(19) Republik Österreich Patentamt

(11) Nummer: AT 392 004 B

(12) # PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 3916/82

(51) Int.Cl.[5] : A61K 49/02

(22) Anmeldetag: 25.10.1982

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1990

(45) Ausgabetag: 10. 1.1991

(30) Priorität:

27.10.1981 US 315286 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A 0005638

(73) Patentinhaber:

HYBRITECH INCORPORATED
92121 SAN DIEGO (US).
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
94720 BERKLEY (US).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS GEGEN TUMOR-ASSOZIIERTES ANTIGEN UND DESSEN VERWENDUNG

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung eines radioaktiv markierten monokloanen Antikörpers gegen Tumor-assoziiertes Antigen, das sich dadurch auszeichnet, daß man ein metallisches Radionuklid mit dem Antikörper zur Ausbildung einer direkten Bindung mit dem Radionuklid umsetzt oder den Antikörper mit einem Chelatbildner unter Ausbildung eines Antikörper-Chelatbildner-Konjugats umsetzt und hierauf das Konjugat mit dem Radionuklid zur Ausbildung einer Bindung des Radionuklids mit dem Chelatbildner zur Reaktion bringt. Bei parenteraler Verabreichung an ein Lebewesen lokalisiert sich der markierte monoklonale Antikörper im Tumor und kann durch Feststellung der emittierten Strahlung aufgefunden werden.

AT 392 004 B

Die vorliegende Erfindung liegt auf dem Gebiet der Feststellung von Tumoren. Im speziellen bezieht sich die Erfindung auf die Herstellung monoklonaler Antikörper, die mit Radionukliden markiert sind.

Seit langem wird nach einer verläßlichen Methode für die ortspezifische Feststellung von Tumoren gesucht. Es sind Methoden zur Feststellung von beispielsweise karzinoembryonalem Antigen (CEA) beschrieben worden, das mit humanen Karzinomen assoziiert ist und in dem Blutstrom zirkuliert, siehe US-PS 3,663,684 und 3,697,638. Diese Methoden können offensichtlich nicht zur Bestimmung des Ortes des Tumors benützt werden. Vor einiger Zeit wurde vorgeschlagen, mit radioaktiven Isotopen von Jod markierte Antikörper zu verwenden, um eine Antigensubstanz festzustellen, die mit einem Tumor assoziiert ist. So wird in der US-PS 3,927,193 ein Verfahren beschrieben, das mit ^{125}I und ^{131}I markierte CEA-Antikörper verwendet. Gemäß dieser Patentschrift wurde bei Experimenten, bei welchen männliche syrische Hamster verwendet wurden, in welche humanes Signet-Ringzellkarzinom eingeführt worden war, durch Injektion von markiertem Ziegen-Anti-CEA mit nachfolgender Überprüfung der Organe der Tiere gezeigt, daß das Radioisotop in dem Tumor lokalisiert wurde. Daher wurde vorgeschlagen, daß die Lokalisierung eines Tumors beim Menschen durch eine Verabreichung einer parenteralen Lösung des Antikörpers in vivo mit anschließendem Fotoscanning des Wirtes bestimmt werden könnte.

Die tatsächliche Verwendung von radioiodierten Antikörpern ist den durch die frühere Arbeit hervorgerufenen Erwartungen nicht gerecht geworden. So berichteten beispielsweise Goldenberg und Mitarbeiter, N. Eng. J. Med., 298, 1384-1388 (1978), einen gewissen Erfolg im Jahr 1978 beim Scannen von Menschen mit radioiodiertem Anti-CEA. Zufolge der verbleibenden Hintergrundradioaktivität hing der mitgeteilte mäßige Erfolg von der Anwendung von Subtraktionsmethoden ab. Mach und Mitarbeiter, N. Eng. J. Med., 303, 5-10, (1980), berichteten über sogar noch weniger Erfolg und bestimmten, daß nur 0,1 % der verabreichten Dosis im Tumor lokalisiert wurde. In bestimmten ausgewählten Fällen war jedoch eine Abbildung des Tumors noch immer möglich.

Es ist allgemein bekannt, daß die Affinitätsreinigung von heterologen Antiseren zur Gewinnung der Antikörper, wie sie in Tumorabbildungsverfahren nach dem früheren Stand der Technik verwendet wurden, üblicherweise zum Verlust von Antikörper mit hoher Affinität führen und daß die erhaltenen Antikörper, die ein Gemisch aus spezifischen Antikörpern für unterschiedliche Determinanten an dem Antigen darstellten, überwiegend Antikörper mit niedriger Affinität und Antikörper umfassen, die unspezifische Reaktionen ergeben. Anderseits können monoklone Antikörper ausgewählt werden, um hohe Affinität zu ausgewählten Stellen am Antigen und eine niedrige unspezifische Bindung zu zeigen. Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß mit Radioisotopen von Jod gemäß bekannten Verfahren markierte monoklone Antikörper zu Tumorantigenen noch immer eine geringe Lokalisierung an der Tumorstelle zeigen, obwohl in vitro eine Immunreaktivität demonstriert werden kann. Dies kann auf den Verlust von radioaktivem Jod aus dem markierten Antikörper zurückzuführen sein; wahrscheinlich trifft diese Annahme zu. Es besteht daher nach wie vor ein Bedarf nach einer verläßlichen Methode zur in vivo-Feststellung der genauen Lokalisierung eines Tumors.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein monoklonaler Antikörper oder ein Antikörperfragment zu einem Tumorantigen entweder direkt mit einem metallischen Radionuklid oder mit einem chelatgebundenen Radionuklid, beispielsweise DTPA-gebundenem ^{111}In, markiert, indem ein Chelatbildner mit dem Antikörper konjugiert und anschließend ein Komplex zwischen dem Chelatbildner und dem Radionuklid gebildet wird. Der erhaltene markierte Antikörper oder ein Fragment hievon lokalisiert sich bei Injektion in einen den Tumor aufweisenden Wirt rasch und mit hoher Spezifität im Tumor selbst. In einigen Fällen kann auch eine Lokalisierung in entfernten Metastasen auftreten, um die Ausbreitung des Tumors anzuzeigen. Die Lokalisierung des Tumors kann mit Fotoscan-Methoden festgestellt werden. Es können auch Gemische aus markierten monoklonen Antikörpern verwendet werden.

Ein Ziel der vorliegenden Erfindung besteht somit darin, monoklonale Antikörper zu tumorassoziierten Antigenen zu erzielen, welche Antikörper mit metallischen Radionukliden markiert sind.

Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht in der Schaffung eines verbesserten Verfahrens zur Abbildung von Tumoren in einem infizierten Wirt.

Die Erreichung dieser und damit verbundener Ziele wird bei Betrachtung der beiligenden Zeichnungen und der nachfolgenden genauen Beschreibung der Erfindung ersichtlich.

Fig. 1 ist eine Gruppe von grafischen Darstellungen, welche die Verteilung von ^{111}In und ^{125}I im Gewebe im Vergleich mit der Verteilung von ^{67}Ga als Funktion der Zeit nach Injektion von mit ^{111}In und ^{125}I bzw. ^{67}Ga-Citrat markiertem Anti-CEA in mit humanem Darmkrebs infizierte nackte Mäuse illustrieren.

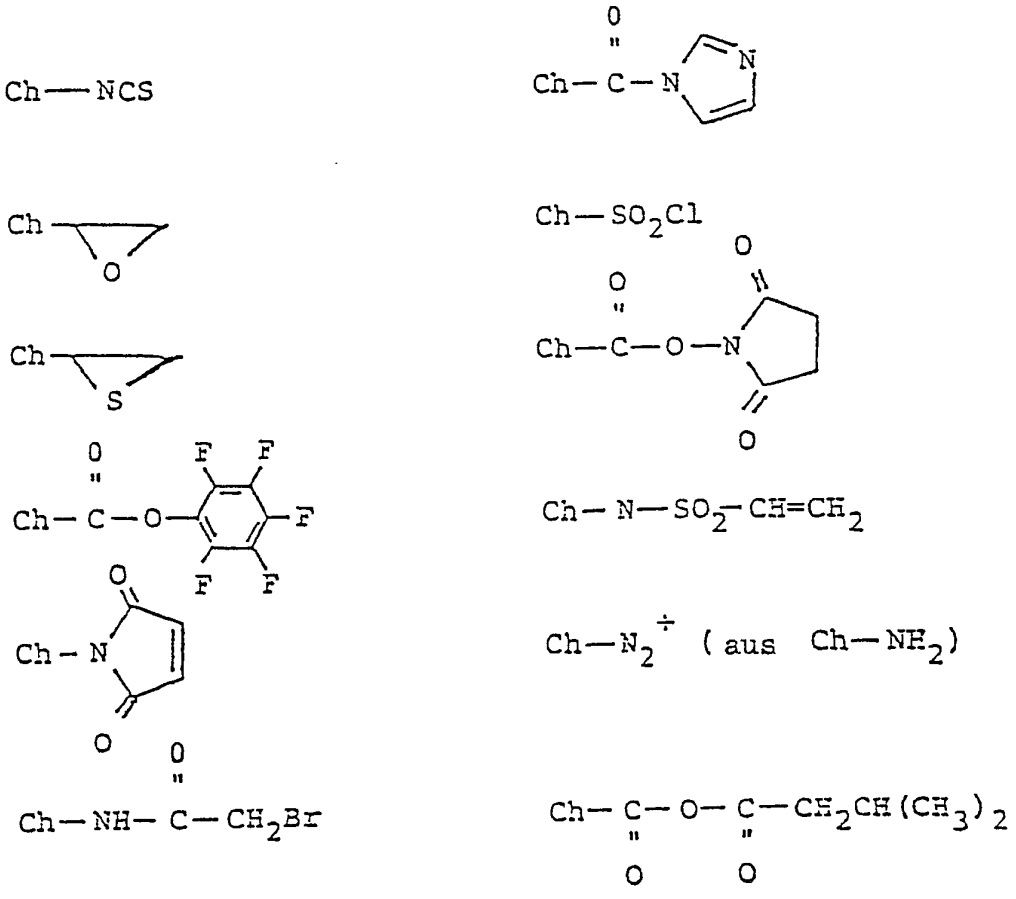
Fig. 2 ist eine Gruppe von grafischen Darstellungen, welche die Mengen an ^{111}In und ^{125}I und ^{67}Ga illustrieren, die von nackten Mäusen mit zunehmender Zeit nach Injektion von mit ^{111}In und ^{125}I markiertem Anti-CEA und von ^{67}Ga-Citrat ausgeschieden werden.

Fig. 3 zeigt eine Gruppe von grafischen Darstellungen, welche die Verteilung von ^{111}In und ^{125}I im Gewebe in nackten Mäusen 48 h nach Injektion von ^{111}In- und ^{125}I-markiertem Anti-CEA, verglichen mit ^{111}In-Citrat und ^{125}I-markiertem Humanalbumin, illustrieren.

Fig. 4 ist eine Gruppe von grafischen Darstellungen, welche die Tumor/Gewebe-Verhältnisse von ^{111}In und ^{125}I, verglichen mit ^{67}Ga, nach Injektion von ^{111}In- und ^{125}I-markiertem Anti-CEA und von ^{67}Ga-Citrat in nackte Mäuse als Funktion der Zeit illustrieren.

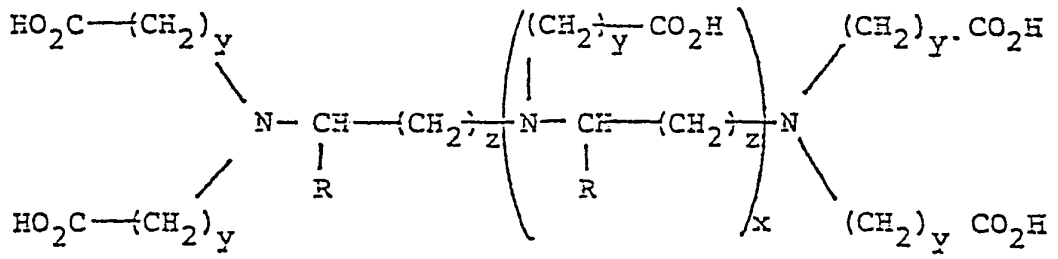
Wie vorstehend angegeben, werden gemäß der vorliegenden Erfindung monoklonaler Antikörper, oder Fragmente hievon, zu Tumor-assoziierten Antigenen direkt mit metallischen Radionukleiden oder mit chelatgebundenen Radionukliden markiert. Die in der Erfindung nützlichen monoklonalen Antikörper sind Produkte der Hybridtechnologie, die heutzutage gut bekannt ist. In diesem Zusammenhang kann beispielsweise auf die Originalarbeit von Milstein und Kohler, wiedergegeben in Nature, 256, 495-497 (1975), verwiesen werden. Im Prinzip umfaßt das Verfahren das Injizieren eines Immunogens in eine Maus oder in ein anderes geeignetes Tier, im vorliegenden Fall das Injizieren eines Tumor-assoziierten Antigens wie CEA. Die immunisierte Maus wird anschließend getötet und aus ihrer Milz entnommene Zellen werden mit Myelomzellen zu Hybridzellen verschmolzen, die als "Hybridomas" bezeichnet werden und die in vitro reproduziert werden können. Die Antikörper bildende Zellenpopulation wird selektiv gezüchtet und zur Isolierung von individuellen Klonen aufgetrennnt, von denen jedes eine einzelne Antikörperspezies abscheidet, die für einen besonderen Bereich ("Determinante") auf der Oberfläche des Antigenmoleküls spezifisch ist.

Die einzelnen Klone können weiter aufgetrennt werden, um jene zu bestimmen, die Antikörper mit der höchsten Affinität für das Antigen bilden und die niedrige unspezifische Bindung aufweisen. Der zum Radiomarkieren ausgewählte Antikörper (üblicherweise aus den Asziten isoliert) wird zur Reaktion mit dem metallischen Radionuklid gebracht oder wird mit einem geeigneten Chelatbildner konjugiert, der anschließend zum Binden des Radionuklids verwendet wird. Der Chelatbildner kann unter Verwendung zahlreicher verschiedener Methoden an den Antikörper gebunden werden. Da der Antikörper ein Polypeptid ist, kann im allgemeinen ein Chelatbildner verwendet werden, der eine reaktive Gruppe von der Art aufweist, die zur Einführung eines Restes in ein Protein-hältiges Substrat als geeignet bekannt ist. Unter geeigneten reaktiven Gruppen können die folgenden erwähnt werden.



Ch bedeutet hiebei den Rest des Chelatbildners.

Geeignete Chelatbildner umfassen eine große Anzahl von mehrzähnigen Chelatbildnern, deren Liganden mit metallischen Radionukliden komplexieren. Unter solchen Mitteln können die Polyamincarbonsäuren der Formel



(1)

erwähnt werden, worin x Null oder eine ganze Zahl bedeutet (x = Null oder x = 1 wird bevorzugt), y den Wert 1 oder 2 aufweist (y = 1 wird bevorzugt), und z eine ganze Zahl von 1 bis 7 bedeutet (z = 1 oder 7 wird bevorzugt) und worin R Wasserstoff oder eine Gruppe bedeutet, über welche der Chelatbildner mit dem Antikörper konjugiert wird, oder eine Gruppe darstellt, welche die Bindungskonstante des Chelatbildners für das Radionuklid beeinflußt.

Unter geeigneten Gruppen R kann insbesondere die Gruppe A erwähnt werden, worin A für die Gruppe steht, über welche die Konjugation erfolgt. A kann beispielsweise $-N_2^+$ sein, welches durch Diazotieren der $-NH_2$-Gruppe erhalten wird, die ihrerseits durch Reduktion einer Nitro ($-NO_2$)-Gruppe erhalten werden kann, die wiederum durch Nitrieren des Phenylkerns zugänglich ist. Die Gruppe A kann auch $-NH-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH_2L$ bedeuten, die durch Acetylierung der $-NH_2$-Gruppe nach bekannten Methoden erhalten werden kann, worin L eine Leaving-Gruppe darstellt, die während der Konjugation verdrängt wird, wie ein Halogen, beispielsweise Cl, Br oder I (Br wird bevorzugt).

In anderen Fällen kann R für $-CH_3$ oder $-CH_2C_6H_4OCH_2CO_2H$ stehen.

Im Falle der Polyaminocarbonsäuren kann die Konjugation durch die Carbonsäuregruppe selbst bewirkt werden, indem beispielsweise ein Säureanhydrid-Zwischenderivat gebildet wird, wie dies von Krejcarek und Tucker, Biochemical and Biophysical Research Communication, 77, 581 (1977) beschrieben ist.

Von den Polyaminocarbonsäuren werden derzeit die Polyaminoessigsäuren bevorzugt. Spezifische Polyaminocarbonsäuren, die verwendet werden können, umfassen Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) und Derivate hievon, wie Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), p-Bromacetamidophenyl-(ethylendinitrilotetraessig)-säure und 1-(p-Aminophenyl)-ethylendiaminotetraessigsäure, wobei die letztgenannte in ein Diazoniumsalz übergeführt wird, um eine Konjugation zu ermöglichen. Von diesen Chelatbildnern wird derzeit DTPA bevorzugt.

Das direkte Markieren von Antikörpern mit metallischen Radionukliden kann unter Anwendung bekannter Methoden zur Einführung eines Metallions an einen Antikörper durch dessen Verknüpfung an eine Stelle am Antikörper selbst ausgeführt werden. In einigen Fällen kann das metallische Radionuklid dadurch eingebracht werden, daß der Antikörper, üblicherweise in Lösung, dem Radionuklid in dessen geeignetem Oxidationszustand ausgesetzt wird. Eine derzeit bevorzugte Methode umfaßt beispielsweise die direkte Metallierung eines Antikörpers mit $^{103}Ru^{3+}$ durch In-Berührung-Bringen des Antikörpers mit einem geeigneten Rutheniumsalz, beispielsweise Rutheniumtrichlorid, in einer Pufferlösung. Zu den anwendbaren Puffermitteln zählen Kaliumacetat, Natriumbicarbonat und Trihydroxyethylamin (Tris).

Eine weitere geeignete Methode umfaßt die direkte Metallierung des Antikörpers mit Chrom. Chromradionuklide können durch Vermischen eines Chromatsalzes des Radiumnuklids, beispielsweise Natrium- oder Kaliumchromat, mit dem Antikörper in Lösung eingeführt werden.

In anderen Fällen kann der Antikörper zunächst chemisch modifiziert werden, um das Radionuklid aufzunehmen und hierauf damit umgesetzt werden. So können beispielsweise Disulfidgruppen innerhalb des Antikörpers reduziert werden, woran sich die Bildung einer -S-M- oder -S-M-S-Gruppe anschließt, worin M das Radionuklid bedeutet. Disulfidgruppen können beispielsweise unter Verwendung von Dithiothreitol reduziert werden, um zunächst eine Thiolgruppe auszubilden, die zur Reaktion mit entsprechenden Metallionen gebracht werden kann, beispielsweise mit solchen von Quecksilber, Silber, Zink, Blei oder Cadmium in Form ihres Oxids oder Salzes.

Im Rahmen der Erfindung anwendbare Radionuklide sind solche, die mit mehrzähnigen Chelatbildnern stabile Komplexe bilden oder die unter geeigneten Bedingungen direkt mit dem Antikörper in Kombination treten. Die Radionuklide werden so ausgewählt, daß sie eine Halbwertszeit und andere Strahlungseigenschaften aufweisen, die eine sichere Beseitigung und eine sichere Einführung in Menschen ermöglichen. Eine große Anzahl von Radionukliden ist zur Anwendung bei Menschen überprüft worden, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung nutzbar gemacht werden können. Diese können wie folgt zusammengefaßt werden:

Der Chelatbildner bildet stabile Komplexe mit Radionukliden, die einen +3-Oxidationszustand aufweisen. Zu Radionukliden, die stabile Komplexe im +3-Oxidationszustand ausbilden, zählen ^{111}In, und ^{103}Ru.

Die am besten geeigneten Radionuklide sind Gamma-Strahler mit einer Energie zwischen 100 und 400 keV und mit Halbwertszeiten im Bereich von etwa 5 h bis 5 Tage.

Aus Gründen, die derzeit noch nicht völlig geklärt sind, widerstehen bestimmte individuelle monoklone Antikörper zu Tumorantigenen einer direkten Metallierung. Für die Einverleibung des Radioisotops auf diesem Wege ist es dabei erforderlich, sorgfältig spezifische Antikörper auszuwählen. Es wird daher derzeit bevorzugt, ein Radionuklid an einen Antikörper unter Anwendung des vielseitigeren Verfahrens einer vorangehenden Konjugation eines Chelatbildners an den Antikörper und einer anschließenden Ausbildung eines Komplexes mit dem Radionuklid zu binden. In diesem Zusammenhang wird besonders bevorzugt, ^{111}In (T 1/2 = 2,8 Tage) als das Radionuklid zusammen mit DTPA als Chelatbildner zu verwenden.

Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann zur Feststellung von Tumoren unter Verwendung monokloner Antikörper zu Tumor-assoziierten Antigenen im allgemeinen verwendet werden. CEA und Melanom-assoziierte Antigene können beispielsweise als Immunogene zur Stimulierung der Bildung der gewünschten monoklonen Antikörper, wie vorstehend beschrieben, verwendet werden. Beim tatsächlichen Gebrauch wird der markierte Antikörper in einer geeigneten parenteralen Lösung dem Patienten injiziert. Nach Verlauf genügend langer Zeit wird der Patient einem Fotoscanning-Verfahren unterzogen, um etwaige Stellen lokalisierter Strahlung festzustellen, die auf einen Tumor und/oder auf eine seiner Metastasen hinweisen.

Die nachfolgenden Versuche, die mit monoklonalem Antikörper zu CEA, der mit ^{125}I und ^{111}In markiert war, zeigen den Vorteil der Verwendung von mit Chelat-gebundenen Radionukliden markierten monoklonalen Antikörpern zur Tumorabbildung gemäß der vorliegenden Erfindung im Vergleich zu Verfahren, die auf Jod-markierten Antikörpern beruhen.

1. Herstellung von radioaktiv-markiertem Anti-CEA

Monoklonaler Anti-CEA, erhältlich von Hybritech, Inc., La Jolla, Kalifornien, wurde nach der Methode von Bolton und Hunter, Biochem. J., 133, 529-39 (1973) mit ^{125}I markiert. Das Produkt wurde durch eine Sephadex G-25-Säule geführt und das endgültige Material enthielt weniger als 0,5 % freies Jod. Die Bindung von radiomarkiertem monoklonalem Antikörper war größer als 80 % gegenüber Pferde-Antimaus-Antikörper, gebunden an Sepharose, und größer als 75 % mit CEA, gebunden an Sepharose.

Der gleiche monoklonale Anti-CEA wurde mit ^{111}In unter Verwendung von konjugiertem DTPA als Chelatbildner nach der Methode von Krejcarek und Tucker, Biochemical and Biophysical Research Communications, 77, 581 (1977), markiert. Das Reaktionsprodukt wurde durch Passage durch eine Sephadex G-75-Säule gereinigt. Die Antigenbindung war mit jener vergleichbar, die der ^{125}I-markierte Antikörper zeigte. Das Markierungsverfahren beeinflußte nicht die Affinitätskonstante Ka für den Antikörper im Verhältnis zu nicht-chelatisiertem Antikörper, wie durch Titration mit CEA bestimmt wurde.

Die in vitro-Stabilität der markierten Anti-CEA-Antikörper wurde dadurch bestimmt, daß ein Teil des Materials in einer parenteralen Lösung, enthaltend sterile, normale Kochsalzlösung U.S.P., 72 h lang bei 37 °C inkubiert wurde und chromatographisch freies Radionuklid bestimmt wurde. Die Antikörper-Lösungen wurden auf Streifen aus Baker-Aluminiumoxid 1B aufgebracht und in 50 %igem wässerigem Aceton entwickelt. Das Protein-gebundene Radionuklid verbleibt am Start, wogegen freies Radionuklid wandert. Nach der Inkubationsperiode zeigte das radiojodierte Material weniger als 3 % Aktivität, vorliegend als freies Jod. Eine Lagerung bei 4 °C führte zu einer Verminderung um 50 %. Unter den gleichen Bedingungen zeigte der ^{111}In-markierte Anti-CEA-Antikörper eine vergleichbare Stabilität.

2. Verteilungsstudien an nackten Mäusen

Es wurden Gewebeverteilungsstudien des radiomarkierten monoklonon Mäuse-Anti-CEA-Antikörpers an nackten Mäusen ausgeführt, die 0,5 bis 1,0 g humanen Darmkrebs aufwiesen. Die Mäuse wogen von 17 bis 28 g (Mittelwert etwa 23 g). Die Tumore wurden durch subkutane Injektion einer feinzerteilten Masse injiziiert, die CEA-bildende humane Darm-Adenokarzinom-Zellen enthielt. Die Verteilungsstudien wurden 3 Wochen danach ausgeführt. Es wurden zwei Experimente vorgenommen. Im ersten wurden 19 Tiere in vier Gruppen zu 4 bis 6 Tiere unterteilt, denen 0,1 ml einer sterilen, normalen Kochsalzlösung nach U.S.P. mit einem Gehalt an 0,5 Mikrocurie ^{125}I-Anti-CEA-Antikörper (etwa 0,3 Mikrogramm Antikörper) intravenös (i.v.) injiziert wurden. Zu Vergleichszwecken wurde trägerfreies ^{67}Ga-Citrat, ein bekanntes unspezifisches Abbildungsmittel für humanen Darmkrebs, injiziert. Die Injektionen wurden ohne Anästhesie unter Verwendung einer 100 Mikroliter Hamilton-Spritze ausgeführt, um die erforderliche Genauigkeit sicherzustellen. Tiere, bei welchen die Dosis teilweise in den Schwanz infiltrierte, wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen. Nach der Injektion wurden die Mäuse in sterile Käfige mit erhöhten Drahtgitterböden gebracht, um Urin und Fäkalien auffangen zu können. Unter den Böden wurde sterile 4 x 4-Gaze in solcher Weise angeordnet, daß sie von den Tieren nicht angenagt werden konnte. Die Mäuse, die in einem sauberen Raum bei etwa 5 °C mit sterilem Futter und Wasser ad libitum gehalten wurden, wurden gruppenweise 4, 24, 48 und 72 h nach Injektion des Tracers getötet.

Die Mäuse wurden mit Äther anästhetisiert und Blutproben wurden durch direkte Herzpunktur erhalten. Die Mäuse wurden dann durch zervikale Dislozierung getötet. Während der anschließenden Sektur wurden der Tumor, die Leber, Niere, Muskel, Herz, Lunge, Knochen und Milz entnommen, 2 mal mit Wasser und 1 mal mit 10 %igem Formalin gespült, trockengetupft und auf einer analytischen Waage im nassen Zustand gewogen. Der vollständige Magen und die Eingeweide wurden ebenso entfernt und gezählt. Für die Berechnungen der Gesamtaufnahme durch die Organe wurde angenommen, daß Blut, Muskel und Knochen 7 %, 40 % bzw. 10 % des Gesamtkörpergewichtes darstellen. Die anderen Organe wurden insgesamt gewogen. Die Radioaktivitätszählungen wurden mit einem automatischen Gammazähler ausgeführt, mit über dem 27 bis 35 Kiloelektronenvolt-Fotopeak von ^{125}I bzw. dem 93 keV-Fotopeak von ^{67}Ga gesetzten Fenstern. Der Zähler wurde so programmiert, daß er bei 10 min oder bei 1 Million Zählungen ausmusterte, um statistische Signifikanz für solche Proben zu erzielen, welche niedrigste Aktivitätsniveaus hatten. Korrekturen für den Hintergrund und für den reziproken Beitrag von Isotopenaktivität zwischen den Fenstereinstellungen wurde unter Anwendung vorbereiteter Quellen und Lösen von Simultangleichungen vorgenommen. Die Aktivität in den Proben wurde dann mit Standards des injizierten Materials verglichen, wobei die Ergebnisse in % injizierte Dose je g und % injizierte Dose je Organ ausgedrückt wurden. Die Tumor/Gewebe-Verhältnisse wurden aus den Werten für %-Dosis/g berechnet. Die Aktivität im Darm, Urin und Kot wurde als Prozentsatz der insgesamt injizierten Dosis berechnet.

Im zweiten Versuch wurden 37 nackte Mäuse, die von dem gleichen humanen Darmkrebs gewachsene Tumore aufwiesen, in 5 Gruppen zu 7 bis 8 Tieren unterteilt. Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe. Diesen Tieren wurden gleichzeitig 1 Mikrocurie ^{125}I-Humanserumalbumin (0,01 mg HSA) und 3 Mikrocurie trägerfreies ^{111}In-Citrat (0,01 mg Citrat) intravenös injiziert. 48 h nach der Injektion wurden die Tiere getötet. In den verbleibenden 4 Gruppen erhielten die Tiere gleichzeitige Injektionen von 3 Mikrocurie ^{111}In-markiertem Anti-CEA-Antikörper (1,5 mg Antikörper) und 5 Mikrocurie trägerfreiem ^{67}Ga-Citrat. Die Gruppen wurden nach 4, 24, 48 bzw. 72 h getötet. Die Sektur der Gewebe, die Probenbereitung für die Strahlungsmessung, die Zählmethoden und die Berechnungen wurden wie vorstehend beschrieben ausgeführt. Im Falle von ^{111}In wurde das Spektrometer so eingestellt, daß der 247 keV-Fotopeak unter Verwendung eines 40 keV-Fensters (210 bis 250 keV) gezählt wurde, während ^{67}Ga mit einem 30 keV-Fenster gezählt wurde, das den 93 keV-Fotopeak überlappte. Diese Einstellungen ergaben weniger als 10 % reziproke Beiträge der Radioaktivität.

Wie in Fig. 1 dargestellt, stieg die Konzentration von in dem Tumor lokalisiertem ^{111}In-Anti-CEA während der gesamten Versuchsdauer ständig an. 23 % der injizierten Dosis waren nach 72 h akkumuliert und die Ergebnisse lassen vermuten, daß dieses Ausmaß sogar noch höher gewesen wäre, wenn die Probenahme noch später erfolgt wäre. Der Spiegel im Blut hingegen nahm im Verlauf der Zeit an. Die Leber zeigte eine rasche Aufnahme bei 4 h, woran sich eine Periode mit wenig Änderung anschloß, hierauf ein Anstieg auf 72 h. Die anderen Gewebe zeigten geringe Änderung im Verlauf der überprüften Zeitdauer.

Das Ausmaß an ^{67}Ga in dem Tumor blieb im Verlauf des Versuches ziemlich konstant und belief sich auf etwa 1/4 des Wertes von ^{111}In-Anti-CEA bei 72 h. Der ^{67}Ga-Spiegel im Blut nahm ständig ab, während die Konzentration in der Leber ein Muster zeigte, das etwas dem ^{111}In-markiertem Antikörper ähnlich war. Die ^{67}Ga-Konzentration im Muskel nahm bis 48 h ab und blieb dann in gleicher Höhe, während die Konzentration im Knochen durchwegs gleich blieb.

Die Jodmenge im Tumor hatte nach 4 h ihren Höchstwert, der zu Beginn etwas höher lag als die Menge an ^{111}Indium, wonach sie unregelmäßig im Verlauf des restlichen Experimentes abnahm und bei 72 h nur mehr 1/10 des Wertes für ^{111}Indium betrug. Zu diesem Zeitpunkt erschien in dem Tumor doppelt so viel ^{67}Ga wie

^{125}I. Die Zählrate von ^{125}I in allen Geweben nahm rasch von ihren Maximalwerten bei 4 h ab und erreichte in einigen Fällen die Hintergrundniveaus vor 48 h.

Die Ausscheidungswerte (Fig. 2) zeigen eine ständige Zunahme an ^{111}In im Urin zwischen 24 und 72 h, wobei ein Maximum von 14 % der injizierten Dosis erreicht wird. Die ^{111}Indium-Konzentration im Kot blieb bei 24 und 48 h ziemlich konstant und stieg bei 72 h auf 17 % an, während die Menge in den Eingeweiden über die gesamte Zeitdauer verhältnismäßig konstant blieb und niemals 5 % der Dosis überschritt.

Das ^{67}Ga-Ausscheidungsmuster war dem von ^{111}In etwas ähnlich, es zeigte jedoch mehr Tracer in den Eingeweiden und im Kot als für ^{111}In festgestellt wurde und weniger im Urin.

Nahezu 60 % der ^{125}I-Radioaktivität wurden im Urin während der ersten 24 h eliminiert und 75 % nach 48 h. Weiters 5 % des ^{125}I wurden im Kot verloren. Nach 72 h waren somit etwa 80 % des ursprünglichen injizierten ^{125}I durch das Tier ausgeschieden worden. Die Chromatographie von ^{125}I im Urin zeigte, daß der größte Anteil hievon freies Jodid war, mit einer zweiten Spezies, die möglicherweise freies ^{125}I, komplexiert mit etwas anderem als einem Protein, darstellte.

Fig. 3 zeigt die Werte für ^{111}In-markierten Anti-CEA-Antikörper bei 48 h und enthält den Vergleich mit ^{111}In-Citrat und ^{125}I-HSA. Das ^{111}In-Citrat wurde als Vergleichssubstanz für etwaiges Indium verwendet, das von dem Antikörper dissoziiert haben könnte, während das ^{125}I-Humanserumalbumin als eine unspezifische Protein-Vergleichsprobe verwendet wurde. Der ^{111}In-Anti-CEA-Antikörper zeigte ein von dem ^{111}In-Citrat weitgehend verschiedenes Verteilungsmuster, mit einer 10-fach wirksameren Konzentrierung im Tumor. Die Aufnahme der beiden Tracer durch die anderen Gewebe war ebenso unterschiedlich. Die Tumor-Konzentration von ^{125}I-HSA belief sich auf 20 % des Wertes von ^{111}In-Anti-CEA, war aber noch immer um 50 % größer als jene von ^{125}I-Anti-CEA. Die ^{125}I-HSA-Verteilung im Krebs-freien Gewebe ist ebenfalls stark verschieden von jener des ^{111}In-Anti-CEA-Produktes. Es ist besonders bemerkenswert, daß ^{125}I-HSA, das lange Zeit als ein stabiles jodiertes Protein angesehen worden war, im Verlauf von 48 h nahezu 60 %ige Ausscheidung (43 % in den Urin) zeigt, was bemerkenswerterweise mit der obigen Feststellung übereinstimmt, daß ^{125}I-Anti-CEA ebenfalls im Urin gefunden wurde. Die Urin-Fraktion stellt möglicherweise freies Jodid dar.

Die Tumor/Gewebe-Verhältnisse (Fig. 4) zeigen, daß ^{111}In-Anti-CEA hinsichtlich aller Gewebe dem ^{67}Ga überlegen ist, ausgenommen für Blut, wo etwa die gleichen Werte wie für ^{67}Ga erzielt werden. Die ^{125}I-Anti-CEA-Verhältnisse, obwohl scheinbar gegenüber den von ^{111}In und ^{67}Ga in einigen Geweben erzielten Werten vorzuziehen, sind irreführend, weil sie eher von niedrigen ^{125}I-Werten in den normalen Geweben und weniger von einer Lokalisierung im Tumor herrühren.

Im Hinblick auf die voranstehenden Versuche ist ^{125}I-Anti-CEA eindeutig als Tumor-Lokalisierungsmittel ungeeignet. Die rasche und weitgehende Dehalongenierung vermindert die Tumortracer-Konzentration und erhöht den Blut-Hintergrund, wodurch die Anwendung von ^{125}I-Anti-CEA in Abbildungsverfahren ohne aufwendige Subtraktionsmethoden undurchführbar wird. Bei 72 h enthält der Tumor eine 2 mal so große Menge an dem nicht-spezifischen ^{67}Ga wie an ^{125}I, bezogen auf die Gramm-Basis. Darüber hinaus sind die Tumor/Blut-Verhältnisse besser für ^{67}Ga als für den jodierten Antikörper. Wenn man berücksichtigt, daß ^{67}Ga als ungeeignet zur Abbildung von Adenokarzinomen des Darmes angesehen wird, so können die von Mach und Mitarbeitern, N. Eng. J. Med., 303, 5-10 (1980), festgestellten Schwierigkeiten leicht erklärt werden. Die unter Einsatz von ^{125}I erhaltenen Daten zeigen eindeutig, daß in Abwesenheit von Subtraktionstechniken bei Verwendung von ^{131}I sehr große Dosen des mit ^{131}I-markierten Materials verabreicht werden müßten, um die für eine wirksame Abbildung erforderlichen Tumor-Konzentrationen zu erzielen. Dies würde dazu führen, daß der Patient einer hohen Strahlungsdosis ausgesetzt wird, zufolge der Halbwertszeit von 8 Tagen und der 608 keV Beta-Komponente von ^{131}I.

Im Gegensatz hiezu ermöglichen der große Prozentsatz der im Tumor angesammelten injizierten Dosis von ^{111}In-Anti-CEA und die günstigeren physikalischen Eigenschaften von ^{111}In die Injektion niedriger Mengen des Radiopharmazeutikums, während die Abbildung verbessert und die Strahlungsdosis für den Patienten auf ein Minimum gebracht wird. Die Tumor/Hintergrund-Verhältnisse, die mit ^{111}In-Anti-CEA erreicht werden, liegen klar innerhalb des für Abbildungszwecke erforderlichen Bereiches, weil ein großer Teil des Radionuklids in dem Tumor lokalisiert wird. Darüber hinaus lassen die Werte vermuten, daß der Tumor radioaktiv markiertes Material aufnimmt, das zuvor in andere Gewebe eingebracht war oder mit diesen in Verbindung stand.

4, 24, 48 und 72 h nach Injektion von ^{111}In-markiertem Anti-CEA wurden einzelne Mäuse unter Verwendung einer Phogam H P Anger-Gamma-Kamera einem Fotoscanning unterworfen. Nach 48 h war der

Tumor gut definiert, ohne daß man Subtraktionsmethoden anwenden mußte. Nach 72 h war die Tumordefinition sogar noch stärker ausgeprägt.

Die Stabilität in vivo und somit die Eignung zur Tumor-Abbildung eines direkt markierten monoklonalen Antikörpers wird in den folgenden Experimenten veranschaulicht, bei denen ein mit ^{103}Ru-markiertes monoklonales Antimelanom im Vergleich mit einem mit ^{125}I-markiertem gleichen Antikörper verwendet wird.

1. Herstellung von ^{103}Ru-markiertem Antimelanom

Eine wässerige Lösung von 220 µl $^{103}RuCl_3$ (erhältlich von New Englang Nuclear, Inc.) wurde zu 100 µl einer gesättigten Kaliumacetatlösung zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit 70 µl 10 M NaOH auf 5,3 eingestellt. Diese Radionuklid-Lösung wurde zu 500 µl einer 0,5 µg/µl-Lösung von Mäuse-Antimelanom-Antikörper zugesetzt und das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 20 µl 10 M NaOH 7,2 eingestellt und das Präparat wurde über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das nicht gebundene Metall wurde von dem an Antikörper gebundenem Metall durch Auftragen des Reaktionsgemisches auf eine Sephadex-G-50-Säule und Eluieren mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung von pH 7,2 getrennt. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden aufgefangen und für die in vivo-Überprüfungen an Mäusen vereinigt.

2. Verteilungsstudien an normalen Mäusen

Gewebeverteilungsstudien wurden an normalen BALB-C-Mäusen unter Verwendung des ^{103}Ru-markierten Antimelanom-Antikörpers, hergestellt gemäß der vorstehenden Methode, und unter Verwendung von ^{125}I-markiertem Antimelanom-Antikörper ausgeführt, der in der gleichen Weise, wie zuvor für das Markieren von Anti-CEA beschrieben, hergestellt wurde.

Die Mäuse wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, denen intravenös ^{125}I-markierter Antikörper bzw. ^{103}Ru-markierter Antikörper injiziert wurde. Die Mäuse wurden nach 4, 24, 48, 72 und 96 h getötet, seziert und die Organradioaktivität wurde, wie vorstehend für die Studien mit monoklonem Anti-CEA-Antikörper beschrieben, bestimmt. Die Gewebeverteilung von ^{125}I und ^{103}Ru ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergeben.

Fußnote zu nachfolgender Tabelle:

* angegebene Werte beziehen sich auf das Mittel (X) von N Tieren ± eine Standardabweichung (SA)
+ Blut mit 7 %, Muskel mit 40 % des Tiergewichtes angenommen

Verteilung von I-125 und Ru-103 im Gewebe nach Injektion von markiertem Melanom-Antikörper, verglichen nach verschiedenen Zeitpunkten, an normalen BALB-C-Mäusen *

	4 Stunden % Dosis/Organ		24 Stunden % Dosis/Organ		48 Stunden % Dosis/Organ		72 Stunden % Dosis/Organ		96 Stunden % Dosis/Organ	
	I-125	Ru-103	I-125	Ru-103	I-125	Ru-103	I-125	Ru-103	I-125	Ru-103
BLUT+ $\bar{X}$	46,4	28,3	11,7	12,5	13,0	6,97	11,8	5,54	13,2	3,30
± SA	4,17	3,32	10,8	1,74	6,66	,550	6,88	,678	,929	,244
LEBER $\bar{X}$	12,6	48,1	5,22	42,9	5,27	47,2	4,54	41,2	3,86	39,3
± SA	1,87	6,63	,864	4,84	,904	6,42	1,03	4,14	,395	4,34
MILZ $\bar{X}$	1,27	3,38	,520	2,64	,340	1,95	,284	1,94	,252	1,98
± SA	,181	,467	,053	,498	,049	,248	,025	,311	,022	,263
NIERE $\bar{X}$	1,94	7,11	,784	5,15	,641	4,21	,542	3,68	,460	3,21
± SA	,135	,284	,091	,352	,073	,284	,063	,203	,034	,188
HERZ $\bar{X}$	,792	,629	,403	,327	,340	,301	,263	,236	,220	,207
± SA	,161	,119	,075	,049	,036	,017	,060	,051	,037	,015
MUSKEL+ $\bar{X}$	15,2	7,61	12,5	8,64	11,6	8,17	9,56	6,98	8,05	6,66
± SA	2,56	1,02	2,34	1,55	2,48	1,88	1,00	,906	,641	,482
KNOCHEN $\bar{X}$	,360	,346	,189	,253	,163	,241	,150	,252	,106	,200
± SA	,040	,027	,046	,045	,035	,041	,019	,030	,014	,015
LUNGE $\bar{X}$	2,58	2,01	1,13	,817	,878	,612	1,17	,585	,855	,475
± SA	,736	,464	,271	,133	,131	,079	,281	,082	,159	,075
EINGEWEIDE $\bar{X}$	23,8	7,72	5,61	6,11	6,04	5,51	5,22	4,70	3,94	4,01
± SA	4,24	,646	3,16	,817	,704	,460	,501	,523	,129	,296
TIERGEWICHT $\bar{X}$	17,96 ± 3,88		16,3 ± 1,68		14,8 ± 1,79		14,95 ± 1,80		15,95 ± 1,21	
BEREICH (g)	12,1 - 22,2		14,6 - 19,8		11,6 - 17,1		13,1 - 18,2		14,0 - 17,5	
N =	10		10		9		10		8	

Die in der Tabelle angeführten Werte zeigen, daß der ^{125}I-markierte Antimelanom-Antikörper rasch dehalogeniert wurde, ebenso wie dies mit ^{125}I-markiertem Anti-CEA-Antikörper eintrat, wogegen der ^{103}Ru-markierte Antimelanom-Antikörper stabil blieb. Diese Beobachtungen werden durch die Tatsache bestätigt, daß der Gehalt an ^{125}I im Blut 4 h nach der Injektion sehr hoch ist und zu niedrigen, aber gleichbleibenden Mengen nach 24 bis 96 h abfällt. Im Gegensatz hiezu wird der ^{103}Ru-Gehalt verhältnismäßig rasch aus dem Blut abgezogen und konzentriert sich in der Leber, wie man bei einem von keinem Tumor befallenen Wirt erwarten würde. Die Milz- und Leberwerte für die mit ^{103}Ru-markiertem Antimelanom-Antikörper injizierten Mäuse stehen ebenfalls mit der in vivo-Stabilität im Einklang.

Es ist wohl bekannt, daß CEA und einige andere Tumor-assoziierte Antigene durch den Tumor verborgen oder verteilt werden. In solchen Fällen kann das Auftreten von Hintergrundstrahlung, die dadurch zustande kommt, daß das im Blut oder in anderen Gewebe zirkulierende Antigen mit markiertem Antikörper kombiniert wird, dadurch vermindert werden, daß zunächst unmarkierter Antikörper zum Kombinieren mit zirkulierendem Antigen verabreicht wird. Dies würde auch eher zu einer Verminderung der hohen Aufnahme von markiertem Antikörper durch die Leber führen. Nach einer geeigneten Zeitdauer wird markierter Antikörper zugesetzt und der Patient wird einem Fotoscanning unterzogen, um die Stelle der lokalisierten Strahlung zu bestimmen.

Wenngleich in der voranstehenden Diskussion die Verwendung eines einzigen monoklonen Antikörpers, der mit einem Radionuklid markiert ist, besonders hervorgehoben worden ist, liegt es im Rahmen der Erfindung, zwei oder sogar mehrere markierte monoklonale Antikörper für unterschiedliche Antigen-Determinanten zu verwenden. Die verschiedenen Antikörper werden so ausgewählt, daß sie den Bindungsvorgang eines anderen Antikörpers an das Antigen nicht beeinträchtigen. Bei Einsatz mehrerer, einander nicht beeinträchtigender markierter Antikörper kann die Tumor-Abbildung verbessert werden, weil das Antigen eine höhere Kapazität für markierte Antikörper aufweisen wird. Die Verwendung mehrerer Antikörper ist besonders geeignet zur Darstellung eines Tumors, dessen assoziiertes Antigen in einer geringen Konzentration vorliegt.

Die vorstehende Beschreibung der Erfindung bezieht sich auf derzeit bevorzugte Ausführungsformen, und andere Abänderungen werden dem Fachmann ersichtlich sein. Dementsprechend soll der Umfang der vorliegenden Erfindung nur durch den Umfang der nachfolgenden Ansprüche beschränkt sein.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpers gegen Tumor-assoziiertes Antigen, **dadurch gekennzeichnet,** daß man ein metallisches Radionuklid mit dem Antikörper zur Ausbildung einer direkten Bindung mit dem Radionuklid umsetzt oder den Antikörper mit einem Chelatbildner unter Ausbildung eines Antikörper-Chelatbildner-Konjugats umsetzt und hierauf das Konjugat mit dem Radionuklid zur Ausbildung einer Bindung des Radionuklids mit dem Chelatbildner zur Reaktion bringt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als Chelatbildner Diethylentriaminpentaessigsäure eingesetzt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß als Radionuklid ein Gamma-Strahler mit einer Halbwertzeit von 5 Stunden bis 5 Tagen und mit einer Energie der Gamma-Strahlen von 100 bis 400 keV eingesetzt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet,** daß als Radionuklid ^{111}In, ^{67}Ga oder ^{103}Ru eingesetzt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß ein monoklonaler Antikörper gegen karzinoembryonales Antigen oder Melanom-assoziierte Antigene eingesetzt wird.

6. Verwendung der nach den Ansprüchen 1 bis 5 hergestellten radioaktiv markierten monoklonalen Antikörper für die Herstellung eines szintigraphischen Mittels zur Darstellung von Tumoren.

7. Verwendung eines Gemisches aus zwei oder mehreren, nach den Ansprüchen 1 bis 5 hergestellten radioaktiv markierten Antikörper für den im Anspruch 6 genannten Zweck.

Hiezu 4 Blatt Zeichnungen

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Patentschrift Nr. AT 392 004 B

Ausgegeben 10. 01.1991

Int. Cl.[5]: A61K 49/02

Blatt 1

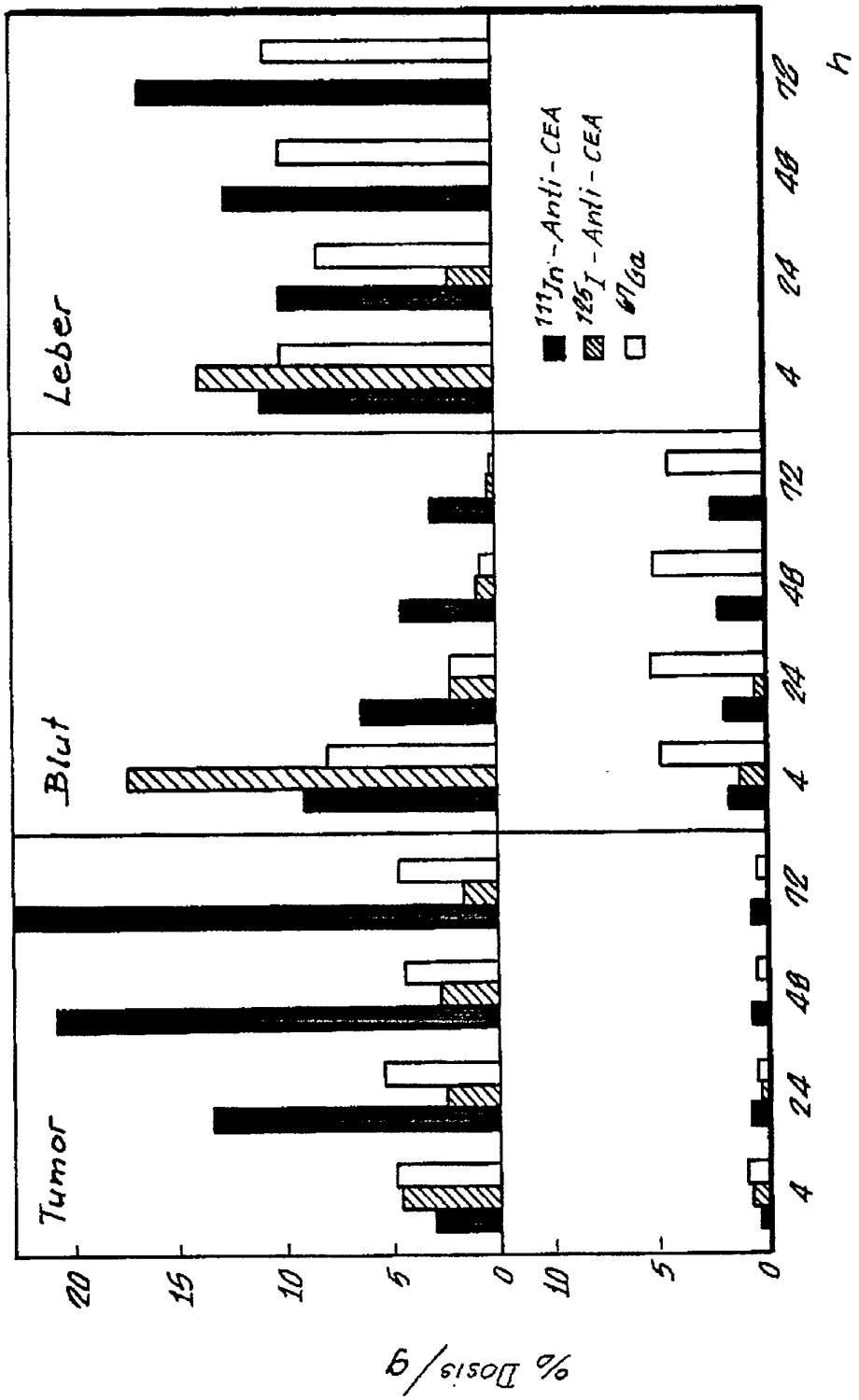


FIG 1

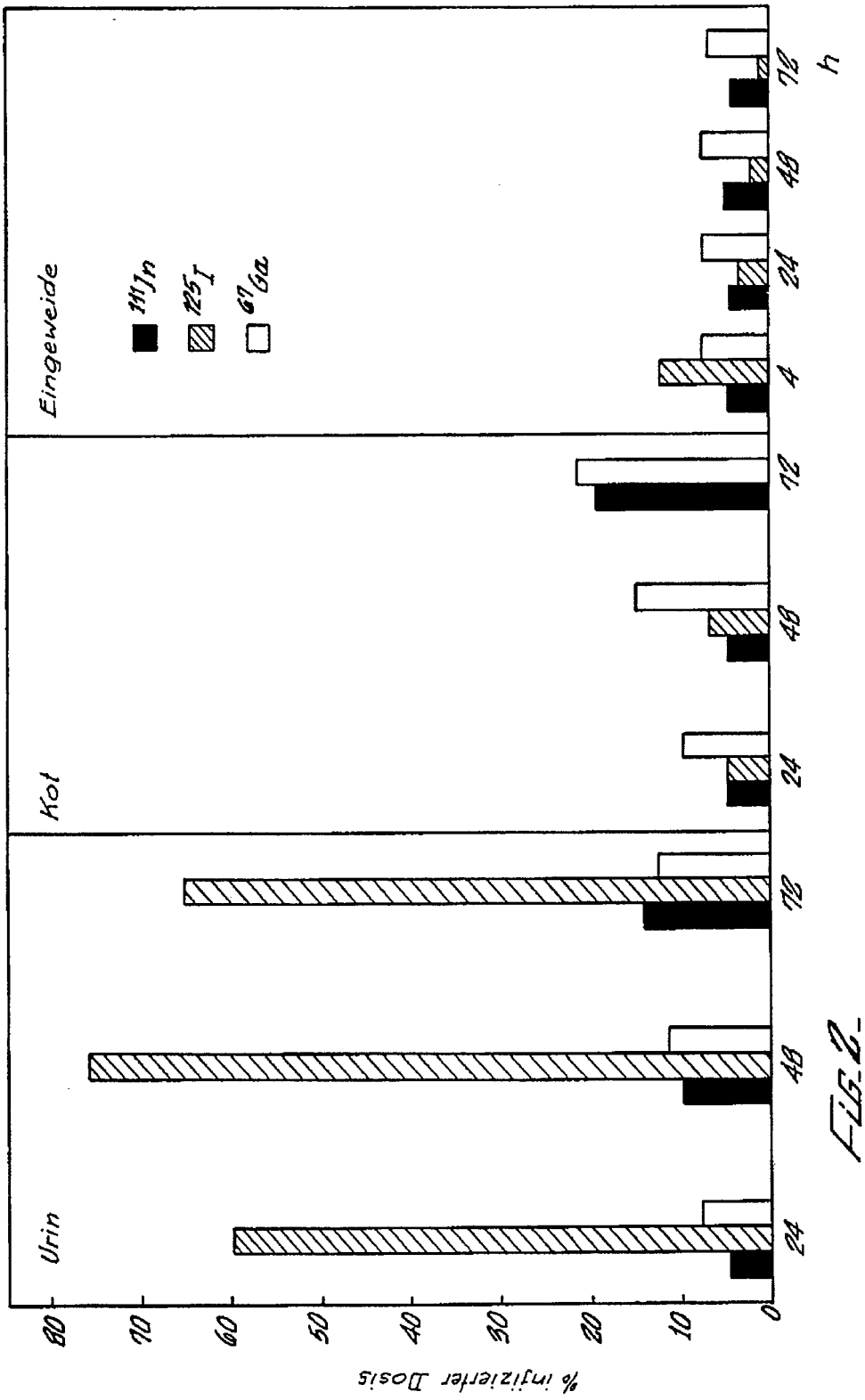

% injizierter Dosis
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Urin
Kot
Eingeweide
^{111}In
^{125}I
^{67}Ga
24
48
72
4
24
48
72
24
48
72
h

Fig. 2

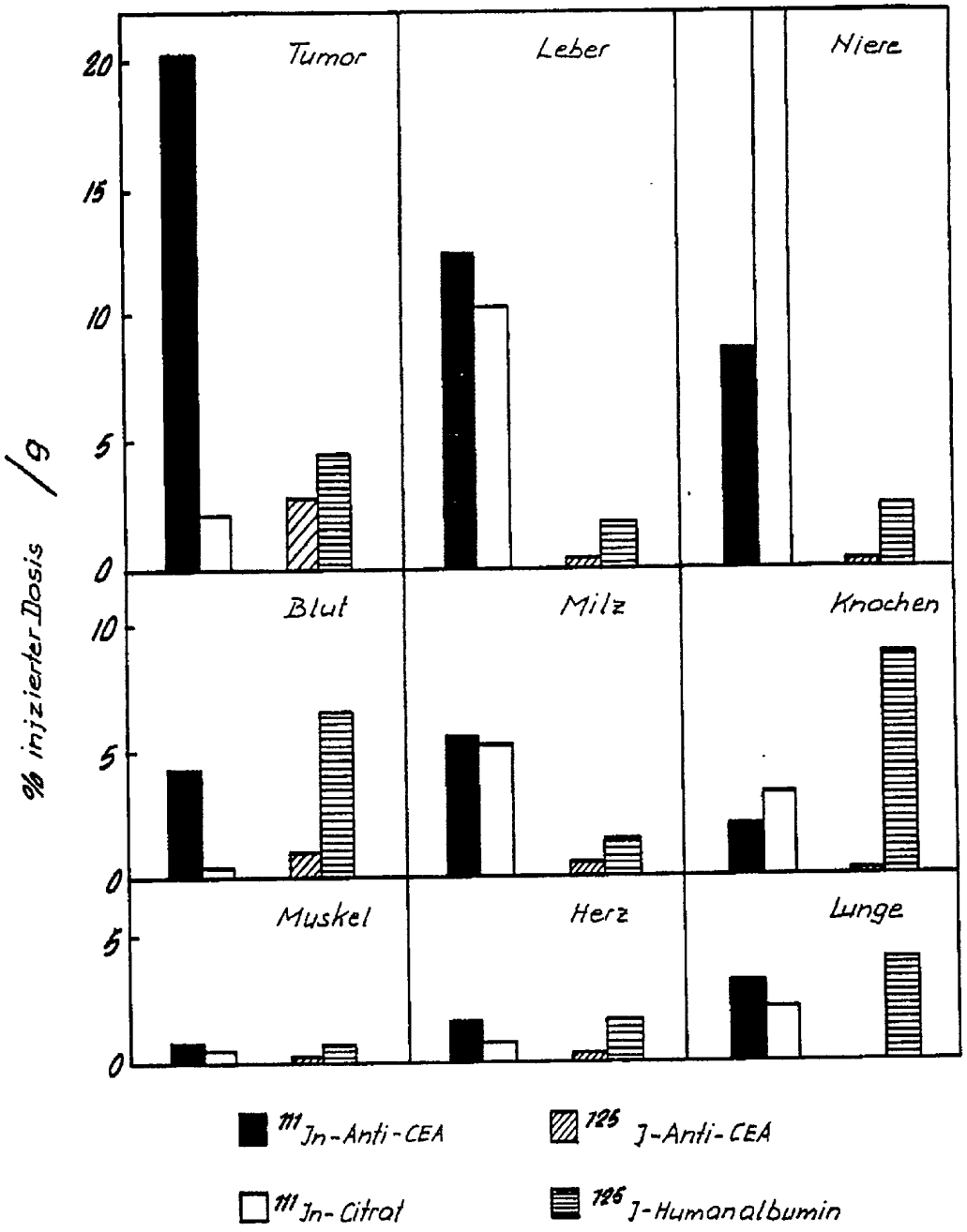

Tumor
Leber
Niere
Blut
Milz
Knochen
Muskel
Herz
Lunge
20
15
10
5
0
10
5
0
5
0
% injizierter Dosis / g
111 In-Anti-CEA
125 J-Anti-CEA
111 In-Citrat
125 J-Humanalbumin

FIG. 3

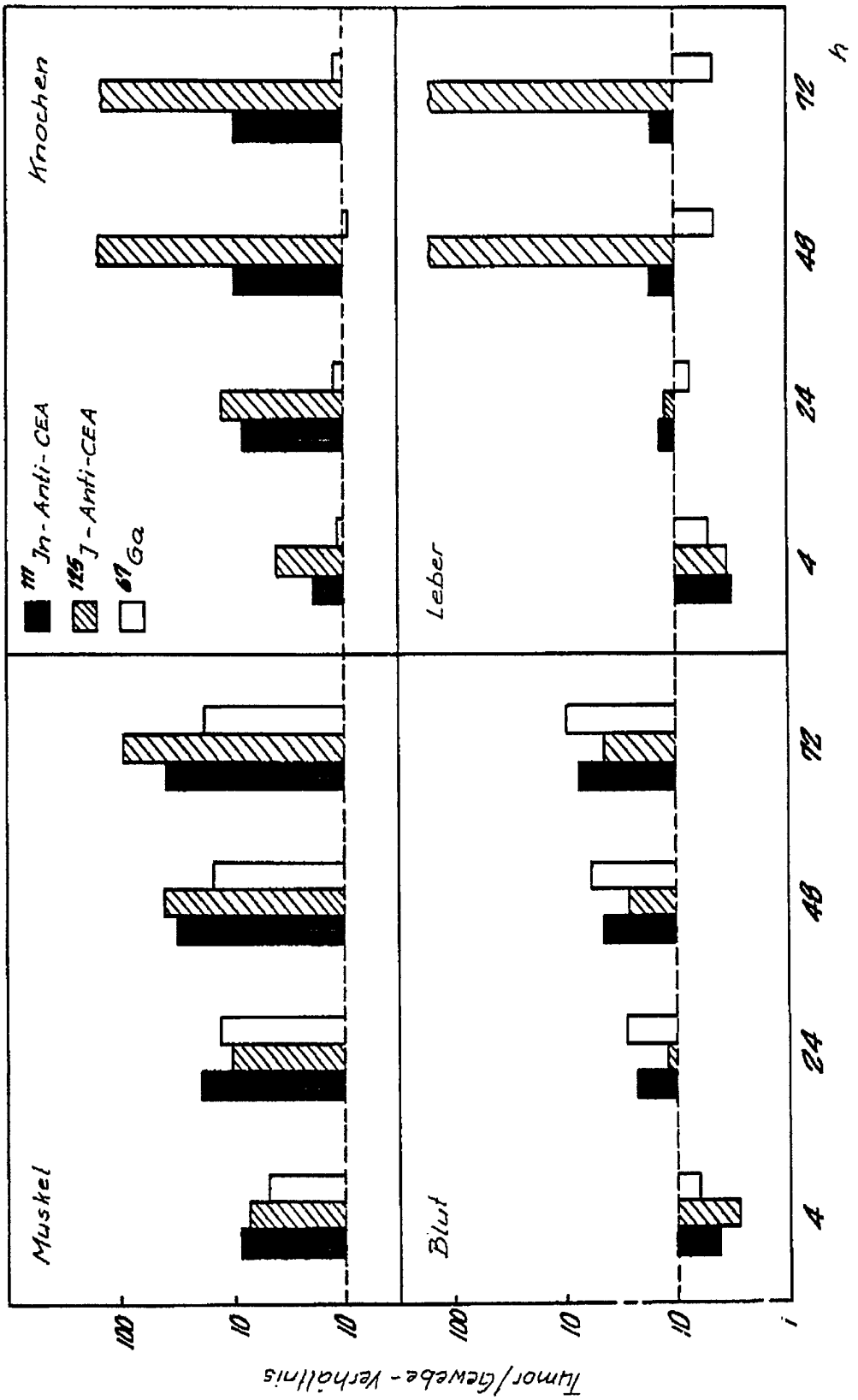

Knochen
Leber
Muskel
Blut
^{111}In-Anti-CEA
^{125}I-Anti-CEA
^{67}Ga
100
10
10
100
10
1
4
24
48
72
4
24
48
72
h
Tumor/Gewebe-Verhältnis

Fig. 4