufer mit einer Emission von Gamma-Strahlung von

239 KeV mit einer Halbwertszeit von ungefähr 10,6 Stunden hergestellt. Folglich werden antikörper-tertiäre Thiol enthaltende Chelatbildner-Konjugate für Bi-212-Therapie Pb-212-markierte Konjugate sein können, und die Kurzformelbezeichnung Blei/Bismuth oder PbBi wird hierin verwendet, um das zu bezeichnen. Es wird selbstverständlich sein, dass die Erfindung nicht auf die beispielhaft erläuteten Radionuklide beschränkt ist, sondern allgemein anwendbar ist auf Ionen, die fest an Sulfhydrylgruppen binden.

[0045] Die oben erwähnten Markierungsbedingungen resultieren typischerweise in im wesentlichen 100%ige Inkorporation oder im wesentlichen quantitative Inkorporation des Markers in den Protein-Chelatbildner-Komplex. Überall in dieser Beschreibung bezeichnet der Satz „im wesentlichen quantitative Inkorporation", das es zu Rheniummarkierung gehört, mehr als ungefähr 80% Inkorporation, vorteilhafterweise mehr als 85% und mehr vorteilhafterweise mehr als ungefähr 90% Inkorporation. Zum Beispiel ist es jetzt möglich, $F(ab')_2$ beständig zu markieren, komplexiert mit einem tertiären Thiol enthaltenden Chelatbildner, mit von 5 bis 200 Mikrogramm Sn(II) pro Milligramm $F(ab')_2$, in im wesentlichen quantitative Menge. Weiterhin ist die Immunreaktivität dieses markierten Proteins kaum reduziert nach der Serum-Inkubation, zeigend, dass die radiomarkierten Protein-Chelatbildner-Konjugate noch komplett brauchbare Abbildungsagenzien bis zu mindestens 24 Stunden sind.

[0046] Bei den oben erwähnten Reaktionsbedingungen zum Technetiummarkieren ist kein Transchelator, wie z. B. Phosphonat, Tartrat, Glucoheptonat oder andere wohl bekannte Sn(II)-Chelatbildner, erforderlich, um das Zinn in Lösung zu halten, dennoch können solche Transchelatoren erfindungsgemäß verwendet werden. Sn(II)-Verbindungen, wie z. B. Zinnchlorid und Zinn, sind bevorzugt für den Gebrauch in dem vorliegenden Verfahren, obwohl andere schnell verfügbaren und herkömmlichen Sn(II)-Salze auch wirkungsvoll sind. Es gibt nur drei notwendige Inhaltsstoffe; das entschützte Protein-Chelatbildner-Konjugat, das wässrige Zinnion und die Pertechnetatlösung. Unter den hierin beschriebenen Reaktionsbedingungen können im wesentlichen 100% Tc-99m Inkorporation in Protein leicht erreicht werden.

[0047] Das resultierende radiomarkierte Protein ist für die Verwendung in szintigraphischer Abbildung von z. B. Tumoren, infektösen Läsionen, Mikroorganismen, Blutgerinsel, Herzinfarkten, atherosklerotischen Ablagerungen oder normalen Organen und Geweben geeignet. Solche Abbildungsverfahren sind in der Technik wohl bekannt. Die wie oben hergestellten radiomarkierte Proteinlösungen sind bereit für unmittelbare Injektion, falls in einem richtig sterilisierten, pyrogenfreien Fläschchen hergestellt. Auch ist kein Blockieren von freien Sulfhydrylgruppen nach dem Technetiumbinden für Stabilisierung notwendig.

[0048] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist insbesondere attraktiv für das Markieren von Ganze Antikörpern und Antikörperfragmenten, obwohl Proteine, wie z. B. Albumin, Drogen, Cytokine, Enzyme, Hormone, Immunmodulatoren, Rezeptorproteine und ähnliches auch markiert werden können. Antikörper enthalten eine oder mehrere Disulfidbindungen, welche die schweren Ketten verbinden, als auch Disulfidbindungen, welche leichte und schwere Ketten zusammen binden. Bekannte Verfahren, die Spaltung dieser Disulfidbrücken beinhalten, beginnen typischerweise damit, nur die Disulfidbindungen, die die schweren Ketten verbinden, zu spalten, und die Disulfidbindungen, die die leichten und schweren Ketten zusammen binden. Unglücklicherweise können diese Verfahren manchmal unerwünschte Spaltung der Disulfidbrücken verursachen, die die leichten und schweren Ketten an einander binden, falls nicht mit Vorsicht ausgeführt, dadurch den Antikörper nutzlos machen. Zusätzlich kann die Verwendung von Chelatbildnern, die freie Thiolgruppen haben, auch in Spaltung von Disulfidbindungen in dem Protein resultieren. Das vorliegende Verfahren vermeidet spezifisch solche unerwünschte Spaltung durch die Verwendung des geschützten tertiären Thiol enthaltenden Chelatbildners und durch Komplexieren des selben mit einer funktionellen Gruppe an dem Ganze Antikörper oder an das Ganze Antikörperfragment, vorzugsweise an eine Amingruppe, dadurch die Disulfidbindungen intakt lassend.

[0049] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung umfasst auch die Verwendung eines wasserlöslichen Transferliganden, der mit dem reduzierten Radionuklid komplexiert. Im Allgemeinen sind die Transferliganden, die in einer alternativen Ausführung von der vorliegenden Erfindung nützlich sind, wasserlösliche (oder können wasserlöslich gemacht werden) Chelatbildner, welche in der Lage sind, Technetium-99m oder jegliche der Rhenium-Radioisotope in reduziertem Zustand oder andere bekannte Radioisotope zu komplexieren, um einen stabilen Metallion/Ligandkomplex zu bilden. Der Komplex ist ferner in der Lage, das Radioisotop mit angehängten Sulfhydrylgruppen, die auf dem Protein-Chelatbildner-Konjugat vorliegen, nach der Entschützung der Thiolgruppe(n) auszutauschen. Beispiele von geeigneten Transferliganden beinhalten Glucoheptonat, Tartrat, DTPA, EDTA, Di-, Tri- oder Polyalkylphosphonate, Pyrophosphat oder Glycin und seine Derivate. Für den Fachmann ist klar, dass jeglicher Chelatbildner, der in der Lage ist, mit reduziertem Radionuklid zu komplexieren, und danach das reduzierte Radionuklid zu angehängten Sulfhydrylgruppen zu transferieren nützlich sind in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung (siehe z. B. Dean, U.S. Patent Nr. 5,180,816 und/oder Shochat et al., U.S. Patent Nr. 5,061,641, die Offenbarungen von jedem sind hier durch Referenzen in ihrer Gesamtheit eingeschlossen).

[0050] Die vorliegende Erfindung beinhaltet auch eine alternative Ausführungsform, worin das thiolgebundene Radiometall mit einem oder mehreren exo-

genen Liganden „gedeckelt" ist (siehe Shochat et al., oben). Diese Liganden sind im allgemeinen entwickelt, um den Koordiationsbereich des Ions zu komplettieren und die Sulfhydrylgruppe(n), die schon durch das Protein-Chelatbildner-Konjugat zur Verfügung gestellt wurden, zu komplementieren. Ein Gleichgewicht muss eingestellt werden zwischen Liganden, die das Ion so stark binden, dass sie die Schwefel-Metall-Bindungen) zu der proteinreaktiven Gruppe/zu den proteinreaktiven Gruppen schwächen und die Stabilität des markierten Radiometalls im Serum reduzieren, und solchen, die ungenügende Chelatierungskraft zur Verfügung stellen, so dass das Ion leicht aus dem Protein durch andere exogene Liganden in Serum oder Knochenmark oder in Organen, wie z. B. der Leber, der Milz, der Nieren, wo Beseitigung stattfindet, extrahiert werden kann. Der Fachmann ist in der Lage, dieses Gleichgewicht unter Verwendung von bekannten chemischen Prinzipien einzustellen, und ist in der Lage, einen geeigneten exogenen deckelnden Liganden zu entwerfen.

[0051] Ein Kit für die Verwendung beim Radiomarkieren eines Proteins, z. B. eines Fab' oder $F(ab')_2$-Fragments oder eines intakten Antikörpers, mit Tc-99m unter Verwendung von einem mit einem Generator hergestellten Pertechnetat würde ungefähr 0,01–10 mg pro Einheit eines Antikörpers oder Antikörperfragments mit einschließen, dass spezifisch an Antigen bindet, das assoziiert ist mit einem Tumor, einer infektösen Läsion, einem Mikroorganismus, einem Herzinfarkt, einem Blutgerinsel, artherosklerotischer Ablagerung oder einem normalen Organ oder Gewebe, und welches ferner an einen geschützten tertiären Thiol enthaltenden Chelatbildner konjugiert ist, um ein Antikörper-Acetyl-t-Thiol-Derivat zu bilden, das entschützt ist, um ein Antikörper-t-Thiol-Dertivat zu bilden. Der Kit würde auch ungefähr 0,1–50 µg pro Einheit Zinnionen enthalten. Die Bestandteile des Kits werden unmittelbar vor dem Gebrauch mit ungefähr 2–50 mCi Tc-99m Pertechentat pro mg Antikörper oder Antikörperfragment vereinigt. Das Antikörper/Antikörperfragment-t-Thiol-Derivat und das Sn(II) reduzierende Agens werden vorteilhafterweise in einer einzelnen Lösung in einem Fläschchen, zum Beispiel in einem Flüssigstickstoffbad, oder lyophilisiert, vorzugsweise mit dem zugefügten Zucker, wie es in der Technik wohl bekannt ist, gelagert werden kann, vor der Zugabe des Pertechnetats vereinigt. Veränderungen, die das Hinzufügen von herkömmlichen Reagenzien der vorhergehenden Kits einschließen, sind innerhalb der routinierten Qualifikation vom Fachmann gut.

[0052] Falls das Antikörper/Antikörperfragment-Acetyl-t-Thiol-Derivat verwendet wird, kann es vor dem Mischen mit dem reduzierenden Agens geschützt werden oder nach dem Mischen. Dennoch muss das geschützte Antikörper/Antikörperfragment-Acetyl-t-Thiol-Derivat vor der Reaktion mit Radionuklid entschützt werden. Obwohl das entschützende Agens und das Radionuklid rechtzeitig zu der Lösung hinzu gefügt werden können, ist der Reaktionsablauf im allgemeinen (i) Entschützen der geschützten Antikörper/Antikörperfragment-Acetylt-Thiol-Derivats und Reduktion des Radionuklids (ii) Markierung des Konjugats. Dennoch wird vorteilhafterweise das Antikörper/Antikörperfragment-Acetyl-t-Tthiol-Derivat vor dem Mischen mit dem reduzierenden Agens entschützt und einem Kit gelagert. Nach dem Lesen der vorliegenden Ausführung ist Fachpersonal in der Lage, ein Verfahren und ein Kit unter der Verwendung von entweder geschützten oder ungeschützten Antikörper/Antikörperfragment-Acetyl-t-Thiol-Derivats zu entwerfen.

[0053] Die Proteine in den Kits der vorliegenden Erfindung sind vorteilhafterweise gefroren oder lyophilisiert in sterilen Behältern und unter einer inerten Gasatmosphäre, vorteilhafterweise gekühlt und gelagert in einem Flüssigstickstoffbad und vorsichtig aufgefroren unmittelbar vor Gebrauch. Die Kits sind in geeigneter Weise ergänzt mit sterilen Pufferfläschchen, Salzlösung, Spritzen, Filter, Säulen und ähnlichen Hilfsmitteln, um die Zubereitung von injizierbaren Zubereitungen, die bereit sind für den Gebrauch durch den Krankenhausarzt oder Techniker, zu erleichtern.

[0054] In einer insbesondere bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das Radiomarkieren eines Proteins durch Konjugieren (N-Hydroxysuccinimidyl) N-(3-Methyl-3-aclmercaptobuturyl)glycinat („Chelatbildner") mit Antikörpern (gesamt oder Fragmente) durch Reaktion von Protein mit einem molaren Überschuss an Chelatbildner bei pH 7,5 bewirkt. Die Anzahl der hinzugefügten Thiols zu Antikörper kann durch Verändern des molaren Überschusses an angewendetem Chelatbildner verändert werden. Das Protein-Chelatbildner-Konjugat wird dann vorzugsweise durch herkömmliche Mittel aufgereinigt, und das aufgereinigte Konjugat kann wie und wann nötig thiolentschützt werden, und sobald es Thiol entschützt ist, wird das resultierende Produkt sofort mit Zinnchlorid formuliert und als ein Kit, als Lyophilisat, in versiegelten Fläschchen unter einer Argonatmosphäre oder in Vakuum gelagert. Diese Kit ist dann bereit zu Mischen mit dem Radionuklid.

[0055] Es ist für den Durchschnittsfachmann klar, dass die radiomarkierten Proteine, besonders Antikörper und Antikörperfragmente, hergestellt nach dem Verfahren der Erfindung, passend und in der Tat besonders geeignet und wirksam in Verfahren des nicht-invasiven szintigraphischen Abbildens und für Radioantikörpertherapie für Tumore und Läsionen sind. Insbesondere ein Verfahren zur Abbildung eines Tumors, einer infektösen Läsion, eines Herzinfarkts, eines Blutgerinsels, einer atherosklerotischen Ablagerung oder eines normalen Organs oder Gewebes, worin ein Protein, Antikörper oder Antikörperfragment, welcher/welches spezifisch an Antigen, produziert von oder assoziiert mit dem Tumor usw.; und radiomarkiert mit einem pharmazeutisch inerten Radioisotop, das in der Lage ist, extern defektiert zu werden, parenteral einem Menschen injiziert wird

und, nach einer ausreichenden Zeit, um das radiomarkierte Protein, den radiomarkierten Antikörper oder das radiomarkierte Antikörperfragment zu lokalisieren, und den Nicht-Target-Hintergrund aufzuhellen, wird die Stelle oder die Stellen des Zuwachses des radiomarkierten Proteins, Antikörpers oder Antikörperfragments durch eine externe abbildende Kamera defektiert. Es ist eine Verbesserung, als das radiomarkierte Protein, den radiomarkierten Antikörper oder das radiomarkierte Antikörperfragment ein markiertes Protein, einen markierten Antikörper oder ein markiertes Antikörperfragment, hergestellt gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, zu verwenden. Solches radiomarkierte Protein, solch radiomarkierter Antikörper oder Antikörperfragment werden nicht signifikant in die Leber verschwinden, werden ein gutes Tumor-zu-Nicht-Tumor-Verhältnis zur Verfügung stellen und werden ausgezeichnet „in vivo targeting" zum Tumor zu Verfügung stellen.

[0056] Ein Radioantikörpertherapieverfahren an einem Patienten, der an einem Tumor oder an einer infektösen Läsion leidet, wobei ein Protein, Antikörper oder Antikörperfragment, welches/welcher spezifisch an ein Antigen bindet, welches produziert von oder assoziiert ist mit einem Tumor oder einer infektösen Läsion, und mit einem therapeutisch wirksamen Radioisotop radiomarkiert ist, parenteral eine Menschen, der an solch einem Tumor oder solch einer infektösen Läsion leidet, injiziert wird, wird zudem dadurch verbessert, dass als das radiomarkierte Protein, der radiomarkierte Antikörper oder das radiomarkierte Antikörperfragment ein rheniummarkiertes Protein, einen rhenium-radiomarkierten Antikörper oder rhenium-radiomarkiertes Antikörperfragment zu verwenden, welches gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung gemacht wurde.

[0057] Ohne weitere ausführliche Darstellung wird angenommen, dass ein Fachmann, unter Verwendung der vorangehenden Beschreibung und der folgenden Beispiele die vorliegende Erfindung in ihrem vollsten Umfang nutzen kann. Die folgenden bevorzugten spezifischen Ausführungsformen sind deshalb dahingehend als lediglich veranschaulichend auszulegen, und nicht als limitierend der Anwartschaft der Offenbarung, in welchem Weg auch immer. Zusätzlich werden alle der vorher genannten Dokumenten in dieser Beschreibung durch Bezugnahme hierin in ihrer Gesamtheit mit eingeschlossen.

Beispiele

Beispiel 1: Zubereitung von (N-Hydroxysuccimidyl) N-(3-Methyl-3-acylmercaptobuturyl)glycinat:

[0058] Eine Lösung von 1,68 g (10 mmol) Glycin-t-butylester-Hydrochlorid und 1,4 ml Triethylamin in 50 ml Methylenchlorid wurde gerührt, und das gefällte Triethylammoniumchlorid wurde filtriert. Das Filtrat wurde auch ungefähr 100 ml verdünnt, gemischt mit 1,4 ml Triethylamin und tropfenweise hinzugegeben zu einer Lösung Dimethylacroylchlorid (10 mmol) in Methylenchlorid (10 ml) unter einer inerten Atmosphäre. Die Reaktionsmischung wurde 18 Stunden lang gerührt, mit Wasser (3 × 10 ml) und Lauge (10 ml) gewaschen und getrocknet (wasserfreies Na_ZSO_4). Blitzchromotographie auf Kieselgel (230–400 mesh) unter Verwendung einer Gradienteneluation mit einer Ethylacetat/Hexan-Mischung ergab 1,0 g (50%) N-(3,3-Dimethylacroyl)glycin t-butylester als eine gelbe Flüssigkeit.

[0059] Der N-(3,3-Dimethylacroyl)glycin t-butylester wurde dann in einem Überschuss (5 ml) von Thiolessigsäure aufgelöst und unter Rückfluss (Badtemperatur 95°C) 3 Stunden lang erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde gekühlt, verdünnt mit Diethylether, gewaschen mit 5%iger wässriger Essigsäure, Wasser und Lauge und dann getrocknet (wasserfreies Na_2SO_4). Das Abdampfen der Lösungsmittel ergab einen Rest, welcher mit 10 ml Trifluoressigsäure (TFA) 2 Stunden lang gerührt wurde. Das Abdampfen der TFA ergab einen Rest, welcher durch Blitzchromatographie (auf Kieselgel, 230–400 Netz; Methanol/Methylenchlorid-Gradient) aufgereinigt wurde. Das Produkt (ein gelber wachsartiger Feststoff), N(3-Acetylmercapto-3-methylbutyryl)glycin, wurde durch IR und Proton-NMR-Spektren charakterisiert. Das Proton NMR-Spektrum (400 MHz; $CDCl_3$) zeigte Signale bei 1,52 (s, 6H), 2,26 (s, 3H), 2,87 (s, 2H), 4,06 (d, 2H, J = 5,6) und 6,42 (s br. 1H).

[0060] Das oben erhaltene gelbe wachsartige Festprodukt (363 mg) wurde in 10 ml Methylenchlorid gelöst und mit N-Hydroxysucchinimid (180 mg; 1 Äquivalent) und Dicyclohexylcsrbodiimid (322 mg, 1 Äquivalent) behandelt. Die Reaktionsmischung wurde 18 Stunden lang unter Argon gerührt. Der gefällte Dicyclohexylharnstoff wurde filtriert, und das Filtrat wurde konzentriert. Der Rest wurde aus Isopropanol kristallisiert, um (N-Hydroxysuccinimidyl)-N-(3-Methyl-3-acylmercaptobutyryl)glycinat als einen cremefarbigen Feststoff (Gehalt 335 mg) zu erhalten.

Beispiel 2: Konjugation von (n-Hydroxysuccinimidyl)-N-(3-Methyl-3-acylmercaptobutyryl)glycinat an murines $F(ab)_2$:

[0061] Eine Lösung eines herkömmlich erzeugten monoklonalen murinen Antikörpers gegen CEA in 50 mM Hepes/150 mM Salzlösung (pH 7,5), Immu-14 $F(ab)_2$ (885 µl, 6,26 mg), hergestellt aus IgG, aufgereinigt aus Ascyten, und Papain verdaut in der Abwesenheit von Cystein, wurde mit einem Vortexmischer mit 25 µl DMF gemischt. Zu dieser Lösung wurden unter Vortex-Mischen 11 µl einer DMF-Lösung von (N-Hydroxysuccinimmidyl)-N-(3-Methyl-3-acylmercaptobutyryl)glycinat (2,3 mg in 345 µl DMF; Chelatbildner/Antikörper molares Verhältnis von 4) hinzugefügt. Die resultierende klare Lösung wurde 18 Stunden lang bei 4°C gehalten oder bei Raumtemperatur 2 Stunden lang, um ein antikörperchelatbildendes Agenskonjugat herzustellen. Das Konjugat wurde

aufgereinigt durch zentrifugierte Größenausschlußchromotographie auf Sephadex 50/80 in 0,1 M Natriumphosphat und bei pH 7. Dieses Material wurde in einem Kühlschrank gelagert und nach Bedarf thiolentschützt (Beispiel unten).

Beispiel 3: Thiolentschützung des Konjugats:

[0062] Ein Hundert Mikroliter (100 µl) des Konjugats, hergestellt wie oben im Beispiel 2 beschrieben, wurden mit 20 µl 1 M wässrigem Hydroxylamin (pH 8) in einem 0,6 ml Eppendorf-Fläschchen gemischt, mit einem Vortexmischer gemischt, und mit Argon 1 Minute lang gespült. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Produkt auf einer Größenausschluss-Säule (Sephadex 50/80, 50 mM Acetat/150 mM Salzlösung, pH 5,3) aufgereinigt. Das Eluat wurde im Hinblick auf die Konzentration und freien Thiolgehalt analysiert. Ein Ellmans Assay ergab unter der Verwendung von 10 mM 5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)(DTNB) in 0,1 M PBS, pH 7, einen Wert von 1,1 Thiolgruppen/Antikörper, welches einen Durchschnitt von 1,1 Äquivalenten (N-Hydroxysuccinimidyl)-N-(3-Methyl-3-acylmercaptobutyryl)glycinat pro Antikörper anzeigt.

[0063] Die Konjugationsreaktion wurde unter der Verwendung von 6 Äquivalenten (N-Hydroxysuccinimidyl)-N-(3-Methyl-3-acylmercaptobutyryl)glycinat wiederholt, um ein Konjugat mit einem Durchschnitt von 1,8 bis 2,2 Thiolgruppen pro Antikörper zu erhalten.

Beispiel 4: Formulierung Lyophilisierung und Technetium-99m-Markierung des thiolentschützten Konjugats von Beispiel 3:

[0064] Frisches thiolentschützte $F(ab')_2$-Konjugat (200 µg, 1,1 Thiol pro Antikörper), hergestellt gemäß Beispiel 3, wurde mit einer Lösung von 25 µg Zinn(II) in 150 µl Tratrat(9,2 mM)-Acetat (50 mM)-Salzlösung (150 mM)-Puffer gemischt und in einem 2 ml Glasfläschchen lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde unter Vakuum in einem versiegelten Fläschchen gelagert.

[0065] Das Tc-99-Radiomarkieren wurde durch Hinzufügen von 1 ml (Tc-99)Pertechnetat-Generatoreluat durchgeführt, um eine spezifische Aktivität von 5 mCi/mg zu erreichen. Das Markieren wurde an einem Antikörper-Chelatisierungsmittlel-Konjugat, sowohl mit als auch ohne Lyophilisierung, durchgeführt. Radio-HPLC-Analyse, ausgeführt ungefähr 30 Minuten nach dem Markieren, ergab eine 100%tige Inkorporation der Radioaktivität in das Antikörper-Chelatisierungsmittel-Konjugat. Gleiches Markieren des Lyophilisats zeigte ein Inkorporation von 97%.

Beispiel 5: Bioverteilung von Tc-99-markiertem Immu-14 F(ab) in Nacktmäusen, die das humane Darmtumor-Heterotransplantat LS174T tra gen:

[0066] Frisches thiolentschützte Antikörper-Chelatisierungsmittel-Konjugat (200 µg, 1,89 Thiolgruppen pro Antikörper) wurde mit 2 mCi Tc-99m-Glycoheptonat in einem Gesamtvolumen 1 ml markiert. HPLC-Analysen, durchgeführt an dem radiomarkierten Material als auch an dem Antikörper-Antigen-Komplex, gebildet durch eine kurze Inkubation des radiomarkierten Fragments mit CEA, ergab, dass das Produkt im Hinblick auf die radiochemische Reinheit und Immunreaktivität zufriedenstellend war.

[0067] Das markierte Konjugat wurde intravenös 10 LS-174T tumortragenden weiblichen Nacktmäusen in einem Alter von 11 Wochen verabreicht. 5 Mäuse wurden nach 4 beziehungsweise 24 Stunden nach der Injektion getötet. Organe wurden herausgeschnitten, und dann wurde der Prozentanteil der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe, der Prozentanteil der injizierten Dosis pro Organ und die Tumor-zu-Nicht-Target-Organverhältnisse erhalten. Die Tumoraufnahme betrug 4,2 und 4,4% ID/g bei 4 Stunden beziehungsweise 24 Stunden. Das Tumor-zu-Blut-Verhältnis stieg von 1,2 bei 4 Stunden zu 9,4 bei 24 Stunden an. Diese Ergebnisse weisen auf eine Retention in vivo Targeting-Fähigkeit, eine schnellere Beseitigung als gesamt IgG und gleiche Tumor-zu-Blut-Verhältnisse zu Tc-Fab' an.

Beispiel 6: Herstellung des Konjugats von humanisiertem Immu-14 $F(ab')_2$ und Tc-99m-Markieren:

[0068] Eine Lösung von 1,12 mg (5,5 mg/ml) eines herkömmlich hergestellten humanen monoklonalen Antikörpers gegen CEA in 50 mM Hepes/150 mM Salzlösungspuffer (pH 7,5), humanisiertes Immu-14 $F(ab')_2$, wurde mit einem sechsfachem Überschuss an (N-Hydroxysuccinimidyl)-N-(3-Methyl-3-acylmercaptobutyryl)glycinat 2 Stunden lang bei 30°C inkubiert. DMF (5% v/v) wurde als Co-Lösungsmittel verwendet. Aufreinigung durch zentrifugierte Größenausschuss-Chromotographie (Sephadex 50/80, äquilibriert in 0,1 M Natriumphosphat, bei pH 7) enthielt ein reines Konjugat, welches mit 0,16 M (Endkonzentration) wässrigen Hydroxylamin (pH 8) für 10 Minuten bei Raumtemperatur thiolentschützt wurde. Zwei aufeinander folgende Aufreinigungen (an Sephadex 50/80, 0,1 M Natriumacetat, pH 6,5) stellte das thiolentschüzte Konjugat zur Verfügung, welches gründlich mit Argon gereinigt wurde, und auf Eis gelagert wurde. Das Ellmans Assay für Thiole unter Verwendung von 10 mM DTNB ergab einen Wert von 2,2 Thiolgruppen pro Antikörpermolekül.

[0069] Ungefähr 200 µg des oben zubereiteten Konjugats, weiterhin gepuffert mit einem Zehntel seines Volumens mit Natriumacetat bei pH 6, wurde mit 1 mCi Tc-99m Glycoheptonat (wie oben angegeben frisch zubereitet) gemischt. Analyse durch Radio-HPLC nach 20 Minuten nach dem Markieren ergab, dass >95% der Radioaktivität mit dem humanisierten Antikörper assoziiert war, davon waren nur 5,5% in der Form von höher Molekulargewichtmaterial.

[0070] Die Erfindung ist mit Verweis auf besonders bevorzugte Ausführungsformen, wie oben beschrieben, beschrieben worden. Der Fachmann erkennt, dass verschiedene Modifikationen an der vorliegenden Erfindung durchgeführt werden können, ohne im wesentlichen vom Sinn und Bereich davon abzuweichen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Radiomarkieren eines Proteins mit Technetium oder Rhenium umfassend Inkontaktbringen eines Gemisches aus einem Konjugat des Proteins und eines für Pertechnetat oder Perrhenat reduzierenden Agens mit Radiopertechnetat oder Radioperrhenat, wobei das Proteinkonjugat einen an das Protein kovalent gebundenen Komplexbildner umfasst und wobei der Komplexbildner eine N-(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente umfasst.

2. Verfahren zum Radiomarkieren eines Proteins mit Technetium umfassend Inkontaktbringen eines Konjugats des Proteins mit reduziertem Radiopertechnetat, wobei das Proteinkonjugat einen an das Protein kovalent gebundenen Komplexbildner umfasst und wobei der Komplexbildner eine N-(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das reduzierte Radiopertechnetat mit Glucoheptonat vor dem Inkontaktbringen mit dem Protein chelatisiert wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Protein ein $F(ab')_2$- oder $F(ab)_2$-Antikörperfragment ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Komplexbildner kovalent an eine Aminofunktion des Proteins gebunden ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Komplexbildner kovalent an das Protein durch eine Amidbrücke gebunden ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Komplexbildner kovalent an das Protein durch eine Diglycin- oder Triglycin-Brücke gebunden ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die N-(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente durch Entschützung einer N-(3-Methyl-3-acylmercaptobutyryl)glycinat-Komponente unter Verwendung von Hydroxylamin hergestellt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Komplexbildner mit Tc-99m, Re-186 oder Re-188 komplexiert ist.

10. Diagnosekit, der zur Bildung einer einem humanen Patienten zu verabreichenden Zusammensetzung geeignet ist, der eine sterile Packung umfasst, enthaltend (i) ein Proteinkonjugat umfassend einen an ein Protein kovalent gebundenen Komplexbildner, wobei der Komplexbildner eine N(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente umfasst; und (ii) ein für Pertechnetat oder Perrhenat reduzierendes Agens, das in einem späteren Schritt zuzufügen ist.

11. Proteinkonjugat umfassend einen an ein Protein kovalent gebundenen Komplexbildner, wobei der Komplexbildner eine N-(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente umfasst.

12. Kit oder Konjugat nach Anspruch 10 oder Anspruch 11, wobei das Protein ein $F(ab')_2$- oder $F(ab)_2$-Antikörperfragment ist.

13. Kit oder Konjugat nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das Proteinkonjugat lyophilisiert ist.

14. Proteinkonjugat zur Verwendung in der Radioimmuntherapie, das mit einem pharmazeutisch inerten Radioisotop des Technetium oder Rhenium markiert ist, wobei das Proteinkonjugat einen an ein Protein kovalent gebundenen Komplexbildner umfasst und wobei der Komplexbildner eine N(3-Methyl-3-mercaptobutyryl)glycinat-Komponente umfasst.

15. Proteinkonjugat zur Verwendung nach Anspruch 14, zur Verwendung bei parenteraler Injektion in einen humanen Patienten und, nach einer ausreichenden Zeit, um das radiomarkierte Protein zu lokalisieren und den Nicht-Target-Hintergrund aufzuhellen, beim Nachweis der Stelle oder Stellen der Zunahme des radiomarkierten Proteins durch eine externe abbildende Kamera.

16. Proteinkonjugat zur Verwendung nach Anspruch 14 oder Anspruch 15, wobei das Protein spezifisch an einen Antikörper bindet, der von einem Tumor, einer infektiösen Läsion, einem Herzinfarkt, einem Blutgerinnsel, einer atherosklerotischen Plaque oder einem normalen Organ oder Gewebe produziert wird von oder mit diesem/r assoziiert ist.

17. Proteinkonjugat zur Verwendung nach Anspruch 14, wobei das pharmazeutisch inerte Radioisotop Re-186 oder Re-188 ist und wobei das Proteinkonjugat spezifisch an einen Tumor oder eine infektiöse Läsion bindet, zur Verwendung in einem Verfahren der Radioimmuntherapie durch parenterale Verabreichung an einen Patienten, der an einem Tumor oder einer infektiösen Läsion leidet.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen