



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 24 761 T2 2004.08.05**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 873 139 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 24 761.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/00307**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 902 867.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/025069**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.01.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **17.07.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.10.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **10.09.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.08.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 47/48**

A61K 49/00, A61K 51/10

(30) Unionspriorität:

586075 11.01.1996 US

(73) Patentinhaber:

Techniclone, Inc., Tustin, Calif., US

(74) Vertreter:

**Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183
Wiesbaden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**KHAWLI, A., Leslie, Arcadia, US; EPSTEIN, L.,
Alan, La Cadena, US**

(54) Bezeichnung: **BIOTINYLIERTER ANTIKÖRPER MIT VERMINDERTER POSITIVER NETTOLADUNG UND TOXIN,
MEDIKAMENT ODER CHELAT**

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

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen das Gebiet modifizierter Antikörper. Spezifischer gesehen bezieht sich die Erfindung auf chemisch modifizierte Antikörper mit einer erhöhten Bindungsspezifität, mit einer verbesserten Pharmakokinetik und mit verbesserten Lokalisierungsfähigkeiten. Diese modifizierten Antikörper sind besonders nützlich bei der Diagnose und bei der Therapie von Krebs und von anderen Säugetierkrankheiten

Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Die Verwendung von Antikörpern, insbesondere von monoklonalen Antikörpern, („MAB's" = Monoclonal Antibodies) besitzt das Potential, ein äußerst wertvoller Annäherung bei der Diagnose und bei der Behandlung von Krebs zu sein. Eine bedeutende Eigenschaft von MAB's ist deren Spezifität für einzelne Antigene.

[0003] Es sind MAB's erzeugt worden, welche spezifisch für Antigene von Tumorzellen sind. Es ist auch gezeigt worden, dass MAB's wirksam mit Zusätzen, wie etwa mit Radionukliden, gekoppelt werden können. Solche mit Radionukliden markierte MAB's sind nützlich bei der Bereitstellung von klinischen Daten, wie etwa bei dem bildgebenden (imaging) Verfahren für Tumore bei der Immunszintigraphie, ebenfalls bekannt als G-Kamera Bildgebungssystem oder als Radioimmunimaging. Bei der Immunszintigraphie lässt man die MAB's sich an die spezifischen Gewebe- oder Tumortypen binden, welche das Antigen aufweisen, das von den MAB's erkannt wird. Die Radionuklide werden dann durch den Einsatz einer geeigneten Technologie sichtbar gemacht, wie etwa durch den Einsatz einer Germaniumkamera. Es ist die einzigartige Spezifität der MAB's, welche diese zu ihrer Anwendung in der Immunszintigraphie von Tumoren und von anderen Gewebetypen befähigt.

[0004] Die Verwendung der MAB's in der Immunszintigraphie ist jedoch eingeschränkt worden wegen eines hohen Hintergrundpegels und wegen einer geringen Bindungskapazität der MAB's an ihre Antigene. Experimentelle Studien schlagen vor, dass die Bioverteilung von radiomarkierten MAB's von vielen Faktoren abhängig ist, einschließlich von der Spezifität und von der Clearance-Zeit (Klärungszeit bzw. Beseitigungszeit) des Antikörpers. Für eine effektive Diagnose eines Tumors durch die Immunszintigraphie sollte ein Antikörper ausgewählt werden, welcher an ein Antigen anbindet, welches dicht und homogen auf der Tumorzelloberfläche ist. Eine effektive Diagnose durch die Immunszintigraphie erfordert auch, dass der ausgewählte Antikörper wirksam an das Antigen des Tumors anbinden sollte. Oft jedoch bieten MAB's, welche an geeignete Antigene anbinden, nicht die erforderliche hohe Bindungsaffinität. Zusätzlich kann sogar der Einsatz von solchen MAB's, die mit einer hohen Affinität im Vergleich zu anderen MAB's anbinden, einen hohen Grad an nicht spezifischer Bindung erzeugen, was zu hohen Hintergrundpegeln führt, wenn der Einsatz in der Immunszintigraphie stattfindet. Es besteht daher ein Bedarf an einem Verfahren zur Verbesserung der Wirksamkeit der Bindung der MAB's, um die Immunszintigraphie als ein diagnostisches Werkzeug zu verbessern.

[0005] Zusätzlich kann der cytotoxische Effekt der MAB's deutlich durch ein Ankoppeln an Radionuklide, an Arzneimittel oder an Toxine gesteigert werden. Die einzigartige Spezifität der MAB's hat Hoffnungen auf die Entwicklung der Immuntherapie geweckt. In der Immuntherapie werden biologisch aktive Stoffe unter Verwendung von MAB's an besonders unerwünschte Zelltypen verabreicht, etwa an Krebszellen, und dadurch beeinträchtigen sie die unerwünschten Zelltypen, ohne dass andere Zellen des Untersuchungsobjektes beeinträchtigt werden. Immuntherapien erfordern jedoch Antikörper mit einer äußerst hohen Spezifität, um zu vermeiden, dass gesundes Gewebe beeinträchtigt wird. Daher würde ein Verfahren zur Steigerung der Spezifität der MAB's sehr günstig und vorteilhaft sein im Hinblick auf das Erzielen einer sicheren, wirksamen Immuntherapie.

[0006] Viele MAB's verbleiben im Anschluss an die Einführung in das Objekt während mehrerer Tage in dem Kreislauf. Dies ist aus mindestens zwei Gründen unerwünscht. Ein Grund besteht darin, dass die zirkulierenden MAB's hohe Hintergrundpegel bei der Immunszintigraphie erzeugen. Ein zweiter Grund besteht darin, dass die zirkulierenden MAB's, die an Radionuklide oder an andere potentiell cytotoxische Stoffe gekoppelt sind, nach einer verlängerten Aussetzung unerwünschte Nebeneffekte in dem Subjekt erzeugen können. Daher besteht ein Bedarf an einem Verfahren zur Verminderung der Clearance-Zeit von MAB's. Natürlich würde eine zu große Abnahme dazu führen, dass MAB's ausgeschieden werden, bevor irgendein wirkungsvoller Gebrauch von den MAB's gemacht werden könnte. Daher besteht ein besonderer Bedarf an einem Verfahren zur Verminderung der Clearance-Zeit von MAB's, ohne dass die Aufnahme der MAB's wesentlich durch ein Tumorgewebe oder durch ein anderes Gewebe beeinträchtigt wird.

[0007] Ein Faktor, welcher kritisch ist im Hinblick auf die Bestimmung von beiden Faktoren, nämlich sowohl von der Spezifität als auch von der Clearance-Zeit eines Antikörpers, ist die Form des Antikörpers. Wie hierin verwendet bezieht sich ein „intaktes" Antikörpermolekül auf ein nicht modifiziertes Antikörpermolekül, welches

aus zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten besteht. Das intakte, ganze Antikörpermolekül kann auf der Seite des Reaktanden der chemischen Gleichung nach **Fig. 1** gesehen werden. Wie man aus der **Fig. 1** ersieht, ist das intakte Molekül in die Bereiche F_c und F_{ab} aufgeteilt. $F(ab')_2$, die bivalente Form des F_{ab} Fragmentes, kann auch durch die Verdauung des F_c Bereiches mit einer Protease erzeugt werden.

[0008] Die zwei schweren Ketten (als „H“ in der **Fig. 1** bezeichnet) werden durch eine oder durch mehrere Disulfidbrücken zusammengehalten. In intakten Molekülen sind diese Disulfidbrücken normaler Weise vor reduzierenden Mitteln geschützt. Man hat jedoch herausgefunden, dass das Entfernen des F_c Bereiches eine leichte Reduktion der Disulfidbrücken zulässt. Daher kann $F(ab')$, die monovalente Form, aus $F(ab')_2$ durch die Wirkung eines mäßigen reduzierenden Mittels erzeugt werden. Parham, P. beschreibt in „On the Fragmentation of Monoclonal IgG1, IgG2a and IgG2b from BALB/c Mice.“, J. Immunol. 131: 2859 (1983), dessen Offenbarung durch diese Bezugnahme mit hierin eingeschlossen wird, ein Verfahren für die Herstellung von $F(ab')$ und $F(ab')_2$. Eine schematische Darstellung der Veränderungen, von denen man vermutete, dass sie bei diesem Verfahren eintreffen, wird in der chemischen Gleichung der **Fig. 1** gezeigt.

[0009] Von F_c hat man herausgefunden, dass es verantwortlich ist für einen großen Umfang der nicht spezifischen Bindung von Antikörpermolekülen. Man glaubt auch, dass das Molekulargewicht der Fragmente unter dem Schwellenwert für eine glomeruläre Filtration liegt, was eine schnelle Ausscheidung der Fragmente erlaubt. Daher hat ein Ansatz für die Verbesserung der Clearance-Zeit von Antikörpern für den Gebrauch bei dem Radioimaging darin bestanden, den intakten Antikörper in verschiedene Fragmente aufzubrechen, wie etwa in Fab und in dessen divalente Formen $F(ab')_2$. Wie man dies erwartet hat, werden diese Fragmente so schnell von dem Körper gelöst, dass deren Nützlichkeit klein ist. Darüber hinaus können diese Fragmente zu einer verminderten Aufnahme (uptake) durch das Tumorgewebe oder durch ein anderes Zielgewebe in Bezug auf den intakten Antikörper führen. Daher hat man herausgefunden, obwohl die Verwendung dieser Fragmente in der Immunszintigraphie eine bessere Beseitigung (clearance) und ein größeres Verhältnis von Zielgewebe zu Hintergrund liefert als mit intakten MAB's, dass die absolute Konzentration von MAB's in dem Zielgewebe, welches das Antigen enthält, an welches die MAB's sich anbinden werden, bis zu drei Mal so groß ist, oder sogar noch mehr, mit intakten MAB's als mit irgend einem der Fragmente. Weiterhin werden beide Typen der Fragmente sehr schnell aus dem Blutstrom entfernt. Dementsprechend ist die Zeit der Wirksamkeit für eine Diagnose- oder Therapietechnik, welche diese Fragmente nutzen, sehr kurz.

[0010] Heterobifunktionale Reagenzien sind Reagenzien mit zwei Gruppen, welche in der Lage sind, an verschiedenen Reaktionen teilzunehmen. Zum Beispiel Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) ist heterobifunktional in der Hinsicht, dass seine N-Hydroxysuccinimidestergruppe mit Aminogruppen reagiert und die 2-Pyridyldisulfidstruktur mit aliphatischen Thiolen reagiert.

[0011] Orlandi et al. berichteten in „Change in Binding Reactivity of an Anti-Tumor Monoclonal Antibody After the Introduction of 2-Pyridyl Disulphide Groups“, Hybridoma 5 : 18 (1986), dass ein Anstieg bei der in vitro Bindung von MAB's, die gegen einen menschlichen Eierstockkrebs gerichtet waren, nach einer chemischen Konjugation mit dem heterobifunktionalen Reagens, SPDP, erzielt werden konnte.

[0012] Die von Orlandi et al. verwendeten konjugierten MAB's wiesen im Durchschnitt 11 PDP Gruppen pro Molekül auf. Orlandi et al. fanden heraus, dass die veränderten MAB's ihre Bindungsaktivität in vitro bis zu einem Ausmaß steigern, dass Moleküle, welche nicht von den nicht veränderten MAB's nachgewiesen werden konnten, nunmehr nachgewiesen werden können. Diese Forscher berichteten von keinen Studien über die Verwendung der konjugierten MAB's in vivo. Außerdem glaubten diese Forscher, dass Moleküle, die eine sehr geringe Anzahl von Antigenstellen aufweisen, durch die konjugierten MAB's nachgewiesen werden konnten. Dementsprechend besaßen die mit PDP veränderten MAB's eine stark verminderte Spezifität für Zielzellen in Bezug auf die nicht veränderten Gegenstücke.

[0013] Daher verbleibt trotz der obigen Fortschritte ein Bedarf an veränderten Antikörperfragmenten bestehen, welche eine größere spezifische Aktivität gegenüber Antigenen von Tumoren zeigen, welche es zulassen, dass sich eine größere absolute Konzentration an Antikörpern in dem Tumor akkumuliert, und welche auch eine relativ schnelle Clearance-Zeit aus dem Blutpool besitzen, aber noch nicht so schnell, dass es zu einer Verminderung der therapeutischen oder der diagnostischen Wirksamkeit kommt.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0014] **Fig. 1** zeigt eine schematische Darstellung der Veränderungen, von denen man annimmt, dass sie in einem Verfahren zur Herstellung von $F(ab')$ und $F(ab')_2$ Fragmenten auftreten.

[0015] **Fig. 2** zeigt die gesamte Körperretention verschiedener Herstellungen von radiomarkierten MAB's Lym-1 bei athymischen nackten Mäusen.

[0016] **Fig. 3** zeigt die Bioverteilung in % der injizierten Dosis/Gramm von MAB's Lym-1 und von einem veränderten Lym-1 in nackten Mäusen, die ein menschliches Lymphom tragen, sieben Tage nach der Injektion.

[0017] **Fig. 4** zeigt die Bioverteilung als Verhältnisse Tumor /Organ von MAB's Lym-1 und von einem veränderten Lym-1 in nackten Mäusen, die ein menschliches Lymphom tragen, sieben Tage nach der Injektion.

- [0018] **Fig. 5** zeigt die Bioverteilung in % der injizierten Dosis/Gramm von MAb's Lym-1 F(ab')₂ und von einem veränderten Lym-1 in nackten Mäusen, die ein menschliches Lymphom tragen, fünf Tage nach der Injektion.
- [0019] **Fig. 6** zeigt die Bioverteilung als Verhältnis Tumor/ Organ von MAb's Lym-1 F(ab')₂ und von veränderten Lym-1 in nackten Mäusen, die ein menschliches Lymphom tragen, fünf Tage nach der Injektion.
- [0020] **Fig. 7** zeigt die Bilddarstellung, welche man am Tag 7 nach der Injektion von I-131 markiertem intaktem Lym-1 erhält.
- [0021] **Fig. 8** zeigt die Bilddarstellung, welche man am Tag 7 nach der Injektion von I-131 markiertem verändertem Lym-1 erhält.
- [0022] **Fig. 9** zeigt die Bilddarstellung, welche man am Tag 7 nach der Injektion von I-131 markiertem verändertem Lym-1 erhält.
- [0023] **Fig. 10** zeigt die Bilddarstellung, welche man am Tag 5 nach der Injektion von I-131 markiertem verändertem Lym-1 erhält.
- [0024] **Fig. 11** zeigt die gesamte Körperretention verschiedener Herstellungen aus radiomarkierten, monoklonalen Antikörpern B72.3 bei athymischen nackten Mäusen.
- [0025] **Fig. 12** zeigt die Bioverteilung in % der injizierten Dosis/Gramm von MAb's B72.3 und von einem veränderten B72.3 in nackten Mäusen, die ein menschliches LS174T Dickdarmkarzinom tragen, vier Tage nach der Injektion.
- [0026] **Fig. 13** zeigt die Bioverteilung als Verhältnis Tumor/ Organ von MAb's B72.3 und von einem veränderten B72.3 in nackten Mäusen, die ein menschliches LS174T Dickdarmkarzinom tragen, vier Tage nach der Injektion.
- [0027] **Fig. 14** zeigt die Bilddarstellung, welche man am Tag 1 nach der Injektion von I-131 markiertem, verändertem B72.3 erhält.
- [0028] **Fig. 15** zeigt die Bilddarstellung, welche man am Tag 4 nach der Injektion von I-131 markiertem, verändertem B72.3 erhält.
- [0029] **Fig. 16** zeigt die gesamte Körperretention von verschiedenen Herstellungen von radiomarkierten MAb's TNT-1 bei athymischen nackten Mäusen.
- [0030] Die **Fig. 17A–D** zeigen eine Reihe von Balkendiagrammen. Die **Fig. 17A** und **17C** stellen den Prozentsatz von injiziertem, intaktem TNT-1 und von biotiniliertem TNT-1 dar, welche Tumorgewebe und verschiedene Gewebe lokalisieren. Die **Fig. 17B** und **17D** stellen die Verhältnisse von markierten Antikörpern dar, welche Tumorgewebe und verschiedene Organe lokalisieren.
- [0031] **Fig. 18** zeigt eine Liniengraphik, welche die Gesamtkörperclearance von intaktem TNT-1, verändertem TNT-1 und F(ab')₂ Fragmenten in Balb/c Mäusen zeigt.
- [0032] **Fig. 19** zeigt eine Liniengraphik, welche die Gesamtkörperclearance von intaktem Lym-1, verändertem Lym-1 und F(ab')₂ Fragmenten in Balb/c Mäusen zeigt.

Zusammenfassung der Erfindung

- [0033] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf einen Antikörper, welcher mit Biotin als einem chemischen Reagens an mindestens einer aus einer großen Anzahl von freien Aminogruppen konjugiert ist, welche an dem Antikörper angeordnet sind, um einen veränderten Antikörper zu erzeugen. Der Antikörper weist eine im Vergleich zu einem intakten Antikörper verminderte positive Nettoladung auf. Der Antikörper weist auch eine in vivo Clearance-Geschwindigkeit (clearance rate) auf, welche zwischen den Clearance-Geschwindigkeiten der F(ab')₂ Fragmente und denjenigen der intakten Antikörper von demselben Typ liegen. In den Antikörpern ist das chemische Reagens unter diesem Aspekt der Erfindung kein heterobifunktionaler Wirkstoff. Die Antikörper enthalten auch einen daran gebundenen chemischen Anteil. Der Antikörper kann ein monoklonaler Antikörper oder ein polyklonaler Antikörper sein. Das chemische Reagens kann Biotin sein, ein Methylchelate, wie etwa N₂S₂ oder N₂S₄, ein anderer Chelatbildner wie EDTA, DPTA oder TETA, oder ein Farbstoff wie FITC. Der chemische Anteil ist oft eine Markierung, wie etwa ein Radionuklid. Das Radionuklid kann Technetium oder ein Halogenradionuklid, wie ¹²⁵I oder ¹³¹I, sein. In gewissen Ausführungsformen kann die Markierung durch das bildgebende Verfahren auf der Basis der magnetischen Resonanz (MR) nachweisbar sein. Der chemische Anteil kann aus einem biologisch aktiven Molekül bestehen, etwa aus einem Toxin, aus einem Arzneimittel und aus einem Chelat. Geeignete Arzneimittel schließen mit ein; Methotrexat, 5-Fluoruracil, cis-Platin und Adriamycin. Ein geeignetes Toxin ist eine Rizin A-Kette.
- [0034] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung liegt bei einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Immunszintigraphie. Die Zusammensetzung enthält einen markierten Antikörper, welcher mit einem Biotin als einem chemischen Reagens an freien Aminogruppen konjugiert ist, welche an dem markierten Antikörper angeordnet sind, so dass der Antikörper eine im Vergleich zu einem intakten Antikörper verminderte positive Nettoladung aufweist und ein Arzneistoffträger, ein Substratträger oder eine Basis, welche für die Immunszintigraphie akzeptiert werden können.
- [0035] Noch ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in einem Verfahren für die Herstellung

eines markierten, veränderten Antikörpers mit einer erhöhten Spezifität für die Antigenbindung, mit einer verminderten nicht-spezifischen Bindung und mit einer verminderten in vivo Clearance-Zeit. Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte: das Gewinnen eines intakten Antikörpers mit einer Spezifität für die Bindung mit einem Antigen, welches nachgewiesen werden soll, wobei der native Antikörper eine große Anzahl von an demselben angeordneten freien Aminogruppen aufweist, ein Reagieren von mindestens einer der freien Aminogruppen mit Biotin als einem chemischen Wirkstoff herbeiführen, um einen veränderten Antikörper derart zu erzeugen, dass der veränderte Antikörper einen isoelektrischen Punkt aufweist, welcher niedriger liegt als der isoelektrische Punkt des intakten Antikörpers; und ein Markieren des veränderten Antikörpers mit einer Markierung, die nachgewiesen werden kann. Das Verfahren erzeugt einen markierten, veränderten Antikörper. Die Markierung in diesem Verfahren kann durch die Immunszintigraphie nachgewiesen werden, wie etwa durch eine Gammakamera.

[0036] Das Ziel der Erfindung ist in den Ansprüchen definiert.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0037] Wir haben entdeckt, dass eine chemische Veränderung von Antikörpern, einschließlich von MAb's, menschlichen Antikörpern, genetisch behandelten Antikörpern, chimerischen Antikörpern, synthetischen Antikörpern und von polyklonalen Antikörpern, durch eine Konjugation mit einem Reagens, welches freie Aminogruppen verändert, eine spezifische Antigenbindung erhöhen, eine nicht-spezifische Bindung vermindern und in vivo Clearance-Zeiten vermindern kann. So veränderte Antikörper weisen eine im Vergleich zu einem intakten Antikörper verminderte positive Nettoladung auf. Beispiele von Reagenzien, welche wir verwendet haben, um freie Aminogruppen gemäß der vorliegenden Erfindung zu verändern, umfassen ein heterobifunktionales Reagens, wie SPDP, oder ein biotiniliertes Reagens. Experten auf diesem Gebiet werden jedoch erkennen, dass eine breite Vielfalt von chemischen Reagenzien verwendet werden kann, um freie Aminogruppen zu verändern und um dadurch den gesamten isoelektrischen Punkt des Antikörpers zu erniedrigen. Somit können zum Beispiel Methylchelat, wie N_2S_2 und N_2S_4 , andere Chelate, wie EDTA, DPTA oder TETA, und eine Anzahl von Farbstoffen, wie FITC, verwendet werden, um wirksame Ergebnisse gemäß der vorliegenden Erfindung zu erzielen. In Nucl. Med. Biol., 18: 179–185 (1991) wird eine Beschreibung der Bindung von N_2S_4 an Antikörper beschrieben für einen anderen Zweck als für den hier gemäß der vorliegenden Erfindung beschriebenen. Dieser Artikel wird durch diese Bezugnahme mit hierin eingebunden.

[0038] Chemische Veränderungen von freien Aminogruppen führten in überraschender Weise zu einer erhöhten Akkumulation von veränderten Antikörpern in den Zielzellen, welche das Antigen enthalten, an welches die Antikörper anbinden werden. Von anderen heterobifunktionalen Reagenzien als SPDP, inbegriffen von Sulfo-succinimidyl-2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat (SASD), Sulfo-succinimidyl-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-ethyl-1,3'-dithiopropionat (SAND), Sulfo-succinimidyl-(4-azidophenylthio)propionat (sulfo-SADP) und 2-Aminothioliol HCL (Trauts Reagens), glaubt man, dass diese ähnliche Ergebnisse liefern, wenn sie mit Antikörpern gemäß der vorliegenden Erfindung konjugiert werden.

[0039] Die veränderten Antikörper der vorliegenden Erfindung können in vorteilhafter Weise mit einer anderen chemischen Hälfte verbunden werden, um einen günstigen, spezifischen diagnostischen oder therapeutischen Vorteil zu erbringen. Zum Beispiel kann irgendeine aus der Vielfalt gut bekannter Markierungen angebunden werden, etwa ein Radionuklid oder ein Enzym. Eine therapeutische Hälfte, wie eine antineoplastische Verbindung oder ein Toxin, kann auch angebunden werden.

[0040] Beide Stoffe, nämlich sowohl die heterobifunktionalen Wirkstoffe als auch das Biotin, sind ehemals als Verbindungsmittel verwendet worden, um Markierungen und andere Anteile bzw. Hälften an Antikörper anzubinden. Biotin selbst kann unter gewissen Umständen als eine Markierung funktionieren. Allerdings sind weder Biotin noch die heterobifunktionalen Wirkstoffe mit dem Ziel eines Veränderns von Antikörpern verwendet worden, um eine erhöhte spezifische Bindung, eine verminderte nicht-spezifische Bindung und verminderte in vivo Clearance-Zeiten zu erzielen. Anders als bei der vorliegenden Erfindung wiesen daher die bisherigen Antikörper nach dem Stand der Technik keinen verändernden Wirkstoff auf, etwa einen heterobifunktionalen Wirkstoff oder Biotin, welcher an einer ersten Bindungsstelle an demselben angebunden ist, und keine angebundene Markierung oder eine andere chemische Hälfte an einer zweiten Bindungsstelle an demselben. Bei der vorliegenden Erfindung wird die zweite Bindungsstelle im Allgemeinen keinen angebundenen, verändernden Wirkstoff von demselben Typ aufweisen wie derjenige des modifizierenden Wirkstoffes, welcher an der ersten Bindungsstelle angebunden ist.

[0041] Man nimmt an, dass die erhöhte Akkumulation der veränderten Antikörper auf die erhöhte spezifische Bindungskapazität zurückzuführen ist. Wir haben herausgefunden, dass durch die Konjugation im Durchschnitt nur eine PDP Gruppe pro Antikörpermolekül auftritt und dass ein dramatischer Anstieg in der Spezifität des Moleküls für seine Zielzellen auftritt im Vergleich zu einem nicht veränderten Antikörper. Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung von biotinilierten Antikörpern erzielt.

[0042] Wir haben auch entdeckt, dass eine chemische Veränderung von freien Aminogruppen an IgG durch

Konjugation mit einem heterobifunktionalen Reagens oder mit Biotin in vorteilhafter Weise auch die Beseitigung aus normalen Geweben erhöht. Obwohl man nicht wünscht, durch irgendeine besondere Erklärung dieses Effektes gebunden zu sein, kann man sich vorstellen, dass solche Veränderungen zu einer Fragmentierung des Antikörpers führten, zu einer Form mit einem Molekulargewicht unter dem Schwellenwert für eine glomeruläre Filtration, was eine schnelle Trennung der Fragmente erlaubt. Es ist sogar möglich, dass eine Fragmentierung des Antikörpers zu der monovalenten Form des Antikörpers eintritt. Was immer die exakte Form der resultierenden Fragmente sein mag, die Eliminierung dieser Fragmente ist, in vorteilhafter Weise, nicht so schnell, dass dadurch die diagnostische oder die therapeutische Wirksamkeit der veränderten Antikörper eingeschränkt wird.

[0043] Wie oben offenbart worden ist, sind veränderte Antikörper, welche in der Praxis der Erfindung nützlich sind, chemisch verändert an freien Aminogruppen und sie sind zusätzlich markiert mit einer nachweisbaren Markierung. Während entweder der Antikörper selbst oder das chemischen Reagens, welches dazu verwendet wird, um freie Aminogruppen zu verändern, markiert werden können, haben wir auch deutlich gezeigt, dass ein Markieren des veränderten Antikörpers an einer anderen Stelle als an den freien Aminogruppen einen Antikörper liefern kann, welcher für die Praxis der Erfindung von Nutzen ist. Weiterhin, wenn eine Markierung chemisch mit dem Antikörper konjugiert ist, entweder vor oder nach der chemischen Veränderung des Antikörpers an freien Aminogruppen, dann kann diese Markierung an den Antikörper an einer anderen Stelle als an der einer freien Aminogruppe angebunden werden und an einer anderen Stelle als an der des die Aminogruppe verändernden Reagenzes, wenn dieses Reagens ein heterobifunktionales Reagens ist. Wie hier spezifisch offenbart ist, können in dem Protein des Antikörpers vorhandene Tyrosinreste durch eine Behandlung mit Radiojod verändert werden. Nachweisbare Markierungen jedoch, welche an Tyrosinreste eines Antikörpers gebunden werden können, sind nicht auf Jod begrenzt. Andere Markierungen, welche an Tyrosinreste eines Antikörpers gebunden werden können, schließen Halogenradionuklide mit ein, wie etwa die Isotope von F, Cl, Br, I und von anderen. Die Anbindung von solchen Halogenradionukliden an Antikörper ist beschrieben worden von Wilbur, Bioconj. Chemic, 3: 433–470 (1992), dessen Offenbarung durch die Bezugnahme mit hierin eingebunden wird. Radionuklide des Technetiums binden an andere Reste auf dem Antikörpermolekül. Weiterhin sind andere Markierungen und Verfahren zur Markierung von Antikörperproteinen nützlich bei der Praxis der Erfindung, wie es für einen Experten auf diesem Gebiet der Technik leicht offensichtlich ist. Die Experten auf diesem Gebiet der Technik werden erkennen, dass funktionelle Gruppen an Seitenketten einer Aminosäure eines Antikörperproteins als Bindungsstellen einer Markierung dienen können. Die Wahl der Markierungen, der Bindungsstellen und der Verfahren zur Konjugation der Markierung und des Antikörpers werden von den Experten auf diesem Gebiet der Technik erkannt werden. Die wichtige Bereitstellung in Bezug auf die praktische Operabilität der Erfindung besteht darin, dass der veränderte Antikörper eine angebundene Markierung aufweist.

[0044] Allgemeinen gesehen haben wir entdeckt, dass Antikörper, welche chemisch verändert worden sind, um verminderte isoelektrische Punkte (pIs) relativ zu nicht veränderten Antikörpern zu besitzen, eine verbesserte Zielspezifität zeigen. Spezifischer ausgedrückt, unsere Ergebnisse zeigen, dass eine chemische Veränderung von freien Aminogruppen auf Antikörpern diese verbesserte Zielspezifität übertragen kann. Diese chemischen Veränderungen können eine Veränderung durch Wirkstoffe mit umfassen, wie etwa die oben erwähnten heterobifunktionalen Wirkstoffe und das Biotin, aber die Wirkstoffe sind nicht auf diese beschränkt. In der Tat, irgendeine chemische Veränderung von freien Aminogruppen, die auf einem Antikörper vorhanden sind, welche den pI des Antikörpers wirksam vermindern wird, wird die verbesserte Zielspezifität liefern.

[0045] Obwohl wir nicht wünschen, durch irgendeine besondere Theorie gebunden zu sein, wie etwa durch die Erklärung des Ursprungs dieser Verbesserung, postulieren wir, dass eine nicht spezifische Antikörperbindung teilweise auf nicht spezifische elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Dies ist eine vernünftige Annahme im Lichte der Beobachtung, dass MAb's positiv geladen sind bei einem physiologischen pH-Wert, während Säugetierzellen negativ geladen sind [Eichmann et al. J. Exp. Med: 131 : 207; Silva Filho et al. J. Leukocyte Biol. 41 : 143 (1987)]. Daher vermindert eine Änderung des positiven Ladungscharakters eines intakten Antikörpers auf wirksame Weise die nicht spezifische Bindung auf Grund der Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Geweben und positiv geladenen Antikörperproteinen. Indem man diese nicht spezifischen Wechselwirkungen minimiert, ist die Antikörperspezifität, welche den Antigen-Bindungs Bereichen des Antikörpers zuzuordnen ist, vorherrschend für die Bestimmung der Bindungsspezifität verantwortlich. Daher wird irgendein Antikörper mit einer großen Anzahl von Hälften mit Aminostellen, welcher so verändert worden ist, dass der pI des Antikörpers relativ zu dem unveränderten Antikörper vermindert ist, eine verbesserte Zielspezifität zeigen auf Grund der Tatsache, dass er verminderte nicht spezifische Wechselwirkungen mit nicht verwandten Antigenen aufweist. Wir entdeckten jedoch auch, dass ein zweites Merkmal der gemäß der Erfindung veränderten Antikörper diese besonders nützlich für eine in vivo Antigenlokalisation macht.

[0046] Zwei Faktoren, welche das Verhältnis von Signal zu Rauschen, das als das Verhältnis „Tumor/Organ“ dargestellt werden kann, bei den auf einem Antikörper beruhenden bildgebenden Antigenverfahren verbessern können, sind: (1) eine erhöhte Tumorkonlokalisierung, und (2) verminderte Grade eines nicht spezifisch gebundenen, markierten Antikörpers. Wir haben jetzt entdeckt, dass MAb's, welche chemisch verändert worden sind,

um verminderte isoelektrische Punkte relativ zu dem unveränderten, intakten MAb zu besitzen, in vorteilhafter Weise die Bindungsspezifität erhöhen können, während dabei die nicht spezifische Bindung vermindert wird und die Clearance-Zeit des Gesamtkörpers relativ zu dem nicht veränderten Antikörper abnimmt.

[0047] Wir haben weiterhin entdeckt, dass eine erhöhte Antikörperspezifität und erhöhte Fähigkeiten zur Lokalisation erzielt werden können unter Verwendung von chemisch veränderten Antikörpern mit einer auf diesen angeordneten, nachweisbaren Markierung. Solch eine Markierung kann zum Beispiel ein Radionuklid sein. Spezifischer gesehen haben wir jetzt entdeckt, dass Antikörper, welche verändert worden sind, um Biotinanteile zu enthalten, eine wesentlich verbesserte Kapazität für eine Antigenbindung zeigen. Wie unten offenbart, sind markierte, biotinilierte Antikörper in einem Verfahren zur Lokalisierung von Tumorzellen in vivo verwendet worden. In der Praxis des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es wesentlich für den chemisch veränderten Antikörper, direkt markiert zu werden. Dies steht im Gegensatz zu Verfahren, welche Antikörper verwenden, die indirekt markiert worden sind, wie dies von Khawli et al. in der Veröffentlichung *Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals*, 6 : 13 (1993), beschrieben worden ist, welche durch diese Bezugnahme mit hierin eingebunden wird.

[0048] Somit können Reagenzien hergestellt werden, welche bei Verfahren für eine verbesserte Tumorlokalisierung nützlich sind, indem man einen Antikörper mit einer spezifischen Bindung für ein gewünschtes Zielantigen gewinnt, indem man die freien Aminogruppen auf dem Antikörper chemisch verändert unter Einsatz eines Reagenzes, etwa eines heterobifunktionalen Reagenzes oder des Biotins, und indem man dann den Antikörper mit einer nachweisbaren Markierung markiert, etwa mit einem Radionuklid. In der Praxis ist die Reihenfolge der Schritte der chemischen Veränderung und der radioaktiven Markierung optional. Weiterhin kann ein Schritt für die radioaktive Markierung von im Wesentlichen gereinigten Antikörpern weggelassen werden, wenn die in dem Verfahren eingesetzten Antikörper MAb's sind und wenn das Hybridoma, welches diese MAb's erzeugt, sich in einem Wachstumsmedium ausbreitet, welches markierte Vorgänger enthält, die in die MAb Produkte der Hybridoma mit eingebunden sind. Somit können zum Beispiel radioaktiv markierte und biotinilierte MAb's, welche in Verbindung mit der Erfindung nützlich sind, erzeugt werden durch ein Ausbreiten der den MAb erzeugenden Zelllinie in einem Wachstumsmedium, welches radioaktiv markierte Aminosäuren enthält, welche die radioaktiv markierten MAb's aufsammeln, und welches die radioaktiv markierten MAb's biotiniliert. Alternative Verfahren zur Markierung von Antikörpern, entweder vor oder nach einem Schritt zur Biotinilisierung, werden den Experten auf diesem Gebiet der Technik offensichtlich sein.

[0049] Das hier beschriebene Verfahren beinhaltet, obwohl es Bezug nimmt auf das von Khawli et al. in *Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals*, supra, offenbarte Verfahren, in vorteilhafter Weise weniger Schritte für die Abbildung von Tumorzellenantigenen in vivo, und es liefert in unerwarteter Weise bessere Ergebnisse als das einfache Verwenden radioaktiv markierter Antikörper, denen es an Biotingruppen mangelt. Daher offenbaren wir hiermit, dass biotinilierte Antikörper ein besseres Zielverhalten zeigen im Vergleich zu nicht biotinilierten Antikörpern. Da ein Antikörper, welcher in Verbindung mit der Erfindung nützlich ist, kraft einer Markierung nachgewiesen werden kann, welche auf dem Antikörper getragen wird, liefert das Vorhandensein von Biotingruppen auf dem markierten Antikörper offensichtlich Vorteile in Bezug auf die Zielfindung und auf den Nachweis. Daher enthalten die wesentlichen Merkmale von Antikörpern, welche in Verbindung mit der Erfindung und in Verbindung mit Antikörpern nützlich sind, (1) Anteile von Aminosiden, welche chemisch so verändert sind, dass der pI des veränderten Antikörpers vermindert ist im Vergleich zu dem nicht veränderten Antikörper, und (2) eine Markierung, welche von einer Nachweisvorrichtung nachgewiesen werden kann.

[0050] Die veränderten Antikörper der vorliegenden Erfindung haben in vorteilhafter Weise eine überraschend erhöhte diagnostische und therapeutische Wirksamkeit relativ zu den Fragmenten der Antikörper wie $F(ab')$ oder $F(ab')_2$.

[0051] Das folgende Beispiel zeigt ein beispielhaftes Verfahren für die Einführung von im Durchschnitt einer PDP Gruppe an einen monoklonalen Antikörper.

BEISPIEL 1

Veränderung von Lym-1 mit SPDP

[0052] Lym-1 (IgG_{2a}), der monoklonale Antikörper gegen ein B Zellen Lymphom, wurde erzielt wie bei Epstein, A. L. et al., *Two New Monoclonal antibodies, Lym-1 and Lym-2, Reactive with Human B-lymphocytes and Derived Tumors, with Immunodiagnostic and Immunoreactive Potential*, *Cancer Res.* 47: 830–840 (1987), wovon die Offenbarung durch diese Bezugnahme mit hierin eingebunden wird. Die Lym-1 MAb's wurden funktionalisiert unter Verwendung von SPDP, einem heterobifunktionalen Reagens, welches mit freien Aminogruppen auf Antikörpern reagiert wie bei Carlson, J. et al., *Protein Thiolation and Reversible Protein-Protein Conjugation: N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat, A New Heterobifunctional Reagent*, *Biochem. J.* 173 : 723 : 737 (1978), wovon die Offenbarung durch diese Bezugnahme mit hierin eingebunden wird. In ein 5 ml Reagensglas, welches 1 ml des Lym-1 (10 mg/ml) in PBS mit pH 7,2 enthielt, wurden 20 μ l von 3 mg SPDP in 1 ml

Ethanol und 40 µl N,N-Dimethylformamid hinzugefügt. Die Mischung wurde während 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei währenddessen kontinuierlich gemischt wurde, unter Verwendung eines Einrichtungssatzes eines Orbitalrüttlers bei normaler Geschwindigkeit. Nach der Inkubation wurde die funktionalisierte Lym-1 Lösung gereinigt durch einen Durchgang durch eine PD-10 Säule, welche mit PBS im Gleichgewicht gehalten wurde.

[0053] Der Grad der Funktionalisierung von Lym-1 mit SPDP wurde festgelegt, um einen Durchschnitt von einer PDP Gruppe pro Molekül darzustellen, durch Messung der Freisetzung von Pyridin-2-thion bei 343 nm nach der Reduktion eines Aliquots der Lym-1 Lösung mit einem molaren Überschuss von 7 mg Dithioerythritol in einer Salzlösung eines Phosphatpuffers (PBS) (PBS = Phosphat Buffer saline Solution), pH 7,2, wie bei Grassetti, D. R. und Murray, J. F., Determination of Sulfhydryl Groups with 2,2'- or 4,4'- Dithiodipyridin, Arch. Bioch. Biophys. 119: 41–49 (1967), wovon die Offenbarung durch diese Bezugnahme mit hierin eingebunden wird.

[0054] Der veränderte Antikörper aus Beispiel 1 wurde durch eine Schnellprotein Flüssigkeitschromatographie (Fast Protein Liquid Chromatography = FLPC) analysiert, um zu zeigen, dass die Antikörper im Wesentlichen intakt blieben. Diese Analyse wird in Beispiel 2 gezeigt.

BEISPIEL 2

Analyse von verändertem Lym-1 durch eine Schnellprotein Flüssigkeitschromatographie (FLPC \equiv fast protein chromatography)

[0055] Die Analyse des veränderten Antikörpers aus Beispiel 1 wurde erzielt durch eine Schnellprotein Flüssigkeitschromatographie (FPLC), ausgestattet mit einem UV Spektrometer von einer festen Wellenlänge, die auf 280 nm eingestellt war. Eine Chromatographie zum Größenausschluss wurde durchgeführt an einer Superose-12 Säule (Pharmacia) mit PBS pH 7,2 als dem Lösungsmittelsystem, welches bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min herauslöste. Das veränderte Lym-1 erschien bei einer Verweilzeit von 690 Sekunden, identisch mit der Verweilzeit des nicht markierten, intakten Lym-1.

[0056] Somit zeigt Beispiel 2, dass die SPDP-veränderten Antikörper sich praktisch identisch verhielten wie die nicht veränderten Antikörper in FLPC. Diese Daten zeigen, dass die Veränderung wahrscheinlich nicht zu einem Zusammenbruch der intakten Moleküle in vitro führte.

[0057] Um die veränderten MAb's weiter im Hinblick auf ein Testen in vivo zu untersuchen, wurde eine Radiomarkierung von den veränderten MAb's durchgeführt. Die Radiomarkierung wird in Beispiel 3 gezeigt.

BEISPIEL 3

Direkte Behandlung mit Radiojod von verändertem Lym-1

[0058] Eine Charge von PDP verändertem Lym-1 und von intaktem Lym-1 wurden mit ^{125}I jodiert, und eine andere Charge wurde mit ^{131}I markiert unter Verwendung der veränderten Chloramin T Methode nach Mills, S. L. et al., ^{125}I Radiolabelling of Monoclonal antibodies for In Vivo Procedures, Hybridoma 5: 265–275 (1986), wovon die Offenbarung durch diese Bezugnahme mit hierin eingebunden wird. Kurzum, zu einem 5 ml Reagensglas, welches 100 µg monoklonale Antikörper in 100 µl PBS enthielt, wurde das geeignete Jodisotop hinzugefügt, ^{125}I oder ^{131}I , abhängig von der Charge, und 10 µl einer 43 mM wässrigen Lösung von Chloramin T. Das Reaktionsprodukt wurde nach 3 Minuten mit 20 µl einer 120 mM Lösung von Natriummetabisulfit abgeschreckt. Die radiomarkierten Antikörper unter Verwendung einer Sephadex G-25 Säule wurden gereinigt. Diese Säule bestand aus einer serologischen Plastikpipette (8 mm \times 200 mm), welche am Ende mit Baumwolle zugestopft wurde (V_o = 4,5 ml, V_t = 12 ml). Jedes Reaktionsgemisch wurde auf eine Säule geladen und mit PBS, pH 7,2, eluiert. Individuelle Reagensgläser, welche 1 ml Aliquotteile enthielten, wurden gezählt und die radiomarkierten Antikörper wurden in dem Reagensglas 6 mit einer Ausbeute von 85–90% wiedergewonnen. Diese radiomarkierten Antikörper wurden in dem Kühlschrank gelagert und sie wurden innerhalb von vier Stunden ab der Markierung den Mäusen verabreicht.

[0059] Die radiomarkierten MAb's aus Beispiel 3 wurden einer augenblicklichen Dünnschichtchromatographie (Instant Thin Layer Chromatography = ITLC) unterworfen, um die Reinheit der markierten MAb's zu bestimmen. Die Analyse wird in Beispiel 4 gezeigt.

BEISPIEL 4

Analyse von radioaktiv markiertem Lym-1 durch Augenblickliche Dünnschichtchromatographie (Instant Thin Layer Chromatography \equiv ITLC)

[0060] Verändertes Lym-1, mit ^{131}I radioaktiv markiert, und verändertes Lym-1, mit ^{125}I radioaktiv markiert, mit Hilfe des Chloramin T Verfahrens aus Beispiel 3, wurden analysiert unter Verwendung eines analytischen ITLC Systems, welches aus einer mit einem Gel aus Siliziumdioxid imprägnierten Glasfaser bestand. Streifen (2×20 cm) wurden vor dem Gebrauch aktiviert durch ein Erhitzen während 15 Minuten auf $110-1/2^\circ\text{C}$; mit 1 μl der Probe betupft; luftgetrocknet und mit $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80 : 20) über annähernd 12 cm eluiert; wieder luftgetrocknet, in Hälften geschnitten und gezählt, um die proteingebundene und die nicht proteingebundene Radioaktivität zu bestimmen. Beide Formen der radioaktiv markierten Lym-1 Antikörper hatten einen R_f Wert von 0 und sie zeigten eine radiochemische Reinheit von $\geq 99\%$. Eine Analyse von intaktem Lym-1, das auf die gleiche Art und Weise markiert wurde wie in Beispiel 3, ergab die gleiche Reinheit.

[0061] Somit zeigt Beispiel 4, dass radioaktiv markierte Antikörper von hoher Reinheit gewonnen werden konnten. Die Immunreaktivitäten dieser radioaktiv markierten MAb's wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet, Rajizellen zu binden. Diese Analyse wird in Beispiel 5 gezeigt.

BEISPIEL 5

Analyse der radioaktiv markierten Lym-1 durch eine Bewertung der Immunreaktivität

[0062] Die in vitro Immunreaktivitäten der radioaktiv veränderten Lym-1 und der intakten Lym-1 wurden durch eine herkömmliche, lebende Probe von 10^6 Rajizellen/Reagensglas bewertet nach der Methode von Epstein, A. L. et al., supra. Kurz gesagt, Rajizellen, welche wieder in 100 μl eines 1% Rinderserumalbumins in PBS suspendiert worden waren, wurden in einen dreifachen Satz von Reagensgläsern pipettiert. Einhundert μl des markierten Lym-1 wurden jeweils zu jedem Reagensglas (100, 100 cpm/Reagensglas) hinzugefügt und während 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei währenddessen unter Verwendung eines Orbitalrüttlers kontinuierlich gemischt wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 1% Rinderserum in PBS gewaschen, indem die Reagensgläser bei 1000 rpm (rotations per minute = Umdrehungen pro Minute) während 5 Minuten geschleudert wurden, das oben Schwimmende dekantiert wurde und indem die Zellen erneut in 200 μl PBS suspendiert wurden. Im Anschluss an die Vollendung des Waschens wurde das gebundene Lym-1 nachgewiesen, indem die an die Zellen gebundene Radioaktivität unter Verwendung eines Gammazählers gemessen wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bindungsaktivität des veränderten Lym-1 87% betrug, wohingegen das intakte Lym-1, welches als ein Kontrollstandard diente, eine Bindungsaktivität von 80% aufwies.

[0063] Somit zeigt das Beispiel 5, dass das veränderte Lym-1 immunreaktiver in vitro war als das nicht veränderte Lym-1. Um eine vorläufige Bewertung der Stabilität der Aktivität der veränderten Antikörper in vivo zu gewinnen, wurden veränderte MAb's auf ihre Stabilität im Serum analysiert, wie in Beispiel 6 gezeigt wird.

BEISPIEL 6

Analyse des radioaktiv markierten Lym-1 durch Serumstabilität

[0064] Monoklonale Antikörper des veränderten Lym-1 und des intakten Lym-1, welches direkt mit ^{125}I markiert wurde, wurden zu einem jeden von mehreren dreifachen Sätzen eines frischen Mäuseserums bis zu einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinzugefügt. Die Reagensgläser wurden bei $37-1/2^\circ\text{C}$ inkubiert in einem befeuchteten Inkubator, der bei 5% CO_2 in der Luft gehalten wurde. In Zeitabständen zwischen 0 und 8 Tagen wurde die proteingebundene Aktivität bestimmt durch Hinzufügen von 900 μl einer 100% Trichloressigsäure (TCA = Trichloroacetic acid) zu 100 μl aliquoten Teilen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden Niederschläge von Protein durch Zentrifugieren sedimentiert, und 500 μl des oben Schwimmenden wurden aus jedem Reagensglas entnommen und die Radioaktivität wurde in einem Gammazähler gezählt. Die Daten wurden ausgedrückt als der mittlere Prozentsatz der Zählungen des Niederschlags minus derjenigen der Kontrollreagensgläser. Die Ergebnisse zeigten, dass zu jedem Zeitpunkt nach der Inkubation das veränderte ^{125}I -Lym-1 stabil war, wie das mit ^{125}I markierte, intakte Lym-1, welches als ein Kontrollstandard diente. Die Ergebnisse zeigten ferner, dass $\geq 92\%$ der Aktivität, welche im Anschluss an eine 8-Tage Inkubation bei $37-1/2^\circ\text{C}$ in dem veränderten Lym-1 vorhandenen war, aus abscheidbarer TCA bestand.

[0065] Somit zeigte das Beispiel 6, dass die Stabilität der Aktivität der veränderten Antikörper in dem Serum während einer Dauer von mindestens 8 Tagen aufrechterhalten wurde. Um zu bewerten, ob die veränderten MAb's nach der Inkubation in dem Serum intakt blieben, wurde eine HPLC Analyse des veränderten Lym-1 nach der Inkubation durchgeführt, wie in Beispiel 7 gezeigt wird.

BEISPIEL 7

Analyse des veränderten Lym-1 durch HPLC

[0066] HPLC Analysen wurden in einem Wassersystem durchgeführt, welches ausgestattet war mit Säulen zum Größenausschluss (SW 300) mit 0,1 M neutralem Phosphatpuffer als dem herauslösenden Lösungsmittel und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. Das Eluat wurde mit einem Radioisotopendetektor nachgewiesen. Die markierte, veränderte Lym-1 Produktmischung aus Beispiel 6 ergab einen hauptsächlichen Scheitelwert einer Probe mit einem niedrigen Molekulargewicht mit einer Eluierungszeit von 750 Sekunden plus einer geringen Menge bei 690 Sekunden. Das intakte Lym-1 ergab einen einzelnen Scheitelwert mit einer Retentionszeit von 690 Sekunden.

[0067] Somit zeigt das Beispiel 7, dass die im Serum inkubierten veränderten Lym-1 Proben offensichtlich ein Molekulargewicht in der HPLC Analyse hatten, welches niedriger war als das des intakten Lym-1. Im Gegensatz dazu zeigte das Beispiel 2, dass ein nicht inkubiertes, verändertes Lym-1 eine mit dem intakten Lym-1 identische Verweilzeit hatte. Somit zeigte das veränderte Lym-1 einen offensichtlichen Verlust an Molekulargewicht in der FPLC Analyse bei der Inkubation im Serum.

[0068] Um den offensichtlichen Verlust an Molekulargewicht des veränderten Lym-1 bei der Inkubation im Serum weiter zu verifizieren, wurde eine Elektrophorese mit Polyacrylamidgel der Proben durchgeführt, wie in Beispiel 8 gezeigt wird.

BEISPIEL 8

Analyse von radioaktiv markiertem Lym-1 durch Elektrophorese mit Polyacrylamidgel SDS (= Polyacrylamid Gel Electrophoresis) (SDS-PAGE)

[0069] Dieselben Aliquotteile einer jeden inkubierten Serum Mischung aus Beispiel 6 wurden der Reihe nach geprüft durch eine nicht reduzierte SDS-PAGE. Für diese Untersuchung wurden Proben auf 10% Acrylamidgelen durchgeführt, sorgfältig getrocknet und in der gewöhnlichen Weise einem photographischen Film ausgesetzt, wie bei Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature 227: 680 : 685 (1970), wovon die Offenbarung durch diese Bezugnahme mit hierin eingebunden wird. Diese Analyse deckte auf, dass das intakte ^{125}I -Lym-1 offensichtlich war bei Mr 200.000, wohingegen das veränderte ^{125}I -Lym-1 bei einem unterschiedlichen Band beobachtet wurde, welches einem kleineren Molekulargewicht bei annähernd Mr 116.000 entsprach. Somit zeigt das vorliegende Beispiel, dass die Inkubation der veränderten Antikörper im Serum zu einem veränderten, offensichtlichen Molekulargewicht auf Acrylamidgelen führt, was die Ergebnisse der HPLC Analyse verifiziert.

BEISPIEL 9

Test für die Dejodierung von markiertem Lym-1 im Serum

[0070] Dieselben Proben aus dem Beispiel 6 wurden auch über eine 8-Tage Untersuchung geprüft, um zu sehen, ob es irgendeinen Verlust an Radioaktivität aus dem radioaktiv markierten Lym-1 gegeben hatte; solch ein Verlust kann als ein Beweis für eine Dejodierung im Serum interpretiert werden. Die Daten zeigten praktisch keinen Verlust an Radioaktivität über diese Periode, was bestätigt, dass eine sehr stabile Bindung von Jod in diesen Immunkonjugaten gewonnen worden ist.

[0071] Somit zeigen die Beispiele 7–9, dass die veränderten Antikörper, während sie praktisch volle Aktivität nach der Inkubation im Serum behielten, in Moleküle eines offensichtlichen Molekulargewichtes von 116.000 zusammenzubrechen schienen. Wie oben bemerkt, ist es möglich, dass dieser Verlust an Molekulargewicht zurückzuführen ist auf den Zusammenbruch der Antikörper in ihre monovalente Form. Auf jeden Fall glaubt man, dass der Verlust an offensichtlichem Molekulargewicht zurückzuführen ist auf den Zusammenbruch der veränderten Antikörper in Fragmente derselben.

[0072] Nach der Entdeckung der vorstehenden, unerwarteten Veränderung in dem offensichtlichen Molekulargewicht der veränderten Antikörper, wenn sie im Serum inkubiert wurden, testeten wir die Stabilität der veränderten MAb's in vivo. Wir führten diese in vivo Tests durch, um die Clearancezeit des gesamten Körpers zu bestimmen. Ein Beispiel dieser Tests wird in Beispiel 10 gezeigt.

BEISPIEL 10

Gesamtkörper Clearance

[0073] Experimente wurden durchgeführt, bei denen drei Gruppen von athymischen, nackten Mäusen ($n = 5$) intraperitoneale Einspritzungen gegeben wurden, mit (a) einem intakten Antikörper, mit (b) Fragmenten von $F(ab')_2$ oder mit (c) einem veränderten Antikörper von Lym-1, mit I-131 markiert unter Verwendung der Chloramin T Methode. Die Gesamtkörperaktivität bei der Einspritzung und hinterher im Anschluss daran wurde mit einem Dosimeter gemessen. Diese Untersuchung demonstriert, dass die Gesamtkörper Clearance der Radioaktivität mit der Herstellung des Antikörpers variiert. Ergebnisse werden in **Fig. 2** gezeigt.

[0074] Die **Fig. 2** zeigt, dass das veränderte Lym-1 schneller aus dem gesamten Körper verschwand, mit einer biologischen Lebenshalbwertszeit ($t_{1/2}$) von 20 Stunden, als das intakte Lym-1 ($t_{1/2} = 5$ Tage). Die Clearance von $F(ab')_2$ Fragmenten war jedoch zweimal schneller, mit einer biologischen Lebenshalbwertszeit von 10 Stunden, als das veränderte Lym-1. Die Daten zeigten, dass das veränderte Lym-1 mit einer Geschwindigkeit entfernt wird, welche in der Mitte zwischen den schnell entfernten $F(ab')_2$ Fragmenten und dem langsam entfernten intakten Antikörper liegt.

[0075] Somit kann aus den Daten des Beispiels 10 gesehen werden, dass die veränderten Antikörper schneller aus dem Körper verschwinden als die relativ stark ausdauernden intakten Antikörper, aber noch nicht so schnell wie die $F(ab')_2$ Fragmente.

[0076] Ein idealer Wirkstoff für die Immuntherapie würde in dem Blutstrom während einer Zeitdauer ausharren, die genügend lang ist, um die gewünschte toxische Wirkung zu erzeugen, aber nicht so lang, dass unbeabsichtigte toxische Nebeneffekte verursacht werden würden. Die Daten aus Beispiel 10 ließen die Vermutung aufkeimen, dass die veränderten Antikörper potentiell ideale Persistenzzeiten (Fortbestehungszeiten) zeigen würden, wenn man sie in der Immuntherapie anwenden würde.

[0077] Wie oben erörtert, würde ein Wirkstoff für die Immuntherapie auch hochspezifisch in Richtung auf seine Zielzellen sein. Daher testeten wir in den folgenden Beispielen die Spezifität der veränderten MAb's relativ zu beiden Wirkstoffen, nämlich einmal zu den intakten MAb's und zum anderen zu den $F(ab')_2$ Fragmenten. Das Beispiel 11 zeigt die Methoden, welche in allen nachfolgenden Untersuchungen der Biodistribution angewandt worden sind.

BEISPIEL 11

Untersuchungen der Biodistribution

[0078] Rajizellen (10^7) wurden subkutan in die Oberschenkelregion zweier Gruppen von sechs Wochen alten, nackten Mäusen injiziert. Die Tumore wuchsen während drei Wochen, bis sie größer als 1 cm im Durchmesser wurden. Studien mit einer paarweisen Markierung, wie unten beschrieben, wurden durchgeführt wobei eine jede Gruppe von Mäusen zum Einsatz kam. In der ersten Gruppe ($n = 6$) wurde jede Maus i. p. injiziert mit einem 0,2 ml Inoculum, welches 10 μ g eines veränderten Lym-1 enthielt, markiert mit I-131, bei 12 μ Ci/ μ g (120 μ Ci/Maus), und 10 μ g eines intakten Lym-1, markiert mit I-125, bei 2,5 μ Ci/ μ g (25 μ Ci/Maus). In der zweiten Gruppe ($n = 4$) erhielten die Mäuse ein 0,2 ml Inoculum, welches 10 μ g eines veränderten Lym-1 enthielt, markiert mit I-131, bei 12 μ Ci/ μ g (120 μ Ci/Maus), und 10 μ g von $F(ab')_2$ Fragmenten, markiert mit I-125, bei 2,5 μ Ci/ μ g (25 μ Ci/Maus). Bei allen Experimenten wurden die Mäuse durch eine zervikale Dislokation geopfert zu vorher festgelegten Zeiten nach der Injektion, und dann wurden verschiedene Organe, das Blut und der Tumor entfernt und auf einer analytischen Waage gewogen. Die Proben wurden dann in einem Gammazähler gezählt, um die ^{131}I und die ^{125}I Aktivität zu bestimmen. Die ^{125}I Zählungen wurden für ein Umstellen von dem ^{131}I Kanal angepasst, indem man 17% von den ^{131}I Kanalzählungen subtrahierte, eine Formel, welche experimentell unter Verwendung eines 1282 Compugamma Gammazählers (LKB) bestimmt wurde. Die Daten wurden auch um den radioaktiven Strahlungszersfall des ^{131}I Isotops berichtigt, entsprechend den Tagen an welchen die Tiere geopfert wurden. Für jede Maus wurden die Daten als cpm pro Gramm Tumor, cpm pro Gramm Organ, % Dosis/Gramm und Dosis/Organ ausgedrückt. Aus diesen Daten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung für eine jede Gruppe berechnet.

[0079] Das Beispiel 12 vergleicht die Biodistribution der veränderten MAb's mit den intakten MAb's unter Verwendung der Methoden des Beispiels 11.

BEISPIEL 12

Untersuchung der Bioverteilung von Verändertem Lim-1 versus intaktem Lym-1

[0080] Für diese Untersuchung wurde der intakte Lym-1 Antikörper mit dem veränderten Lym-1 Antikörper

nach den Methoden des Beispiels 11 verglichen. Intaktes Lym-1 produzierte eine Blutaktivität von 0,64% ID/g in 7 Tagen nach der Injektion, wie in Tabelle I berichtet. Am Ende desselben Zeitintervalls hatte der Tumor eine Aktivität von 3,92% ID/g.

[0081] Wie in Tabelle I berichtet, entfernte sich das veränderte Lym-1 im Vergleich zu dem intakten Lym-1 schneller aus dem Blut und es erzeugte eine Blutaktivität von 0,14% ID/g in 7 Tagen. Am Ende desselben Zeitintervalls erzeugte der Tumor 7,7%, was dazu neigte bedeutend höher zu sein als die entsprechenden Aktivitäten des intakten Lym-1.

[0082] Über die Ergebnisse der Antikörperreaktivität aus Beispiel 12 in mehreren Organen wird in der Tabelle I berichtet und sie werden grafisch in der **Fig. 3** (% Dosis/ Gramm) und in der **Fig. 4** (Tumor/Gramm) dargestellt.

TABELLE I

BIOVERTEILUNG EINES VERÄNDERTEN UND INTAKTEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS LYM-1 IN
RAJI TUMORE TRAGENDEN NACKTEN MÄUSEN (N = 6)
7 TAGE NACH DER INJEKTION

Verändertes Lym-1			
Organ	cpm/g Tumor cpm/g Organ	% Dosis / g	% Dosis / Organ
Blut	140,07 (81,30) *	0,14 (0,20)	...
Haut	93,98 (43,40)	0,09 (0,04)	...
Muskel	364,53 (232,97)	0,03 (0,03)	...
Knochen	126,96 (55,86)	0,06 (0,02)	...
Herz	137,34 (67,96)	0,07 (0,04)	0,01 (0,00)
Lunge	28,31 (10,34)	0,28 (0,10)	0,06 (0,02)
Leber	96,80 (49,03)	0,09 (0,05)	0,15 (0,08)
Milz	12,02 (5,62)	0,79 (0,53)	0,03 (0,01)
Bauchspeicheldrüse	286,43 (159,92)	0,04 (0,02)	0,00 (0,00)
Magen	71,21 (30,72)	0,11 (0,03)	0,02 (0,01)
Darm	133,31 (80,82)	0,07 (0,04)	...
Niere	17,63 (7,63)	0,45 (0,12)	0,14 (0,03)
Tumor		7,70 (3,95)	2,98 (1,71)
Intaktes Lym-1 (Kontrolle)			
Blut	30,72 (17,74)	0,64 (1,26)	...
Haut	8,83 (3,05)	0,41 (0,20)	...
Muskel	44,39 (26,16)	0,15 (0,21)	...
Knochen	19,49 (6,08)	0,21 (0,18)	...
Herz	28,79 (13,76)	0,19 (0,22)	0,02 (0,02)
Lunge	16,98 (8,22)	0,36 (0,46)	0,07 (0,01)
Leber	11,84 (5,95)	0,37 (0,25)	0,59 (0,46)
Milz	3,93 (3,74)	1,52 (1,14)	0,06 (0,03)
Bauchspeicheldrüse	29,35 (12,88)	0,16 (0,17)	0,02 (0,02)

Magen	11,00 (4,55)	0,32 (0,11)	0,07 (0,03)
Darm	18,06 (8,79)	0,23 (0,13)	...
Niere	22,44 (10,61)	0,20 (0,17)	0,06 (0,05)
Tumor	...	3,92 (3,11)	1,02 (0,27)

Mittelwert (Standardabweichung)

[0083] Es kann aus **Fig. 3** gesehen werden, dass die veränderten Antikörper ein höheres Signal in dem Tumor erzeugten als die intakten Antikörper. Zusätzlich reagierten die veränderten Antikörper weniger streng als die intakten MAb's für jedes getestete Organ, außer für die Niere. Es ist nicht unerwartet, dass ein höheres Signal in der Niere gefunden werden würde, weil man erwartet, dass die Antikörper durch dieses Organ entfernt werden. Auf Grund der schnelleren Entfernungsgeschwindigkeit (Clearancerate) der veränderten MAb's relativ zu den intakten MAb's, wie in Beispiel 10 herausgefunden, würde eine höhere Menge veränderter MAb's in der Niere erwartet werden.

[0084] Unter Bezugnahme auf die **Fig. 4**, welche dieselben Daten wie die **Fig. 3** in einer verschiedenen Form zeigt, kann gesehen werden, dass die veränderten MAb's ein deutlich höheres Verhältnis Tumor/Organ als die intakten MAb's in jedem getesteten Organ erzeugten, außer für die Niere. Man würde daher erwarten, dass die veränderten Antikörper einen deutlich niedrigeren Hintergrund erzeugen würden, wenn sie in der Immunszintigraphie eingesetzt werden. Darüber hinaus würde man auch erwarten, dass die veränderten Antikörper wirksamer wären, wenn man sie in den Immuntherapien einsetzen würde, und zwar auf Grund ihrer beiden Eigenschaften, einmal auf Grund ihrer höheren Affinität für den Tumor und zum anderen wegen ihrer geringeren Affinität für Nicht-Zielgewebe. Wenn man sie in den Immuntherapien einsetzen würde, dann würden die veränderten Antikörper daher vermutlich mehr hochtoxisch gegenüber den Tumoren und weniger toxisch gegenüber den Nicht-Zielgeweben sein. Der immuntherapeutische Nutzen der veränderten Antikörper der vorliegenden Erfindung wird hierin nachher in weiteren Einzelheiten erklärt.

[0085] Als Nächstes verglichen wir die Bioverteilung der veränderten MAb's mit derjenigen der $F(ab')_2$ Fragmente des anderweitig unveränderten Antikörpers. Das Beispiel 13 ist eine typische Darstellung dieser Experimente.

BEISPIEL 13

Untersuchung der Bioverteilung von Verändertem Lym-1 versus $F(ab')_2$ Fragmenten von Lym-1

[0086] Für diese Studie wurden die $F(ab')_2$ Fragmente mit den veränderten Lym-1 MAb's verglichen. Die Experimente wurden wie bei dem Beispiel 11 durchgeführt. Über die Ergebnisse wird in Tabelle II berichtet und sie werden grafisch in den **Fig. 4** und 5 gezeigt.

TABELLE II
BIOVERTEILUNG EINES VERÄNDERTEN UND INTAKTEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS LYM-1 IN
RAJI TUMORE TRAGENDEN NACKTEN MÄUSEN (N = 4)
5 TAGE NACH DER INJEKTION

Verändertes Lym-1			
Organ	<u>cpm/g Tumor</u> cpm/g Organ	% Dosis / g	% Dosis / Organ
Blut	39,59 (14,84) *	0,09 (0,03)	...
Haut	13,69 (3,15)	0,24 (0,06)	...
Muskel	75,32 (16,22)	0,04 (0,01)	...
Knochen	26,79 (7,18)	0,12 (0,04)	...
Herz	44,42 (11,34)	0,08 (0,04)	0,01 (0,01)
Lunge	15,78 (3,88)	0,21 (0,07)	0,04 (0,01)
Leber	12,19 (4,25)	0,29 (0,12)	0,27 (0,10)
Milz	2,68 (1,01)	1,34 (0,55)	0,07 (0,03)
Bauchspeicheldrüse	42,17 (11,23)	0,08 (0,03)	0,01 (0,00)
Magen	14,16 (4,43)	0,24 (0,07)	0,05 (0,02)
Darm	28,36 (9,96)	0,12 (0,05)	...
Niere	12,53 (3,15)	0,27 (0,09)	0,09 (0,03)
Tumor	...	3,18 (0,89)	3,16 (1,09)
F(ab') ₂ Fragmente (Kontrolle)			
Blut	29,72 (13,17)	0,05 (0,02)	...
Haut	10,54 (2,78)	0,12 (0,02)	...
Muskel	55,50 (14,49)	0,02 (0,01)	...
Knochen	23,73 (7,89)	0,06 (0,02)	...
Herz	35,19 (11,01)	0,04 (0,02)	0,00 (0,00)
Lunge	12,57 (3,69)	0,10 (0,03)	0,02 (0,00)
Leber	10,43 (4,20)	0,13 (0,05)	0,12 (0,04)
Milz	2,59 (1,03)	0,54 (0,21)	0,03 (0,01)
Bauchspeicheldrüse	31,55 (9,82)	0,04 (0,02)	0,00 (0,00)
Magen	8,08 (3,31)	0,17 (0,06)	0,03 (0,01)

Darm	22,27 (7,93)	0,06 (0,02)	...
Niere	10,05 (2,71)	0,13 (0,04)	0,04 (0,01)
Tumor	...	1,23 (0,24)	1,42 (0,48)

Mittelwert (Standardabweichung)

[0087] Die Tabelle II zeigt, dass das veränderte Lym-1 sich langsamer aus dem Blut entfernte als die $F(ab')_2$ Fragmente. Das veränderte Lym-1 erzeugte eine Blutaktivität die um 0,09 ID/g höher war als diejenige der Fragmente (0,05%) in 5 Tagen nach der Injektion. **Fig. 5** zeigt, dass die Tumoraktivität des veränderten Lym-1 etwa das Zweieinhalbfache höher war als die entsprechende Aktivität der $F(ab')_2$ Fragmente. Die Aktivität des veränderten Lym-1 war höher als diejenige der $F(ab')_2$ Fragmente für alle der verschiedenen getesteten Organe, einschließlich der Niere. Dies steht im Einklang mit der Theorie, dass schneller entfernte Antikörper sich in der Niere akkumulieren.

[0088] Darüber hinaus zeigt **Fig. 6**, dass die Verhältnisse Tumor zu Organ für verändertes Lym-1 höher sind als diejenigen der $F(ab')_2$ Fragmente für alle unter den getesteten Organen. Daher bestätigen die Experimente der Beispiele 12 und 13, dass die veränderten Antikörper der vorliegenden Erfindung eine höhere Aktivität gegenüber ihrem Zieltumor aufweisen als entweder die intakten MAb's oder die $F(ab')_2$ Fragmente. Zusätzlich zeigen die Daten von Tumor zu Organ dieser Experimente, dass die veränderten Antikörper eine höhere Spezifität für den Tumor aufweisen als entweder die intakten MAb's oder die $F(ab')_2$ Fragmente.

[0089] Daher testeten wir die Fähigkeit der veränderten MAb's der vorliegenden Erfindung, verbesserte Ergebnisse der Immunszintigraphie zu erzeugen. Ein Beispiel dieser Tests wird in Beispiel 14 gezeigt.

BEISPIEL 14

Untersuchungen von Lym-1 mittels bildgebender Verfahren

[0090] Nackte Mäuse, welche einen Tumor tragen, wurden mit einem bildgebenden Verfahren abgebildet unter Verwendung eines Kollimators mit kleinster Öffnung und einer Spektrum 91 Gammakamera (Raytheon). Abbildungsanalysen dieser Tiere lieferten eine Abschätzung der Antikörperverteilung Tumor/ Gesamtkörper nach der Injektion. Sieben Tage nach der Injektion wurden die Mäuse anästhesiert mit 2 mg Ketamin HCL und 0,4 mg Xylazin, verabreicht als eine 0,2 ml s. c. Inoculation. Die immobilisierten Mäuse wurden dann in einer hinteren Position mit einer Kamera abgebildet, wobei die Kamera vorher eingestellt war auf 10.000 Zählsschritte. Eine Subtraktion des Hintergrundes wurde nicht durchgeführt. Die fotografischen Abbildungen wurden erhalten unter Verwendung eines Polaroid Type 330 Pack Filmes. Zwei Gebiete in jeder Abbildung wurden definiert: (a) ein Bereich 1, ganzer Körper; (b) ein Bereich 2, Tumor. Die **Fig. 6–8** zeigen als Beispiele Szintigraphien (auch als Szintigramme bekannt), welche bei diesen Experimenten erzeugt worden sind.

[0091] Ein bildgebendes Verfahren der Immunszintigraphie mit einem intakten Lym-1 wurde 7 Tage nach der Injektion versucht und es war nicht zufrieden stellend, wie man aus der **Fig. 6** ersieht. **Fig. 6** zeigt, dass, obwohl der Tumor sichtbar gemacht wurde, der Rest des Tieres auch sichtbar gemacht wurde. **Fig. 7** und **Fig. 8** zeigen die Abbildungen zweier verschiedener Tiere, welche einen Rajitumor tragen, die mit einem markierten, veränderten Lym-1 injiziert worden sind, zur selben Zeit nach der Injektion. Es kann gesehen werden, dass beide **Fig. 7** und **8** eine Konzentration des markierten, veränderten Lym-1 bei dem Tumor bei Niveaus aufweisen, welche viel höher liegen als diejenigen bei dem Tumor, der von dem intakten Lym-1 erzeugt worden ist, wie man dies in **Fig. 6** sieht. Noch bedeutsamer ist, dass das Verhältnis der Markierung am Tumor zu dem von dem veränderten Lym-1 erzeugten Hintergrund der gesamten Maus um das Mehrfache größer war als dasjenige des intakten Lym-1. Daher zeigen die **Fig. 7** und **8** eine klare Definition des Tumors mit wenig oder gar keiner Hintergrundradioaktivität.

[0092] Darüber hinaus konnte eine zufrieden stellende Visualisierung des Tumors in 5 Tagen nach der Injektion erzielt werden, wenn man das veränderte Lym-1 verwendete. **Fig. 10** zeigt eine Abbildung nach 5 Tagen, welche von demselben Tier aufgenommen worden ist wie diejenige, welche in **Fig. 9** nach 7 Tagen gezeigt wird. Wie gesehen werden kann, war die 5-Tage Abbildung der **Fig. 10** deutlich derjenigen Abbildung überlegen, welche von einem intakten Lym-1 nach 7 Tagen erzeugt worden ist (**Fig. 7**). Die Ergebnisse waren für alle getesteten Tiere ähnlich.

[0093] Die Studie schlägt vor, dass der Einsatz von veränderten Antikörperfragmenten eine größere spezifische Aktivität gegenüber Tumorantigenen zeigt, dieses erlaubt es einer größeren absoluten Konzentration eines Antikörpers, sich in dem Tumor zu akkumulieren. Dies wird durch unsere Ergebnisse bestätigt, welche zeigten, dass die absolute Konzentration von veränderten Lym-1 Fragmenten etwa das Zweifache der intakten Lym-1 Konzentration 7 Tage nach der Injektion beträgt und etwa das Zweieinhalbfache derjenigen der $F(ab')_2$ Fragmente nach 5 Tagen.

[0094] Die viel schnellere Clearance der veränderten Lym-1 Fragmente vermindert auch deutlich die Zeit, welche erforderlich ist, um hohe Verhältnisse Tumor zu Hintergrund zu erreichen, und dies führt daher zu einer besseren Abbildung in kürzerer Zeit als bei einem intakten Antikörper.

[0095] Um die allgemeine Nützlichkeit der Veränderung der vorliegenden Erfindung hinsichtlich der Verbesserung der Spezifität und der Aktivität von Antikörpern zu demonstrieren, veränderten wir zusätzliche MAb's. Tests dieser verschiedenen veränderten MAb's werden in den Beispielen 15–18 gezeigt.

BEISPIEL 15

Clearancegeschwindigkeit eines Monoklonalen Antikörpers B72.3

[0096] B72.3 (IgG₁), der_monoklonale Antikörper gegen das Dickdarmkarzinom, wurde erzielt wie bei Colcher, D. et al, A Spectrum of Monoclonal antibodies Reactive with Human Mammary Tumor Cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3199–3203 (1981), wovon die Offenbarung durch diese Bezugnahme mit hierin eingebunden wird. B72.3 MRb's wurden funktionalisiert mit im Durchschnitt einer PDP Gruppe pro Molekül, dies entsprechend der Methode nach Beispiel 1.

[0097] Die veränderten B72.3 MAb's wurden nach der Methode des Beispiels 3 radioaktiv markiert. Die auf den gesamten Körper bezogenen Clearance-Zeiten wurde wie in Beispiel 10 gemessen. **Fig. 11** zeigt die Ergebnisse dieser Gesamtkörper Clearance Experimente. Die veränderten Antikörper zeigten eine Abnahme der auf den gesamten Körper bezogenen Clearance-Halbwertszeit von den annähernd 6 Tagen der intakten MAb's auf annähernd 2,5 Tage für die veränderten Antikörper. Die Clearance-Halbwertszeit der F(ab')₂ Fragmente war, wie für die Lym-1 Fragmente, schneller als für die veränderten Antikörper, mit einer Halbwertszeit von annähernd 12 Stunden. Somit zeigten die Ergebnisse, dass das veränderte B72.3 sich ähnlich wie das veränderte Lym-1 verhielt im Hinblick darauf, dass es eine Clearance-Halbwertszeit in der Mitte zwischen derjenigen der F(ab')₂ Fragmente und derjenigen eines intakten Antikörpers aufwies.

BEISPIEL 16

Bioverteilung von B72.3

[0098] Studien einer Bioverteilung mit einer paarweisen Markierung für zwei Gruppen von jeweils fünf Mäusen wurden mit athymischen nackten Mäusen durchgeführt, welche das menschliche Dickdarmkarzinom LS174T trugen. Die eine Gruppe wurde mit dem intakten, durch das I-125 markierte B72.3 injiziert, während die andere Gruppe mit dem veränderten, durch das I-131 markierte B72.3 injiziert wurde. Das Experiment verglich auch die Bioverteilung in dem Tumor, in dem Blut und in verschiedenen anderen Organen. Die angewandten Methoden waren so wie in den Beispielen 11–13. Über die Daten wird in Tabelle III berichtet und sie werden grafisch in den **Fig. 11** und **12** gezeigt.

TABELLE III

BIOVERTEILUNG DES VERÄNDERTEN UND INTAKTEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS B72.3 IN NACKTEN MÄUSEN(N = 5), DIE DAS MENSCHLICHE DICKDARMKARZINOM LS174T TRAGEN, 4 TAGE NACH DER INJEKTION

Verändertes B72.3			
Organ	<u>cpm/g Tumor</u> cpm/g Organ	% Dosis / g	% Dosis / Organ
Blut	6,16 (2,32) *	1,10 (0,45)	...
Haut	20,81 (3,92)	0,31 (0,12)	...
Muskel	61,58 (16,16)	0,11 (0,05)	...
Knochen	65,25 (15,04)	0,10 (0,04)	...
Herz	31,41 (18,44)	0,24 (0,11)	0,03 (0,02)
Lunge	11,89 (3,25)	0,54 (0,18)	0,14 (0,04)
Leber	21,61 (10,36)	0,33 (0,14)	0,43 (0,17)
Milz	37,89 (15,00)	0,18 (0,09)	0,02 (0,01)
Bauchspeicheldrüse	60,23 (23,73)	0,12 (0,06)	0,02 (0,01)
Magen	37,74 (9,20)	0,17 (0,05)	0,04 (0,01)
Darm	68,31 (28,27)	0,10 (0,04)	...
Niere	24,56 (10,07)	0,29 (0,13)	0,09 (0,04)
Tumor	...	6,02 (1,33)	6,45 (1,53)
Intaktes B72.3 (Kontrolle)			
Blut	3,43 (1,13)	1,34 (0,60)	...
Haut	10,44 (1,80)	0,41 (0,15)	...
Muskel	31,78 (8,86)	0,14 (0,05)	...
Knochen	33,36 (9,84)	0,14 (0,06)	...
Herz	16,57 (8,28)	0,30 (0,14)	0,04 (0,02)
Lunge	6,42 (1,59)	0,68 (0,28)	0,18 (0,08)
Leber	11,85 (4,78)	0,39 (0,16)	0,52 (0,24)
Milz	18,94 (5,61)	0,24 (0,12)	0,02 (0,01)
Bauchspeicheldrüse	29,80 (9,42)	0,15 (0,05)	0,02 (0,01)
Magen	18,88 (3,83)	0,22 (0,04)	0,05 (0,01)
Darm	35,61 (13,48)	0,13 (0,06)	...

Niere	15,20 (6,40)	0,33 (0,18)	0,11 (0,06)
Tumor	...	4,04 (0,84)	4,28 (0,78)

Mittelwert (Standardabweichung)

[0099] Wie aus der Tabelle III gesehen werden kann, erzeugte ein intakter B72.3 Antikörper eine Blutaktivität von 1,34 ID/g in 4 Tagen nach der Injektion und eine Aktivität von 4,04% bei dem Tumor, wie dies in der Tabelle III gezeigt wird. Verglichen mit dem intakten B72.3 erzeugte der veränderte B72.3 eine geringere Blutaktivität (1,1% ID/g) und eine höhere Tumorktivität (6,02% ID/g) in 4 Tagen.

[0100] Wie aus **Fig. 13** gesehen werden kann, waren all die verschiedenen Organaktivitäten höher für das veränderte B72.3, außer für die Niere, wie es für einen schneller entfernten Antikörper erwartet worden ist. Daher war, wie in **Fig. 14** gezeigt wird, das Verhältnis Tumor zu Organ für das veränderte B72.3 deutlich höher als die entsprechenden Verhältnisse für das intakte B72.3. Das Verhältnis Tumor zu Organ wurde sogar für die Niere verbessert auf Grund der höheren Aktivität des veränderten Antikörpers an der Tumorstelle.

BEISPIEL 17

Abbildung von B72.3 in Mäusen, die einen Tumor tragen

[0101] Eine bildgebende Analyse von Mäusen, welche den LS174T Tumor trugen und welche mit dem veränderten B72.3 injiziert worden waren, lieferte eine Abschätzung für die Verteilung Tumor/gesamter Körper nach der Injektion. **Fig. 14** zeigt eine Immunszintigraphieaufnahme einen Tag nach der Injektion. Die Abbildung zeigt eine klare Definition des Tumors mit einer geringen Hintergrundradioaktivität. **Fig. 15** zeigt eine Immunszintigraphieaufnahme 4 Tage nach der Injektion. Nach 4 Tagen wurde der Tumor deutlich gesehen, wobei wenig Radioaktivität in dem Blutpool des Tieres übrig blieb. Die Ergebnisse waren für alle Tiere ähnlich.

[0102] Somit wurde herausgefunden, dass das veränderte B72.3 sehr nützlich war bei der Erzielung qualitativ hochwertiger Immunszintigraphieaufnahmen innerhalb einer kurzen Zeit nach einer Injektion der mit B72.3 reaktionsfähigen Tumore.

[0103] TNT-1 ist ein IgG_{2a} monoklonaler Antikörper, welcher einen nekrotischen Tumor als ein Ziel für seine selektive Bindung an menschliche Krebstumoren verwendet. Wir veränderten diesen Antikörper mit im Durchschnitt einer PDP Gruppe pro Molekül, wie in Beispiel 1, und analysierten die Verweilzeit im gesamten Körper, wie in Beispiel 18 gezeigt.

BEISPIEL 18

Verwendung des monoklonalen Antikörpers TNT-1

[0104] Wir gewannen TNT-1 wie bei Epstein, A. L. et al., A Novel Method for the Detection of Necrotic Lesions in Human Cancer, Cancer Res. 48: 5842-5848 (1988), wovon die Offenbarung durch diese Bezugnahme mit hierin eingebunden wird.

[0105] Die TNT-1 MAb's wurden nach der Methode des Beispiels 3 radioaktiv markiert. Die Gesamtkörper Clearance-Zeiten wurden wie in Beispiel 10 gemessen. **Fig. 16** zeigt die Ergebnisse dieser Gesamtkörper Clearance-Experimente. Die veränderten TNT-1 MAb's zeigten eine Abnahme der Halbwertszeit der Gesamtkörper Clearance-Zeit relativ zu dem intakten TNT-1 und eine Zunahme relativ zu den F(ab')₂ Fragmenten von TNT-1.

[0106] Somit verhielten sich die veränderten TNT-1 ähnlich wie die anderen veränderten Antikörper. Wir erwarten daher, dass die Nützlichkeit der veränderten TNT-1 MRb's gleichwertig ist zu derjenigen der anderen getesteten, veränderten Antikörpern.

BEISPIEL 19

Herstellung von biotinilierten Antikörpern

[0107] Die TNT-1 und die Lym-1 MAb's wurden getrennt mit 6-(Biotinamido)hexanoat konjugiert durch eine Reaktion mit dessen Sulfo-N-hydroxysuccinimidester (NHS-LC-Biotin). In typischer Weise wurde eine Standardlösung von 2 mg NHS-LC-Biotin in 1 ml einer 0,9% Salzlösung hergestellt. In ein 5 ml Reagensglas, welches 1 ml eines Antikörpers (10 mg/ml) in einem Natriumbicarbonatpuffer mit einem pH-Wert von 8,5 enthielt, wurde 1 ml einer NHS-LC-Biotin Standardlösung (molares Verhältnis 50 : 1 NHS-LC-Biotin/Mab) hinzugefügt.

[0108] Die Reagenzmischung wurde während 2,5 Stunden bei Raumtemperatur unter einem kontinuierlichen Umrühren bei geringer Geschwindigkeit inkubiert. Nach der Inkubation wurde der gekoppelte Antikörper chro-

matographisch auf einer PD-10 Säule (Pharmacia) untersucht, welche mit PBS im Gleichgewicht gehalten wurde bei einem pH-Wert von 7,2. Die Reinheit der Herstellungen des gekoppelten Antikörpers wurden mittels der FPLC bewertet unter Verwendung einer Superose-12 Säule. Die Ergebnisse dieser Verfahren lieferten einen Hinweis darauf, dass der biotinierte Antikörper mit einem Reinheitsgrad von mindestens 99% gewonnen wurde.

[0109] Die durchschnittliche Anzahl der Biotingruppen, welche an jedes Antikörpermolekül gekoppelt waren, wurde spektrophotometrisch gemäß der von Green in Biochem J. 94: 23c–24c (1965) beschriebenen Methode bestimmt. Kurz gesagt, der biotinierte Antikörper wurde enzymatisch mit 1 Protease bei 37°C während vier Stunden zersetzt. Zu einer 5 ml Lösung, welche 800 µl von 100 mM HABA in 0,1 M PBS mit pH-Wert 7,2 enthielt, wurden 70 µl einer 17 µM Lösung von Streptavidin hinzugefügt. Die Streptavidin HABA Lösung wurde dann titriert mit wachsenden Volumina der zersetzten biotinierten Antikörperlösung und der Wechsel in der Absorption wurde bei 500 nm bestimmt. Aus dieser Behandlung wurde die Konzentration an Biotin in der mit Protease behandelten Antikörperlösung berechnet unter Verwendung einer Standardkurve einer Biotinlösung. Die Ergebnisse lieferten einen Hinweis darauf, dass im Durchschnitt 3 bis 4 Biotinanteile in jedes Antikörpermolekül mit eingebunden wurden.

[0110] Die Biotin-Antikörper Konjugate wurden mit ^{125}I radioaktiv markiert unter Verwendung der Chloramin-T Methode, im Wesentlichen wie dies in dem Beispiel 3 beschrieben worden ist.

[0111] Das Beispiel 20 beschreibt die Verfahren, welche für die Radioiodierung von Antikörpern und von Antikörperfragmenten verwendet werden.

BEISPIEL 20

Direkte Radiojodierung von Antikörpern

[0112] Alle Antikörper (intakt, verändert und F(ab')_2 Fragmente) wurden mit ^{125}I oder mit ^{131}I unter Verwendung einer veränderten Chloramin-T Methode jodiert, im Wesentlichen wie dies im Beispiel 3 beschrieben worden ist. In typischer Weise wurden 0,5–1,0 mCi von Iodin-125 oder von Iodin-131 und 10 µl einer 43 mM wässrigen Lösung von Chloramin-T in ein Reagensglas hinzugefügt, welches 50–100 µg des monoklonalen Antikörpers in 100 µl PBS enthielt. Das Reaktionsprodukt wurde nach drei Minuten mit 20 µl einer 120 mM Lösung von Natriummetabisulfit abgeschreckt. Die radioaktiv markierten Antikörper wurden gereinigt unter Verwendung einer Sephadex G-25 Säule. Diese Säule bestand aus einer serologischen Plastikpipette (8 × 200 mm), welche am Ende mit Baumwolle zugestopft wurde ($V_0 = 4,5 \text{ ml}$, $V_t = 12 \text{ ml}$). Jedes Reaktionsgemisch wurde auf eine Säule geladen und mit PBS, pH 7,2 eluiert. Individuelle Reagensgläser, welche 1 ml Aliquotteile enthielten, wurden in einem Szintillationszähler gezählt. Radioaktiv markierte Antikörper wurden in typischer Weise mit einer Ausbeute von 85–90% wiedergewonnen. Alle diese nach der Chloramin-T Methode radiomarkierten Antikörper wurden analysiert unter Verwendung einer analytischen augenblicklichen Dünnschichtchromatographie (Instant Thin Layer Chromatography = ITLC) Systems auf Glasfasern, welche mit einem Gel aus Siliziumdioxid imprägniert waren. Streifen (2 × 20 cm) wurden vor dem Gebrauch aktiviert durch ein Erhitzen während 15 Minuten auf 110°C; betupft mit 1 µl der Probe; luftgetrocknet und mit Methanol/ H_2O (80 : 20) eluiert über annähernd 12 cm; wieder luftgetrocknet, in Hälften geschnitten und gezählt, um die proteingebundene und die nicht proteingebundene Radioaktivität zu bestimmen. Die Ergebnisse dieses Verfahrens lieferten einen Hinweis darauf, dass ein Anteil von mehr als 99% des Antikörpers proteingebunden war, womit bestätigt wird, dass funktionale, radioaktiv markierte, biotinierte Antikörper mit einer hohen Reinheit erzielt werden konnten.

[0113] Die gemäß dem oben beschriebenen Verfahren hergestellten radioaktiv markierten, biotinierten Antikörper wurden bei 4°C gelagert und sie wurden innerhalb von vier Stunden ab der Markierung den Mäusen verabreicht.

[0114] Die folgenden zwei Beispiele offenbaren die Ergebnisse von analytischen Verfahren, welche dazu verwendet wurden, um zu beweisen, dass radioaktiv markierte, biotinierte Antikörper die Fähigkeit behielten, Zielantigene zu binden, und dass sie bei dem Vorhandensein von Serumbestandteilen stabil waren.

[0115] Das Beispiel 21 beschreibt die Methoden, welche verwendet worden sind, um zu demonstrieren, dass Antikörper, die verändert worden sind durch Biotinilierung und durch eine radioaktive Markierung, beides behielten, nämlich sowohl ihre Fähigkeit zur Antigenbindung als auch ihre strukturelle Integrität.

BEISPIEL 21

Bewertung der Immunreaktivität

[0116] Die in vitro Immunreaktivitäten von radioaktiv markierten Lym-1 Herstellungen wurden mit einer lebenden Zellprobe bewertet unter Verwendung von Rajizellen gemäß der von Epstein et al. in Cancer Res., 47 : 830 (1987) beschriebenen Methode. Rajizellen (10^6 Rajizellen/ Reagensglas) wurden erneut suspendiert in

100 µl eines 1% Rinderserumalbumins (BSA = Bovine Serum Albumin) in PBS. Markiertes Lym-1 (100 µl) wurde jeweils zu jedem Reagensglas (annähernd 10 µCi/µg; 100.000 cpm/Reagensglas) eines dreifachen Satzes hinzugefügt und während einer Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wobei währenddessen unter Einsatz eines Orbitatrüttlers kontinuierlich gemischt wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 1% BSA in PBS gewaschen, indem die Reagensgläser bei 1000 rpm (rotations per minute = Umdrehungen pro Minute) während 5 Minuten zentrifugiert wurden, das oben Schwimmende dekantiert wurde und indem die Zellen in 200 µl PBS erneut suspendiert wurden. Im Anschluss an die Vollendung der Waschvorgänge wurde das gebundene Lym-1 nachgewiesen, indem die an das Zellpellet gebundene Radioaktivität unter Verwendung eines Gammazählers gemessen wurde. Die Ergebnisse dieses Verfahrens waren im Wesentlichen identisch mit jenen, die unter dem Beispiel 6 dargelegt worden sind. Spezifischer ausgedrückt, 75% des radioaktiv markierten, intakten Lym-1 und 75% des radioaktiv markierten, biotinilierten Lym-1 banden die Zielzellen. Dies lieferte einen Hinweis darauf, dass die Antigenbindungsaktivität des radioaktiv markierten, biotinilierten Lym-1 vergleichbar war mit derjenigen des radioaktiv markierten, intakten Lym-1, welches als eine Standardkontrolle diente.

[0117] Die Immunreaktivität des veränderten TNT-1 MAb wurde bewertet unter Verwendung eines festen Zell Radioimmunoassays, wie er von Gaffar et al. in J. Immunoassay, 2 : 11 (1991) beschrieben worden ist. Kurz, das radioaktiv markierte TNT-1 und das radioaktiv markierte und biotinilierte TNT-1 wurden während 30 Minuten mit Rajizellen inkubiert, vorher mit 20% Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert, und dann mit Aceton bei -20°C behandelt. Die Zellen wurden dann mit 1% BSA in PBS gewaschen und in einem Gammazähler gezählt. Die Ergebnisse dieses Verfahrens lieferten einen Hinweis darauf, dass annähernd 60% von beiden Antikörperherstellungen sich an die festen Zellen banden. Dies lieferte einen Hinweis darauf, dass die Antigenbindungsaktivität des radioaktiv markierten und biotinilierten TNT-1 vergleichbar war mit derjenigen des radioaktiv markierten und intakten TNT-1, welches als eine Standardkontrolle diente.

[0118] Das Beispiel 22 beschreibt die Methoden, welche dazu verwendet wurden, um zu beweisen, dass die radioaktiv markierten, biotinilierten Antikörper bei Anwesenheit eines Serums nicht einer ungewöhnlichen Degradation unterworfen wurden.

BEISPIEL 22

Serumstabilität von veränderten Antikörpern

[0119] Direkt mit ¹²⁵I markierte MRb's wurden zu einem dreifachen Satz von Reagensgläsern hinzugefügt, welche frisches Mäuseserum bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml enthielten. Alle Proben wurden bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator inkubiert, der bei 5% CO₂ in der Luft gehalten wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 8 Tagen wurde die proteingebundene Radiomarkierung bestimmt durch Hinzufügen von 900 µl einer 100 Trichloressigsäure (TCA = Trichloracetic acid) zu 100 µl aliquoten Teilen einer jeden Probe, durch das Inkubieren während fünf Minuten bei Raumtemperatur und durch das Wiedergewinnen von Proteinniederschlägen durch ein Zentrifugieren. Aliquote Teile (500 µl) des oben Schwimmenden wurden aus jedem Reagensglas herausgezogen und die Radioaktivität unter Verwendung eines Gammazählers gezählt. Die Ergebnisse lieferten einen Hinweis darauf, dass der radioaktiv markierte, biotinilierte Antikörper in vitro zu allen Zeitpunkten stabil war. Spezifischer gesehen, mindestens 97% der radioaktiven Markierung blieben nach 8 Tagen der Inkubation mit dem Protein verbunden. Dies bestätigte, dass die auf den MAb's vorhandenen Biotinanteile keine nachteilige Wirkung auf die Stabilität der mit dem Protein verbundenen radioaktiven Markierung hatte.

[0120] Dieselben aliquoten Teile einer jeden inkubierten Serummischung wurden auch der Reihe nach geprüft durch eine nicht reduzierende SDS-PAGE und durch eine Autoradiographie. Für diese Untersuchung wurden die Proben auf 10 Acrylamidgelen elektrophoresiert und sichtbar gemacht, indem sie der Belichtung durch einen Röntgenfilm ausgesetzt wurden. Die Molekulargewichte der Proben wurden bestimmt durch einen Vergleich mit Molekulargewichtsstandards. Die Ergebnisse dieser Verfahren lieferten einen Hinweis darauf, dass ein radioaktiv markierter, intakter MAb und der radioaktiv markierte, biotinilierte MAb im Wesentlichen ähnliche Molekulargewichte aufwiesen. Spezifischer gesehen, die größeren Bänder für das radioaktiv markierte Lym-1 und für das radioaktiv markierte, biotinilierte Lym-1 wiesen einen M_s Wert von annähernd 200.000 auf. In ähnlicher Weise hatten die größeren Bänder für das radioaktiv markierte TNT-1 und für das radioaktiv markierte, biotinilierte TNT-1 einen M_s Wert von annähernd 150.000.

[0121] Eine isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen wurde in einer BioRad Modell 111 Mini IEF Zelle durchgeführt. Proben wurden durch einen pH Gradienten elektrophoresiert, welcher mit einer Mischung aus BioLyte Ampholyten (BioRad) bei Konzentrationen von 1,2% 3/10 Ampholyt und von 0,8% 5/8 Ampholyt gemäß den von BioRad bereitgestellten Protokollen aufgebaut wurde. IEF Standards (BioRad) wurden in jeder Reihe für die Kalibrierung von pI mit eingeschlossen. IEF Gele wurden mit Coomassie Blue R-250 gefärbt und über Nacht getrocknet. Die Ergebnisse dieser Verfahren bestätigten, dass die Biotinilierung der MAb's die elektrischen Ladungseigenschaften der Makromoleküle wesentlich veränderte. Während das radioaktiv markierte

Lym-1 einen pI Wert von 7–8 hatte, wies das radioaktiv markierte, biotinilierte Lym-1 einen pI Wert von 5–6 auf. Ähnlich wies, während das radioaktiv markierte TNT-1 MAb einen pI Wert von 5,5–6,5 hatte, das radioaktiv markierte, biotinilierte TNT-1 MAb einen pI Wert von 4,5–5,0 auf. Die Veränderung von freien Aminogruppen auf dem MAb Protein entfernt somit, wie erwartet worden ist, wirksam die positive Ladung auf den Proteinen oder neutralisiert einen Teil davon, wie es augenscheinlich und damit evident wird durch den geringeren basischen Charakter der biotinilierten Antikörper.

[0122] Das Beispiel 23 beschreibt die Methoden, welche verwendet werden, um zu beweisen, dass MAb's mit Hälften von Aminostellen, welche chemisch verändert worden sind, um zu einem Makromolekül mit einem verminderten pI relativ zu dem nativen Antikörper zu führen, in vorteilhafter Weise (1) eine angestiegene Zielspezifität, (2) eine verminderte nicht-spezifische Bindung und (3) eine verminderte Clearance-Zeit erbrachten.

BEISPIEL 23

Untersuchungen über die Bioverteilung

[0123] Zwei Gruppen von sechs Wochen alten, nackten Mäusen wurden injiziert entweder mit Raji Lymphomzellen, mit den Zellen des LS174T Dickdarmkarzinoms oder mit ME-180 Zervikalkarzinomzellen gemäß den von Khawli et al. in *Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals*, 6 : 13 (1993), beschriebenen Methoden. Die Tumore wuchsen während 10–21 Tagen, bis sie annähernd 1 cm groß im Durchmesser waren.

(a) Paarweise markierte Studien. In der ersten Gruppe von Mäusen ($n = 6$) wurde jede Maus intravenös mit einem 0,2 ml Inoculum injiziert, welches 120 $\mu\text{Ci}/10 \mu\text{g}$ eines veränderten mit ^{131}I markierten MAB und 25 $\mu\text{Ci}/10 \mu\text{g}$ eines intakten mit ^{125}I markierten MAB enthielt. In der zweiten Gruppe ($n = 4$) erhielten die Mäuse ein 0,2 ml Inoculum, welches 120 $\mu\text{Ci}/10 \mu\text{g}$ eines veränderten mit ^{131}I markierten MAB und 25 $\mu\text{Ci}/10 \mu\text{g}$ eines mit ^{125}I markierten MAB F(ab')_2 enthielt. In allen Experimenten wurden die Mäuse geopfert durch eine zervikale Dislokation zu vorher bestimmten Zeiten nach der Injektion, und verschiedene Organe, Blut und der Tumor wurden entfernt und gewogen. Die Proben wurden dann in einem Gammazähler gezählt, um die ^{131}I und die ^{125}I Aktivitäten quantitativ zu bestimmen. Die ^{125}I Zählungen wurden für ein Umstellen von dem ^{131}I Kanal angepasst, indem man 17% von den ^{131}I Kanalzählungen subtrahierte, eine Formel, welche experimentell unter Verwendung eines 1282 Compugamma Gammazählers bestimmt wurde. Die Daten wurden auch um den radioaktiven Strahlungszerrfall des ^{131}I Isotops berichtigt, entsprechend dem Zeitpunkt zu dem die Tiere geopfert wurden. Für jede Maus wurden die Daten als cpm pro Gramm Tumor, cpm pro Gramm Organ und % Dosis/Gramm ausgedrückt. Aus diesen Daten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung für jede Gruppe berechnet. Dieselben Studien einer Bioverteilung mit einer paarweisen Markierung wurden durchgeführt unter Verwendung von Lym-1 in dem Raji Lymphoma Modell und von B72.3 in dem LS174T Modell des menschlichen Dickdarmkarzinoms.

[0124] Die Ergebnisse dieser Verfahren sind in **Fig. 17** dargestellt. Während beide, nämlich intaktes TNT-1 und die TNT-1/Biotin veränderten MAB's, sich an dem Tumorgewebe einen Tag nach der Injektion lokalisierten, zeigte der biotinilierte Antikörper, wie aus der Darstellung 17A hervorgeht, eine größere Lokalisation, wie sie durch den Prozentsatz der injizierten Dosis/Gramm des Tumors gemessen wurde. Eine nicht spezifische Bindung zweier markierter MAB's war auch offensichtlich in einer vielfältigen Anzahl von verschiedenen Geweben. Wichtig war, dass die Menge an biotiniliertem TNT-1, welches nicht spezifisch mit diesen Geweben verbunden war, gleichmäßig kleiner war als die Menge an intaktem TNT-1, welches eine solche nicht spezifische Bindung zeigte. Somit wurde der Grad an spezifischer Bindung erhöht und der Grad an nicht spezifischer Bindung verminderte sich für den biotinilierten Antikörper relativ zu dem nicht veränderten Antikörper. Der Vorteil des veränderten Antikörpers ist quantitativ in **Fig. 17B** dargestellt, in welcher das Verhältnis des am Tumor lokalisierten Antikörpers zu dem nicht spezifisch lokalisierten Antikörper für jedes Gewebe dargestellt ist. Wie dargestellt, war der Vorteil des biotinilierten Antikörpers als ein bildgebendes Reagens besonders offensichtlich beim Muskel und bei der Bauchspeicheldrüse.

[0125] Ähnliche Trends wurden beobachtet bei Messungen, welche drei Tage nach der Injektion aufgenommen wurden. **Fig. 17C** zeigt, dass ein biotinilierter TNT-1 Antikörper sich wirksamer am Tumorgewebe lokalisiert als das Gegenstück des nicht biotinilierten Antikörpers. Zur selben Zeit war die Menge an nicht spezifischer Bindung in vorteilhafter Weise geringer für die biotinilierten Probenarten. **Fig. 17 D** bestätigt quantitativ, dass das Verhältnis Tumor/Organ, welches das Verhältnis von Signal zu Rauschen in verschiedenen Geweben widerspiegelt, im Muskel und in der Bauchspeicheldrüse am höchsten war. Bemerkenswerter Weise schließen die **Fig. 17C** und **17D** Ergebnisse mit ein, welche gewonnen worden sind unter Verwendung von TNT-1 F(ab')_2 Fragmenten, welche schnelle Gesamtkörper Clearance-Geschwindigkeiten aufweisen. Obwohl das Verhältnis Tumor/ Organ für die Antikörperfragmente im Vergleich zum biotinilierten TNT-1 in verschiedenen Gewebetypen höher war, war der Anteil an injiziertem biotiniliertem TNT-1, welches am Tumor lokalisierte, in vorteilhafter Weise höher. Die Ergebnisse stellten dar, dass ein biotinilierter MAB am Tumorgewebe in einer Art und Weise

lokalisierte, welche entweder einem unveränderten, intakten MAb oder den $F(ab')_2$ MAb Fragmenten überlegen war.

(b) Gesamtkörper Clearance. Experimente wurden durchgeführt, bei denen verschiedenen Gruppen von Balb/c Mäusen ($n = 45$) i. v. Injektionen radioaktiv markierter Antikörper gegeben wurden. Die Gesamtkörperaktivität bei der Injektion und zu ausgewählten Zeiten danach wurde mit einem Dosiskalibrator gemessen.

[0126] Die **Fig. 18** und **19** offenbaren die Ergebnisse von Untersuchungen über die auf den ganzen Körper bezogene Geschwindigkeit der Clearance für TNT-1 und Lym-1 Antikörper und für deren Derivate. Die in **Fig. 18** dargestellten Ergebnisse lieferten einen Hinweis darauf, dass TNT-1 MAb, welches entweder durch SPDP oder durch Biotin verändert worden ist, die Clearance-Zeiten relativ zu dem intakten Antikörper vermindert hat. Das $F(ab')_2$ TNT-1 Fragment, welches die schnellste Geschwindigkeit der Clearance unter allen getesteten Antikörpern aufwies, wurde in diesem Verfahren als eine positive Kontrolle verwendet. Somit zeigte das biotinilierte TNT-1 Mab in vorteilhafter Weise eine schnellere Clearance-Geschwindigkeit als der nicht biotinilierte Antikörper. In ähnlicher Weise lieferten die in **Fig. 19** dargestellten Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass Lym-1 MAb, welches entweder durch SPDP oder durch Biotin verändert worden ist, die Clearance-Zeiten relativ zu dem intakten Antikörper vermindert hatte. Dies verdeutlichte illustrativ, dass Wirkstoffe, welche Anteile von freien Aminogruppen chemisch veränderten, um den pI des Antikörpers zu vermindern, in vorteilhafter Weise die Bindungsspezifität des Antikörpers und die Gesamtkörper Clearance-Geschwindigkeit erhöhten.

[0127] Wir glauben, dass Veränderungen von irgendeinem Antikörper unter Anwendung der Methoden der vorliegenden Erfindung ein Reagens liefern wird, welches nützlich für eine verbesserte bildliche Darstellung eines Tumors ist. Um eine Abbildung von irgendeinem gewünschten Gewebetyp unter Anwendung der Methoden der vorliegenden Erfindung zu erzeugen, müssen zuallererst Antikörper für diesen Gewebetyp gewonnen werden. Polyklonale Antikörper können in einer herkömmlichen Art und Weise gewonnen werden, wie es ein jeder, der Experte auf diesem Gebiet ist, wissen wird. Alternativ können monoklonale Antikörper hergestellt werden, um die von diesen Antikörpern gelieferte erhöhte Spezifität zu erzielen, wie es ein jeder, der Experte auf diesem Gebiet ist, wissen wird. Die Antikörper werden dann chemisch an freien Aminogruppen verändert durch eine Konjugation mit einem heterobifunktionalen Wirkstoff, Biotin, oder mit einem anderen Wirkstoff, welcher zu einem Produkt eines veränderten Antikörpers mit einem isoelektrischen Punkt führen wird, welcher niedriger liegt als der isoelektrische Punkt des nicht veränderten Antikörpers. Nach der Konjugation wird eine geeignete Markierung auf die veränderten Antikörper aufgetragen.

[0128] Obwohl die vorstehenden Beispiele von der Abbildung mittels einer Markierung, welche ein eine Gammastrahlung emittierendes Radionuklid enthält, Gebrauch macht, können viele andere Markierungstypen und Abbildungssysteme innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen werden. Zum Beispiel können strahlungsundurchlässige Materialien wie Barium, Cäsium oder Jod abgebildet werden unter Verwendung herkömmlicher Röntgenstrahlen. Paramagnetische oder supermagnetische Teilchen können als Markierungen verwendet werden, um unter Anwendung der MRI Technologie eine Abbildung der Lokalisierung der Antikörper zu erzeugen. Zusätzlich kann Technetium als Markierung verwendet werden. Diese alternativen Markierungen können mit veränderten Antikörpern konjugiert werden unter Verwendung herkömmlicher Methoden.

[0129] Die markierten Antikörper können in pharmazeutische Herstellungen mit eingeschlossen werden für die Einführung einer Markierung in einen Gegenstand, der einen Arzneistoffträger, einen Substratträger oder eine Basis enthält, welche pharmazeutisch akzeptiert werden können. Geeignete Arzneistoffträger, Substratträger oder geeignete Basismaterialien schließen mit ein; eine Salzlösung, eine mit Phosphat gepufferte Salzlösung, Glycerol, Calciumcarbonat und dergleichen. Diese Zusammensetzungen werden dann durch irgendeines aus einer Vielfalt von Mitteln eingeführt, wie etwa durch eine lokale Injektion, durch eine intravenöse Injektion oder durch eine orale Verabreichung in solchen Fällen, wo eine verminderte Stärke erforderlich ist oder in denen eine Abbildung von Gewebe in der Mundhöhle erwünscht ist. Vorzugsweise erfolgt jedoch die Verabreichung durch eine systemische Injektion, um die Aussetzung des Zielgewebes gegenüber dem Antikörper zu maximieren.

[0130] Wir glauben, dass die chemische Veränderung von freien Aminogruppen, welche auf den Antikörpern vorgenommen worden ist, durch Hinzufügen eines heterobifunktionalen Wirkstoffes, von Biotin, oder eines anderen Wirkstoffes, um zu einem veränderten Antikörper mit einem niedrigeren isoelektrischen Punkt zu führen als demjenigen eines entsprechenden unveränderten, intakten Antikörpers gemäß der vorliegenden Erfindung, deutlich verbesserte Ergebnisse erzeugen wird, wenn diese veränderten Antikörper in einen immuntherapeutischen Wirkstoff mit eingebunden sind. Solche therapeutischen Wirkstoffe enthalten im Allgemeinen einen Antikörper, welcher spezifisch gegenüber einem Tumor oder gegenüber einem anderen krankhaften Gewebe ist und welcher mit einem oder mit mehreren biologisch aktiven Molekülen verbunden ist. Geeignete biologisch aktive Moleküle, welche in solchen Wirkstoffen funktionieren, sind Toxine wie das Diphtherietoxin (Ricin) A-Kette oder irgendeines aus einer Vielfalt von Pflanzentoxinen, welche den Experten auf dem Gebiet bekannt

sind; Radionuklide wie radioaktive Isotope von Yttrium, Jod, Phosphor und andere gewöhnlich verwendete radiotherapeutische Wirkstoffe; Arzneimittel wie Methotrexat, 5-Fluorouracil oder Adriamycin; Chelate einschließlich EDTA und EGTA; cis-Platin und andere toxische, organometallische Wirkstoffe und irgendein anderer therapeutischer Wirkstoff.

[0131] Bis jetzt muss das Versprechen einer wirksamen Immuntherapie noch vollständig verwirklicht werden. Wir glauben, dass die erhöhte Aktivität und Spezifität der veränderten Antikörper der vorliegenden Erfindung immuntherapeutische Wirkstoffe erzeugen werden, welche eine Aktivität und Spezifität für ihre Zielgewebe aufweisen, die groß genug sind, um die Mängel der immuntherapeutischen Wirkstoffe nach dem Stand der Technik zu überwinden. Somit können kranke Zielgewebe getötet werden, ohne dass dabei gesundes Gewebe des Untersuchungssubjekts wesentlich in Mitleidenschaft gezogen wird, wenn das Subjekt mit dem geeigneten immuntherapeutischen Wirkstoff injiziert wird.

[0132] Bei der Anwendung dieser immuntherapeutischen Wirkstoffe müssen die Antikörper, welche spezifisch gegenüber besonderen, unerwünschten Gewebetypen sind, erst einmal gewonnen werden. Wenn die gewünschten Antikörper nicht verfügbar sind, dann können die Antikörper in einem geeigneten Organismus gezüchtet werden, indem man den Organismus mit Antigenen injiziert und ein Serum von dem Säugetier gewinnt, wie es ein jeder, der Experte auf diesem Gebiet ist, wissen wird. Alternativ und vorzugsweise können monoklonale Antikörper in einer Weise gezüchtet werden, welche einem jeden, der Experte auf diesem Gebiet ist, bekannt ist. Die Antikörper werden dann chemisch konjugiert mit einem Wirkstoff, etwa mit einem heterobifunktionalen Wirkstoff, Biotin oder einem anderen Wirkstoff, welcher in der Lage ist, freie auf dem Antikörpermolekül vorhandene Aminogruppen zu verändern. Nach der Konjugation werden die sich daraus ergebenden veränderten Antikörper weiter verändert durch eine Konjugation mit einem biologisch aktiven Wirkstoff, wie einem therapeutischen Wirkstoff oder einer nachweisbaren Markierung, wie dies oben beschrieben ist. Die Antikörper werden mit pharmazeutischen Zusammensetzungen verbunden, welche einen Arzneistoffträger, einen Substratträger oder eine Basis enthalten, welche pharmazeutisch akzeptiert werden können. Solche pharmazeutisch annehmbaren Arzneistoffträger, Substratträger oder Basismaterialien schließen normaler Weise mit ein; eine Salzlösung für eine systemische Injektion, Glycerol, Calciumcarbonat. Die Zusammensetzungen sind dann bereit für die Einführung in einen Patienten, etwa ein Säugetier.

[0133] Die Antikörper werden dann über irgendeinen bekannten Weg der Verabreichung in das Subjekt eingeführt. Zum Beispiel können diese Zusammensetzungen durch eine systemische Injektion, durch eine lokale Injektion in das beeinträchtigte Gewebe eingeführt werden, sie können von oben auf ein äußerlich beeinträchtigtes Gewebe aufgetragen werden und sie können oral in solchen Fällen eingenommen werden, in denen eine verminderte Stärke erforderlich ist oder in denen eine Therapie des Gewebes in der Mundhöhle erwünscht ist.

[0134] Die Dosierung des biologisch aktiven Wirkstoffes, welcher den Antikörper enthält, wird abhängen von der Sensitivität des Zielgewebes gegenüber dem Toxin, von der Menge des beeinträchtigten Gewebes, von dem Weg der Verabreichung, von der Affinität des Antikörpers, von den Clearance-Geschwindigkeiten und von anderen Faktoren. Repräsentative Dosierungen werden jedoch im Allgemeinen in dem Bereich von 1 µg/kg bis 1 mg/kg bezogen auf die Gesamtkörpermasse liegen. In den meisten Anwendungen wird die Dosierung vorzugsweise in dem Bereich von 5 bis 200 µg/kg liegen.

[0135] Das folgende Beispiel dient der Veranschaulichung einer Immuntherapie, welche wirksam gegen Rajitumore bei Mäusen ist. Obwohl PDP veränderte Antikörper in dem Beispiel eingesetzt sind, geht man davon aus, dass Antikörper mit freien Aminogruppen, welche durch andere Wirkstoffe, wie etwa durch Biotin, verändert worden sind, die einen veränderten Antikörper mit einem niedrigeren pl als demjenigen eines entsprechenden intakten Antikörpers erzeugen werden, genauso gut arbeiten werden.

BEISPIEL 24

Behandlung von Rajitumoren bei Mäusen

[0136] PDP verändertes Lym-1 wird wie bei dem Beispiel 1 gewonnen. Der veränderte Antikörper wird dann behandelt, um im Durchschnitt eine Ricin A-Kette pro Antikörpermolekül einzuführen. Intaktes Lym-1 und F(ab')₂ Fragmente sind auf ähnliche Weise mit dem Toxin verbunden.

[0137] 25 Mäuse werden in fünf Gruppen aufgeteilt. Die Gruppe I erhält intraperitoneale Einspritzungen von 10 µg/kg bezogen auf das Gesamtkörpergewicht von dem Ricin-PDP-veränderten Lym-1 in einer mit Phosphat gepufferten Salzlösung (PBS) einmal pro Woche während 8 Wochen. Die Gruppe II erhält Einspritzungen einer gleichwertigen Menge von Ricin-intaktem Lym-1. Die Gruppe III erhält gleichwertige Mengen von Ricin-F(ab')₂ Fragmenten von Lym-1. Die Gruppe IV erhält eine gleichwertige Menge von nicht konjugiertem Ricin. Die Gruppe V erhält PBS alleine.

[0138] Nach 8 Wochen wird eine Immunszintigraphie von allen überlebenden Mäusen durchgeführt unter Verwendung der Methode aus dem Beispiel 14. Die Mäuse der Gruppe I zeigen im Vergleich zu irgendeiner der anderen Gruppen eine verminderte Visualisierung des Tumors. Die überlebenden Mäuse der Gruppe II und

der Gruppe III zeigen etwas Verbesserung, obwohl weniger dramatisch als die Mäuse der Gruppe I. Die Mäuse der Gruppe IV wurden sehr krank oder sie starben.

[0139] Somit zeigt das Beispiel 24 eine besondere Behandlung eines Tumors unter Verwendung der veränderten Antikörper der vorliegenden Erfindung. Das Beispiel 19 zeigt die überlegenen Ergebnisse, welche erreicht wurden, wenn man die PDP veränderten Antikörper der vorliegenden Erfindung verwendete. Man glaubt, dass das Ersetzen der Verwendung von anderen Antikörpern, die spezifisch gegenüber anderen Tumoren oder erkrankten Geweben in Mäusen oder in anderen Säugern wie Menschen sind, ähnlich wirksame Ergebnisse bei der Behandlung dieser spezifischen Tumore oder erkrankten Geweben erzeugt. Darüber hinaus glaubt man, dass das Ersetzen von anderen bekannten Toxinen auch ähnlich wirksame Ergebnisse erzeugt. Das Beispiel 20 zeigt die Verwendung einer ähnlichen Therapie, welche wirksam gegen den Bauchspeicheldrüsenskrebs bei Menschen ist. Obwohl PDP veränderte Antikörper in dem Beispiel eingesetzt sind, geht man davon aus, dass Antikörper mit freien Aminogruppen, welche durch andere Wirkstoffe wie etwa durch Biotin verändert worden sind, die einen veränderten Antikörper mit einem niedrigeren pI als demjenigen eines entsprechenden intakten Antikörpers erzeugen werden, genauso gut arbeiten werden.

Beispiel 25

Behandlung des menschlichen Krebses der Bauchspeicheldrüse

[0140] Ein monoklonaler Antikörper wird gewonnen, welcher spezifisch gegenüber einem Antigen ist, das man in Tumoren der menschlichen Bauchspeicheldrüse gefunden hat. Dieser Antikörper wird durch Konjugation mit im Durchschnitt einer PDP Gruppe pro Antikörpermolekül verändert, wie unter Beispiel 1. Methotrexat wird dann mit diesen veränderten Antikörpern konjugiert, wie es in Beispiel 19 für Ricin beschrieben worden ist.

[0141] Zwei Gruppen von zehn Patienten mit Krebs der Bauchspeicheldrüse werden behandelt. Die erste Gruppe erhält eine intravenöse Injektion der Arzneimittel-PDP-MAB in PBS mit 20 $\mu\text{g/kg}$ bezogen auf das Gesamtkörpergewicht auf einer wöchentlichen Basis in Verbindung mit einer herkömmlichen Therapie. Die zweite Gruppe erhält Injektionen von PBS in Verbindung mit einer herkömmlichen Therapie als eine Kontrolle. Nach 10 Wochen wird eine Immunszintigraphie der überlebenden Patienten durchgeführt.

[0142] Bei der Immunszintigraphie ist die durchschnittliche Größe der Tumore, welche in der ersten Gruppe der Patienten abgebildet worden sind, vermindert relativ zu der Kontrollgruppe. Somit veranschaulicht das vorgehende Beispiel die Nützlichkeit der veränderten Antikörper in der Immuntherapie bei den Menschen.

[0143] Wie oben beschrieben werden die veränderten Antikörper in einer bevorzugten Form der vorliegenden Erfindung in pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert. Somit können die PDP veränderten Antikörper, welche mit einer Arznei für eine Immuntherapie konjugiert worden sind, in eine injizierbare Zusammensetzung mit eingebunden sein, welche eine wirksame Menge an Cytotoxizität der veränderten Antikörper-Toxin Konjugate der vorliegenden Erfindung aufweist. Das Folgende ist ein Beispiel einer an Cytotoxizität wirksamen Zusammensetzung, welche wirksam gegen B-Zellen Lymphomas in Menschen ist.

BEISPIEL 26

Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die wirksam gegen B-Zellen Lymphomas beim Menschen ist

[0144] 10 mg/ml modifiziertes, radioaktiv markiertes Lym-1 aus Beispiel 18

[0145] Rest, mit Phosphat gepufferte Salzlösung (0,9%)

[0146] Zusätzlich können die radioaktiv markierten, veränderten MAB's in Zusammensetzungen formuliert werden, welche wirksam sind, um ihre spezifischen Antigene in der Immunszintigraphie sichtbar zu machen. Das Folgende ist ein Beispiel solch einer Zusammensetzung.

BEISPIEL 27

Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die wirksam in der Immunszintigraphie des Dickdarmkarzinoms ist

[0147] 10 mg/ml verändertes, radioaktiv markiertes B72.3 aus Beispiel 15

[0148] Rest, mit Phosphat gepufferte Salzlösung (0,9%)

[0149] Obwohl das Beispiel 23 eine Methode für die Lokalisierung radioaktiv markierter, biotinierter Antikörper veranschaulicht, werden die Experten auf diesem Gebiet anerkennen, dass alternative Methoden für die Lokalisierung markierter Antikörper auch anwendbar sein werden. Zum Beispiel kann die Verteilung von mit Radiojod versehenen, biotinilierten Antikörpern lokalisiert werden durch eine Abbildung mittels der Immunszintigraphie, genauso wie es in Beispiel 14 beschrieben worden ist. Daher würde zum Beispiel ein mit Radiojod versehenes, biotiniliertes MAB mit einer Bindungsspezifität für ein Tumorantigen nützlich bei diagnostischen

Verfahren sein. Das folgende Beispiel beschreibt, wie solch ein bildgebendes Verfahren ausgeführt werden könnte.

[0150] Das Beispiel 28 beschreibt eine Methode, bei der radioaktiv markierte, biotinilierte MAb's verwendet werden können, um Tumorzellen in vivo abzubilden.

BEISPIEL 28

Abbildung von Melanomtumorzellen

[0151] Zuerst wird ein menschlicher Patient identifiziert, bei dem die Diagnose eines metastatischen Melanoms gestellt worden ist. Die immunhistologische Analyse liefert einen Hinweis darauf, dass das Melanom des Patienten ein Zelloberflächenantigen ausdrückt, welches mit einem Anti-Melanom MAb gefärbt werden kann. Das Anti-Melanom MAb wird zuerst chemisch verändert durch eine Biotinilation von freien Aminogruppen, gemäß der Methode des Beispiels 19 und radiojodiert mit ^{131}I gemäß der Methode des Beispiels 20. Ein wesentlich gereinigter, radioaktiv markierter, biotinilierter Anti-Melanom MAb wird dann verbunden mit einem pharmazeutisch annehmbaren Arzneistoffträger und dem Patienten verabreicht. Nach drei Tagen haben die injizierten veränderten MAb's sich wesentlich an den Zellen lokalisiert, welche Melanomantigene ausdrücken. Die lokalisierten MAb's werden dann durch eine Abbildung mittels der Immunszintigraphie unter Verwendung eines Kollimators mit kleinster Öffnung und einer Spektrum 91 Gammakamera visualisiert, welche von Raytheon bezogen werden kann. Die photographische Aufzeichnung liefert einen Hinweis auf eine schmale Fläche von Radioaktivität auf der Haut des Patienten, wodurch ein zweiter Tumor identifiziert wird.

[0152] Man wird erkennen, dass den Experten auf diesem Gebiet bestimmte mechanische oder chemische Veränderungen in den Sinn kommen mögen. Die vorstehenden Beispiele und die detaillierte Beschreibung sollen klar so verstanden werden, dass sie lediglich dem Weg zur anschaulichen Darstellung dienen, dass aber der Geist und der Umfang dieser Erfindung nur durch die angehängten Ansprüche begrenzt sind.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung einer Materie, die enthält einen Antikörper, welcher mit Biotin an einer ersten Bindungsstelle konjugiert ist, welche mindestens eine aus einer großen Anzahl von freien Aminogruppen ist, welche an dem Antikörper angeordnet sind, um einen veränderten Antikörper zu erzeugen, wobei der besagte Antikörper eine im Vergleich zu einem intakten Antikörper verminderte positive Nettoladung aufweist, wobei der besagte Antikörper eine in vivo Ausscheidungsrate zwischen den Ausscheidungsraten der F(ab')_2 Fragmente und denjenigen der intakten Antikörper von demselben Typ aufweist; und einen chemischen Teil, welcher an den Antikörper an einer zweiten Bindungsstelle gebunden ist, die eine andere ist als die erste Bindungsstelle, an welcher der Antikörper mit Biotin konjugiert ist.
2. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei der besagte Antikörper aus der Gruppe bestehend aus einem monoklonalen Antikörper und aus einem polyklonalen Antikörper ausgewählt wird.
3. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei der chemische Teil eine Markierung darstellt.
4. Zusammensetzung gemäß Anspruch 3, wobei die Markierung aus einem Radionuklid besteht.
5. Zusammensetzung gemäß Anspruch 4, wobei ein Halogenradionuklid oder ein Technetium mit dem veränderten Antikörper verbunden ist.
6. Zusammensetzung gemäß Anspruch 5, wobei das besagte Halogenradionuklid aus der Gruppe bestehend aus ^{125}I und ^{131}I ausgewählt wird.
7. Zusammensetzung gemäß Anspruch 3, wobei die besagte Markierung durch Magnetresonanzbildgebung nachgewiesen werden kann.
8. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei der chemische Teil aus einem biologisch aktiven Molekül besteht.
9. Zusammensetzung gemäß Anspruch 8, wobei das besagte biologisch aktive Molekül aus der Gruppe bestehend aus einem Toxin, aus einem Arzneimittel und aus einem Chelat ausgewählt wird.

10. Zusammensetzung gemäß Anspruch 9, wobei das Arzneimittel aus der Gruppe bestehend aus Methotrexat, 5-Fluoro-Uracil, cis-Platin und Adriamycin ausgewählt wird.

11. Zusammensetzung einer Materie, die enthält:
einen Antikörper, welcher mit einem Farbstoff, einem Chelator oder einem Biotin an einer ersten Bindungsstelle konjugiert ist, welche mindestens aus einer großen Anzahl von freien Aminogruppen besteht, welche an dem Antikörper angeordnet sind, um einen veränderten Antikörper zu erzeugen, wobei der besagte Antikörper eine im Vergleich zu einem intakten Antikörper verminderte positive Nettoladung aufweist, wobei der besagte Antikörper eine in vivo Ausscheidungsrate zwischen den Ausscheidungsraten der $F(ab')_2$ Fragmente und denjenigen der intakten Antikörpern von demselben Typ aufweist, vorausgesetzt der Farbstoff, der Chelator oder das Biotin kein heterobifunktionelles Mittel ist; und
ein Toxin, welches an den Antikörper gebunden ist an einer zweiten Bindungsstelle, die eine andere ist als die erste Bindungsstelle, an welcher der Antikörper mit dem Farbstoff, dem Chelator oder dem Biotin konjugiert ist, wobei das Toxin eine Ricin A-Kette umfasst.

12. Verfahren zur Herstellung eines veränderten Antikörpers gemäß irgendeinem der Ansprüche 1–9 oder 10, wobei der besagte Antikörper eine erhöhte Antigenbindungsspezifität, eine verminderte nicht-spezifische Bindung und eine verminderte in vivo Ausscheidungsdauer aufweist und wobei das Verfahren die folgenden Schritte enthält:

das Gewinnen des besagten Antikörpers, wobei der besagte Antikörper intakt ist;
das Reagieren des besagten intakten Antikörpers an einer ersten Bindungsstelle, welche mindestens eine unter den freien Aminogruppen ist, mit Biotin, um den besagten veränderten Antikörper derart zu erzeugen, dass der besagte veränderte Antikörper einen isoelektrischen Punkt aufweist, welcher niedriger liegt als der isoelektrische Punkt des intakten Antikörpers; und
das Verbinden eines Radionuklids, eines Toxins, eines Arzneimittels oder eines Chelats mit dem veränderten Antikörper an einer zweiten Bindungsstelle, welche eine andere ist als die erste Bindungsstelle, an welcher der Antikörper mit Biotin konjugiert ist.

13. Verfahren zur Herstellung eines veränderten Antikörpers gemäß Anspruch 11, wobei der besagte Antikörper eine erhöhte Antigenbindungsspezifität aufweist, eine verminderte nicht-spezifische Bindung und eine verminderte in vivo Ausscheidungsdauer und wobei das Verfahren die folgenden Schritte enthält:

das Gewinnen des besagten Antikörpers, wobei der besagte Antikörper intakt ist;
das Reagieren des besagten intakten Antikörpers an einer ersten Bindungsstelle, welche mindestens eine unter den freien Aminogruppen ist, mit einem Farbstoff, mit einem Chelator oder mit einem Biotin, um den besagten veränderten Antikörper derart zu erzeugen, dass der besagte veränderte Antikörper einen isoelektrischen Punkt aufweist, welcher niedriger liegt als der isoelektrische Punkt des intakten Antikörpers; und
das Verbinden einer Ricin A-Kette mit dem veränderten Antikörper an einer zweiten Bindungsstelle, welche eine andere ist als die erste Bindungsstelle, an welcher der Antikörper mit dem Farbstoff, mit dem Chelator oder mit dem Biotin konjugiert ist.

Es folgen 22 Blatt Zeichnungen

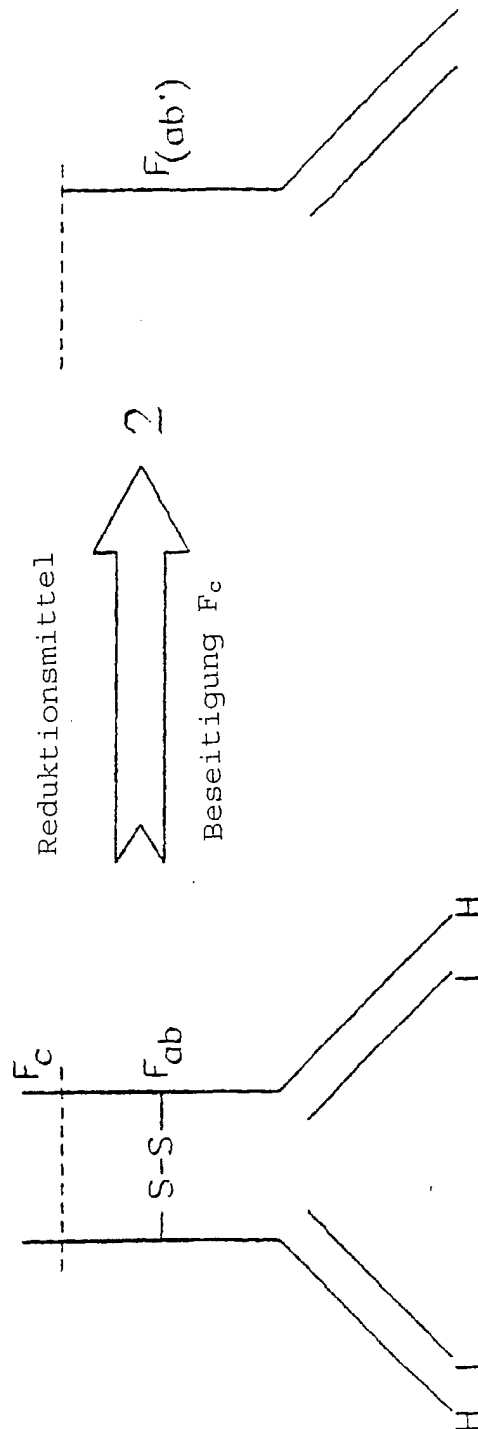


FIG. 1

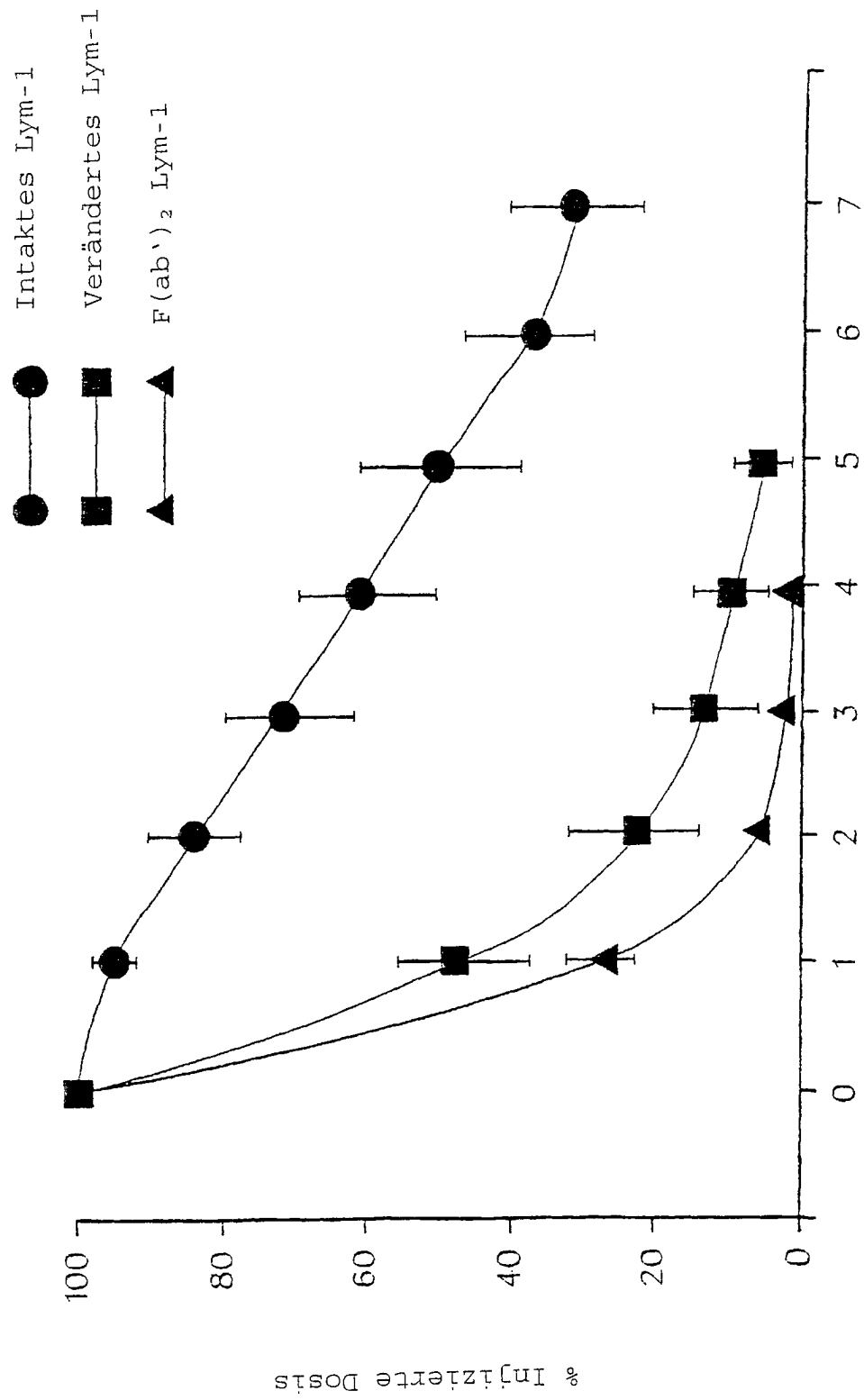
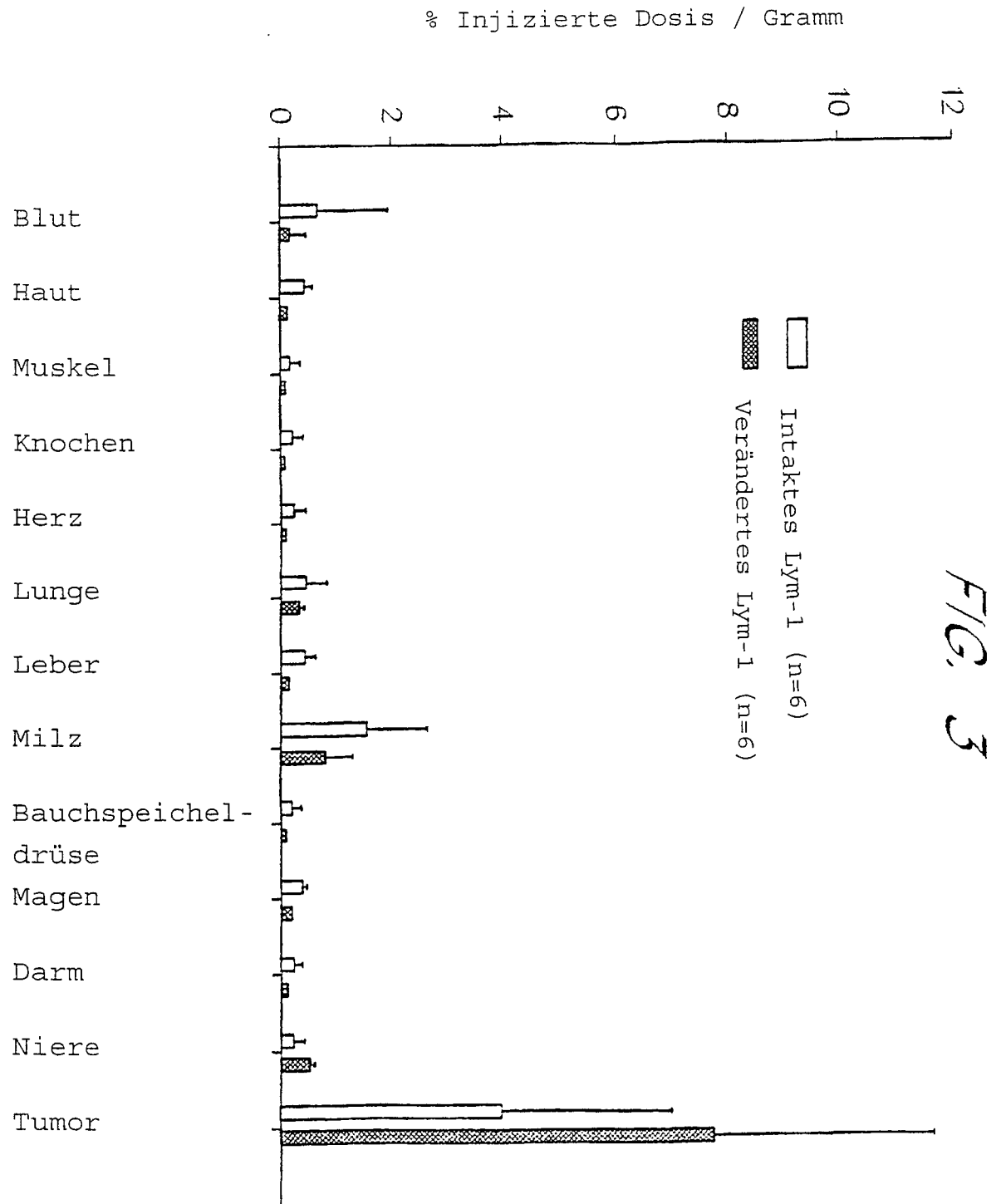


FIG. 2



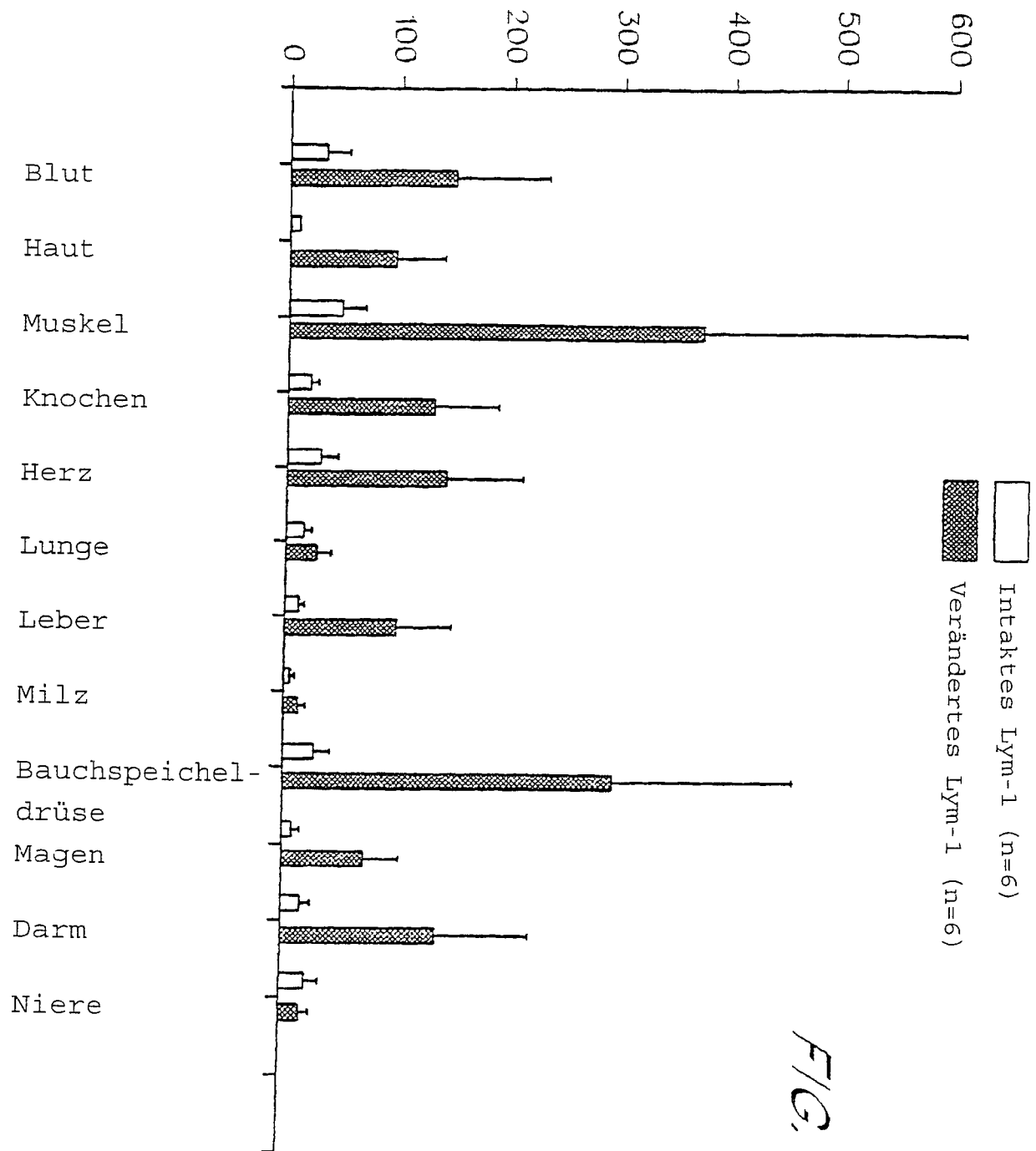
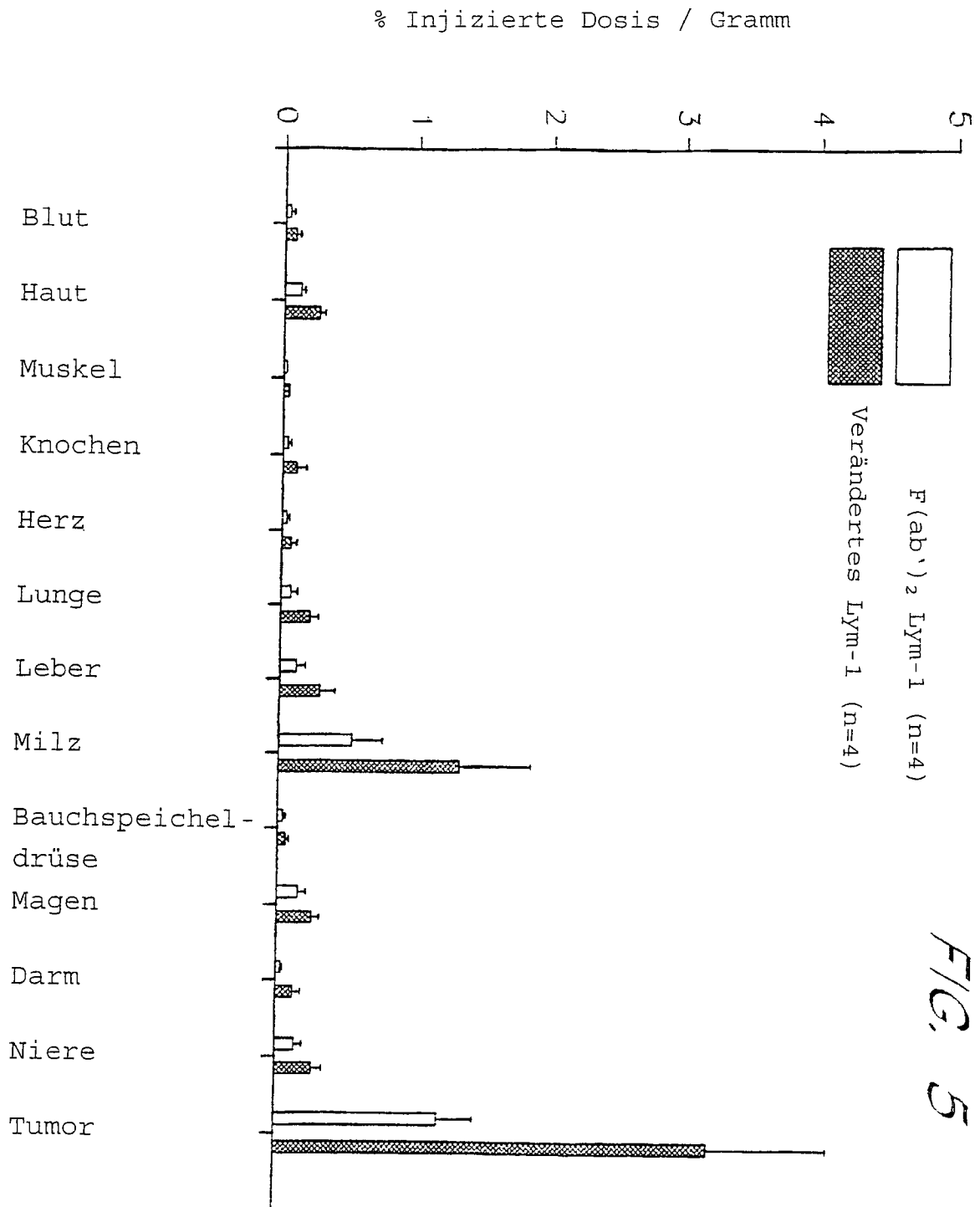


FIG. 4



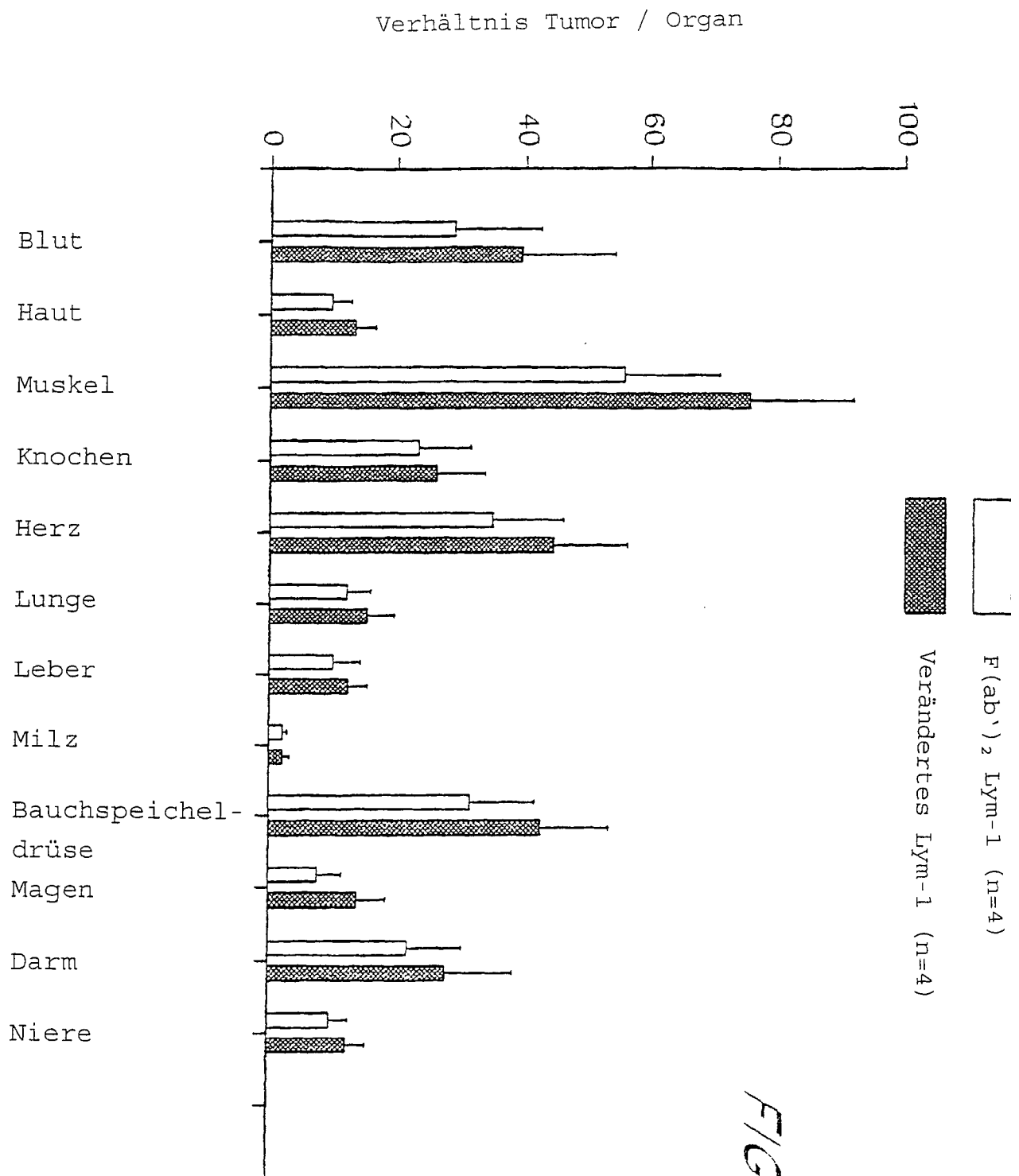
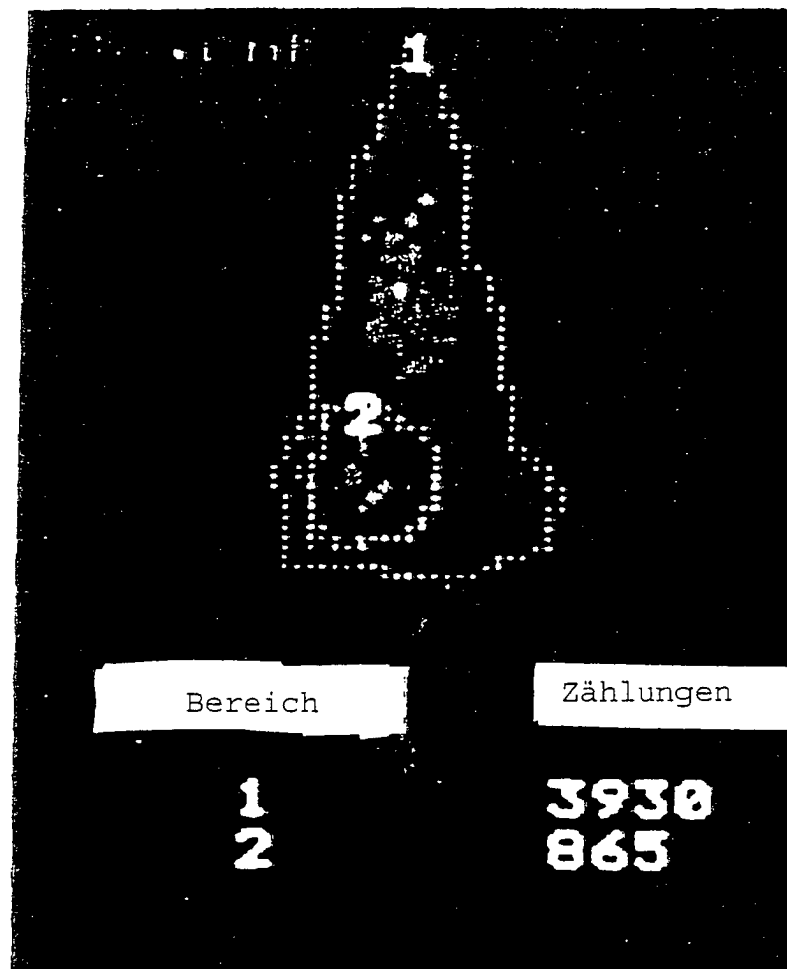


FIG. 6

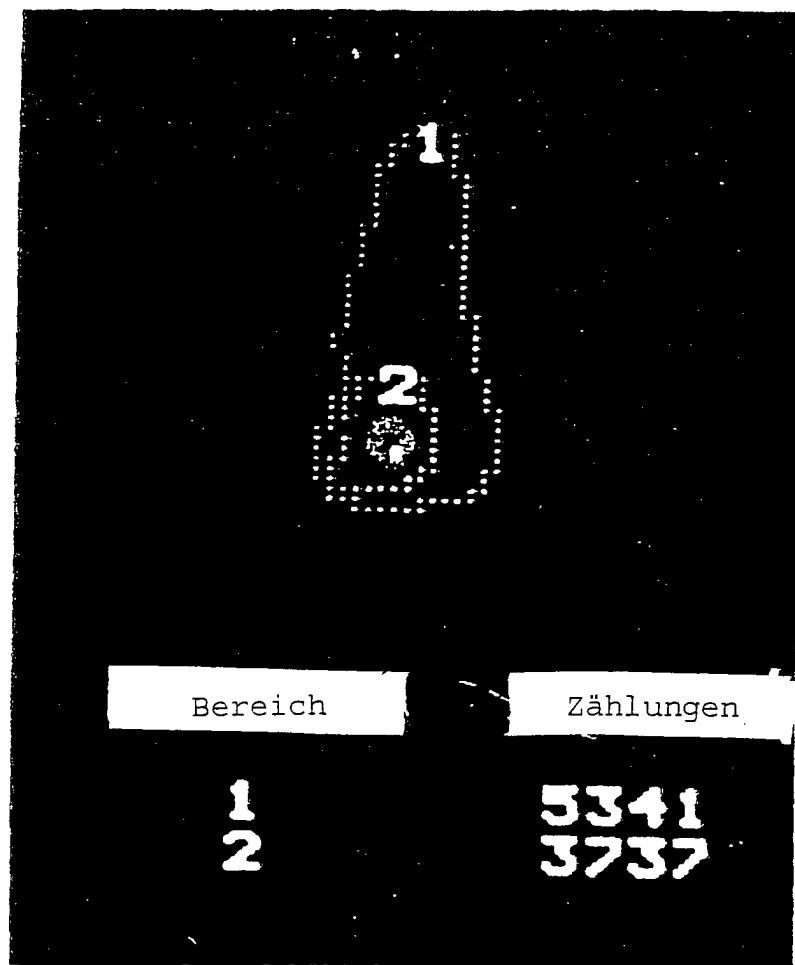
FIG. 7



Bilddarstellung, welche am Tag 7 nach der Injektion von I-131 markiertem intaktem Lym-1 erzielt worden ist.

Bereich 1, ganze Maus; Bereich 2, Raji Tumor

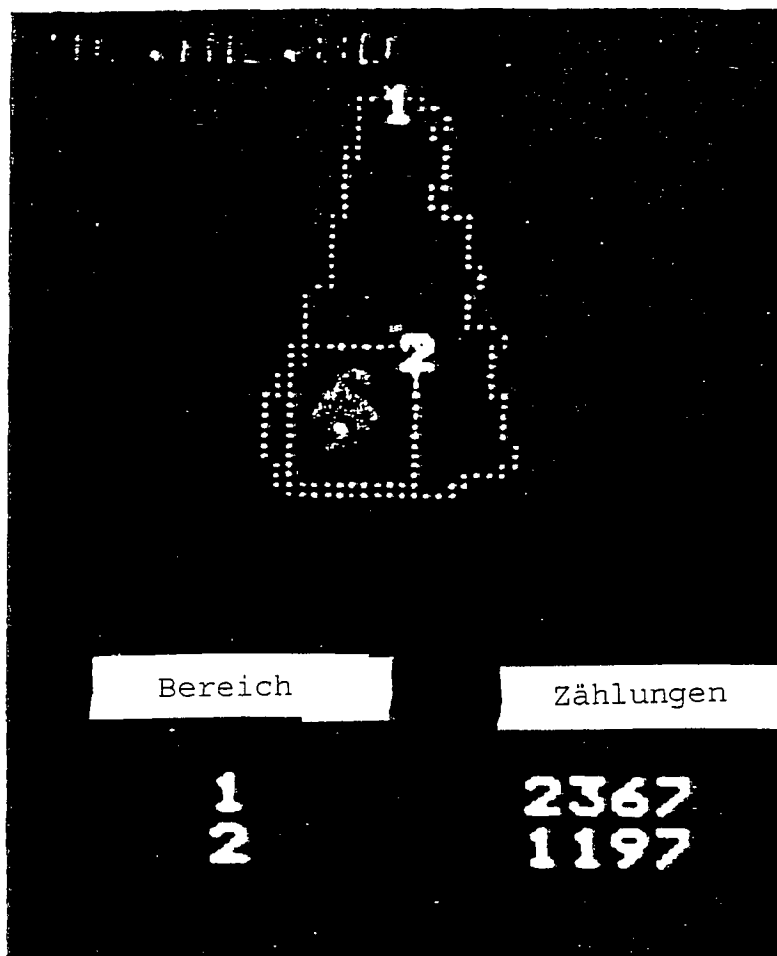
FIG. 8



Bilddarstellung, welche am Tag 7 nach der Injektion von I-131 markiertem verändertem Lym-1 erzielt worden ist.

Bereich 1, ganze Maus; Bereich 2, Raji Tumor

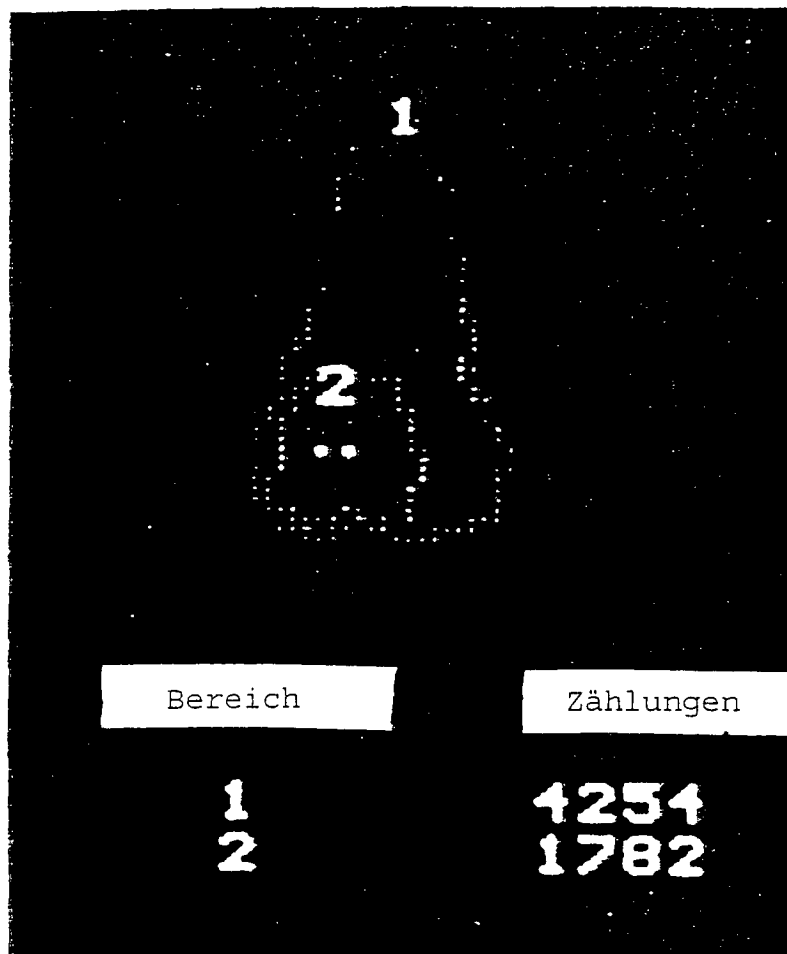
FIG. 9



Bilddarstellung, welche am Tag 7 nach der Injektion von I-131 markiertem verändertem Lym-1 erzielt worden ist.

Bereich 1, ganze Maus; Bereich 2, Raji Tumor

FIG. 10



Bilddarstellung, welche am Tag 5 nach der Injektion von I-131 markiertem verändertem Lym-1 erzielt worden ist.

Bereich 1, ganze Maus; Bereich 2, Raji Tumor

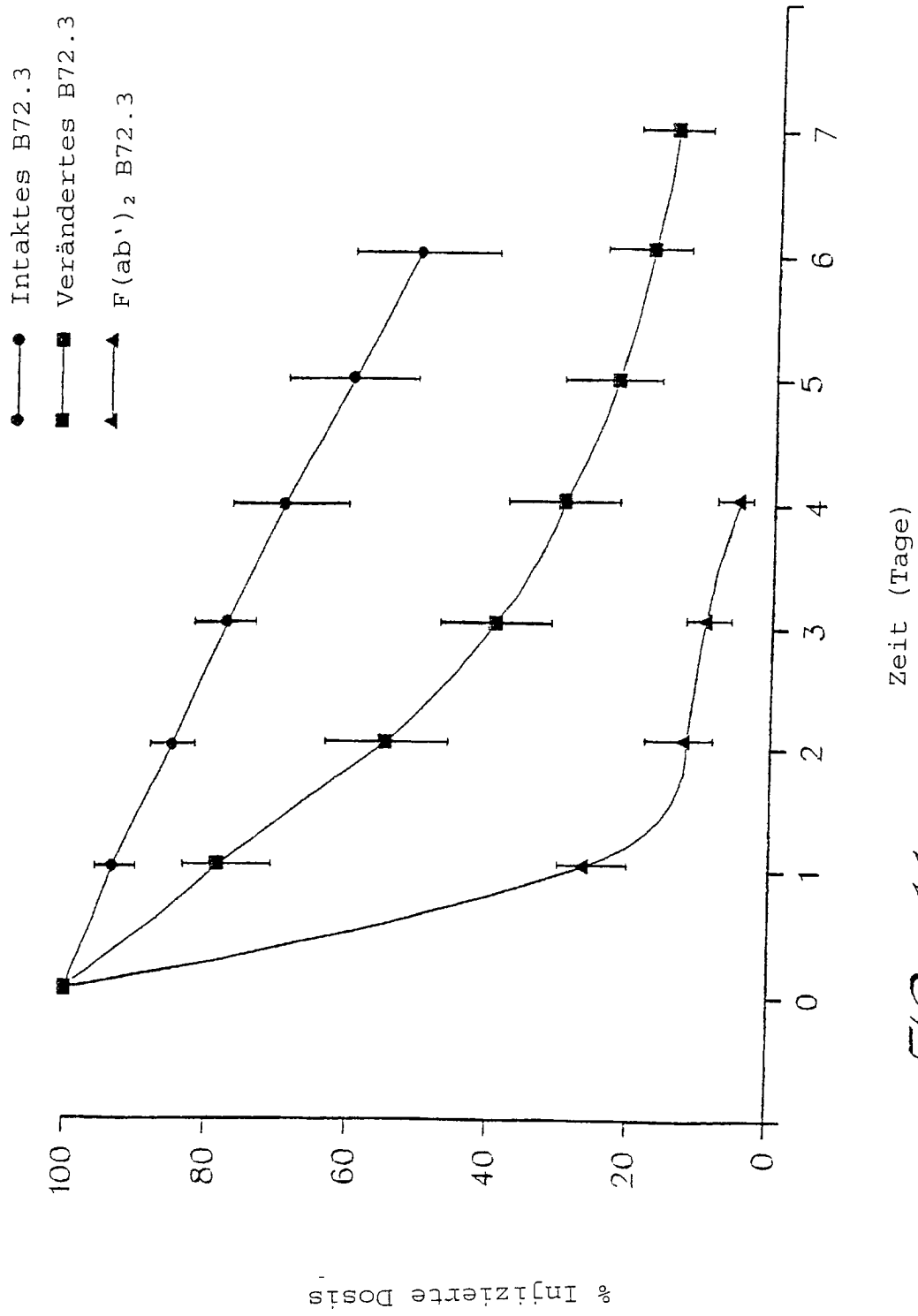


FIG. 11

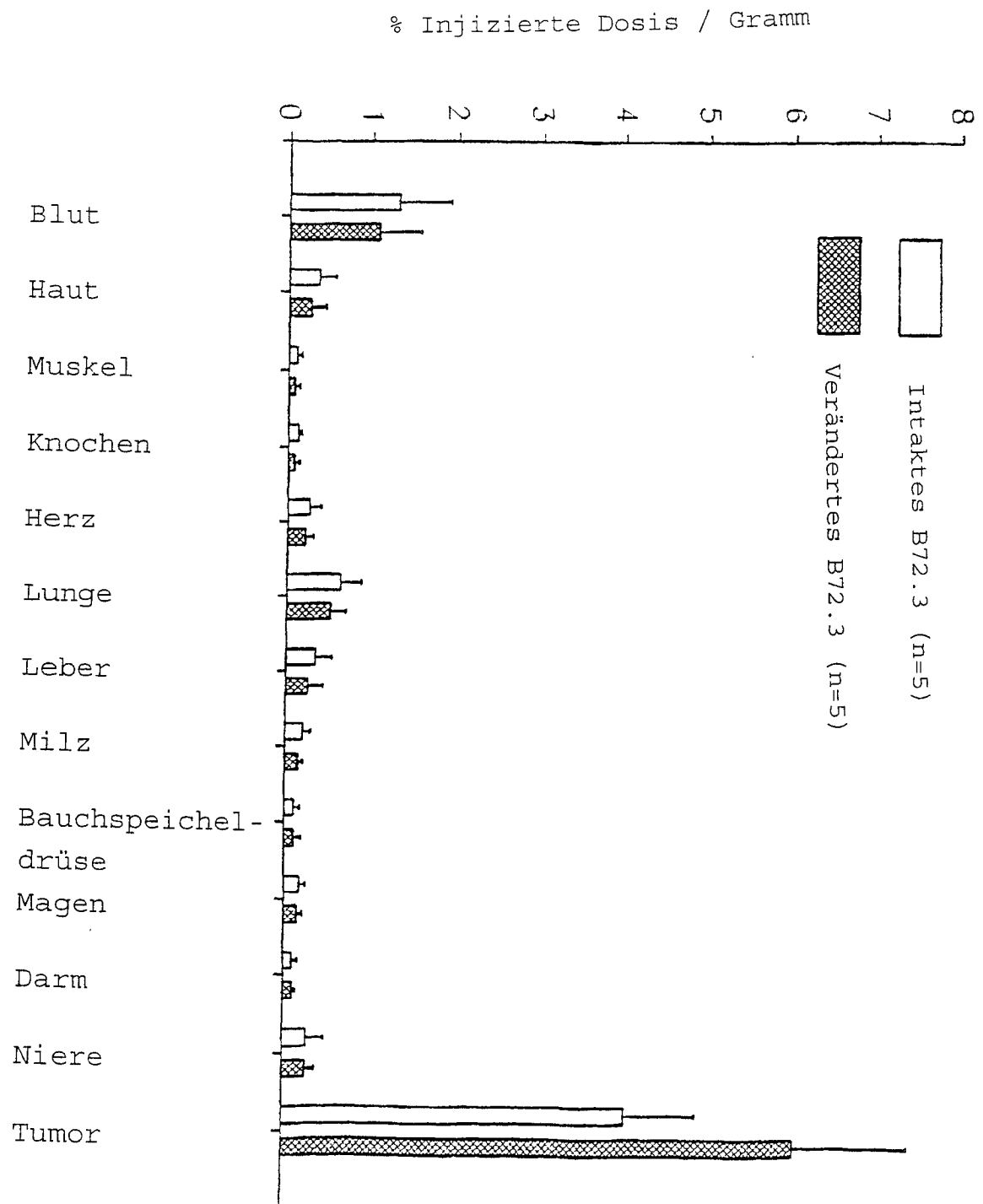


FIG. 12

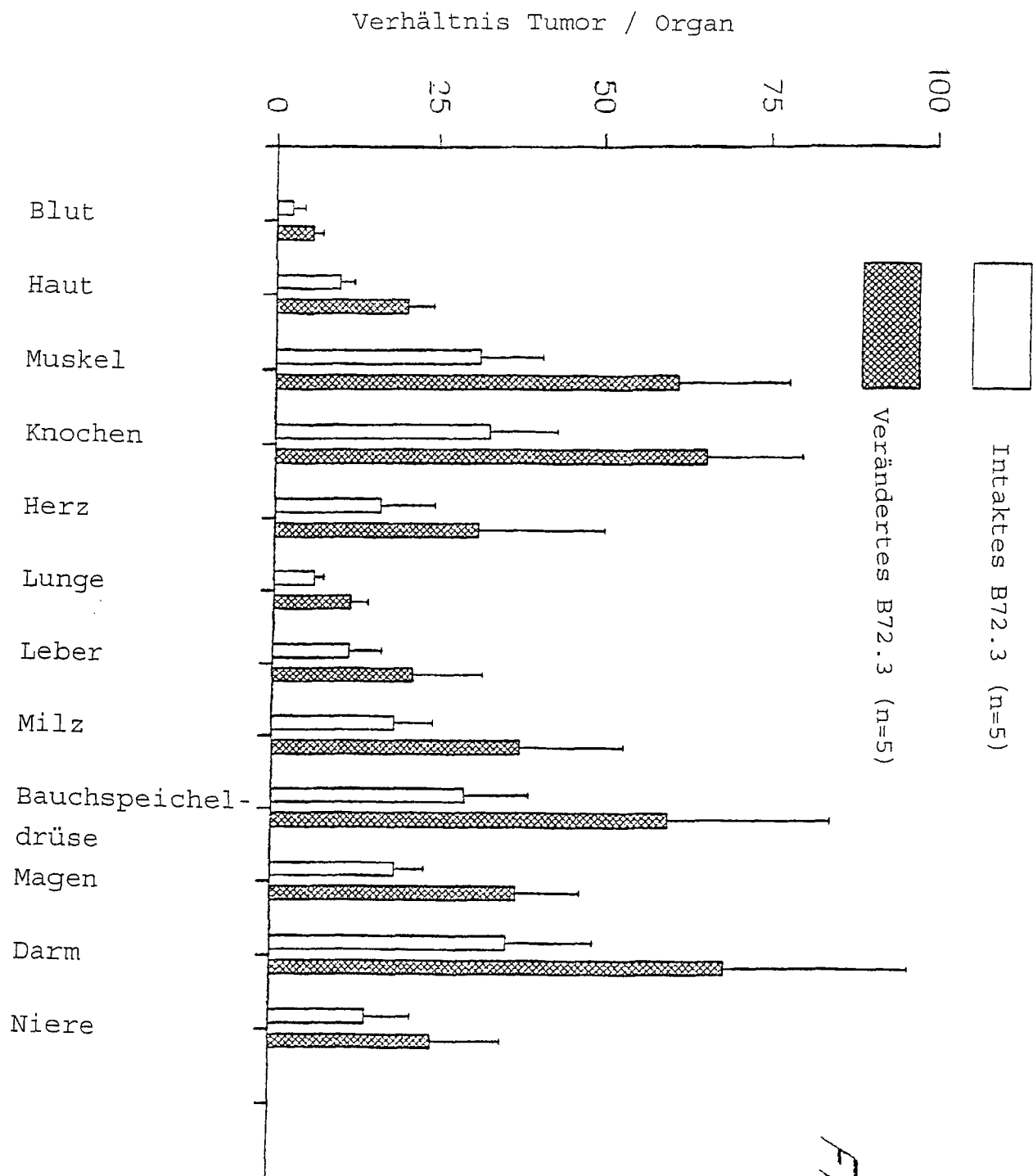
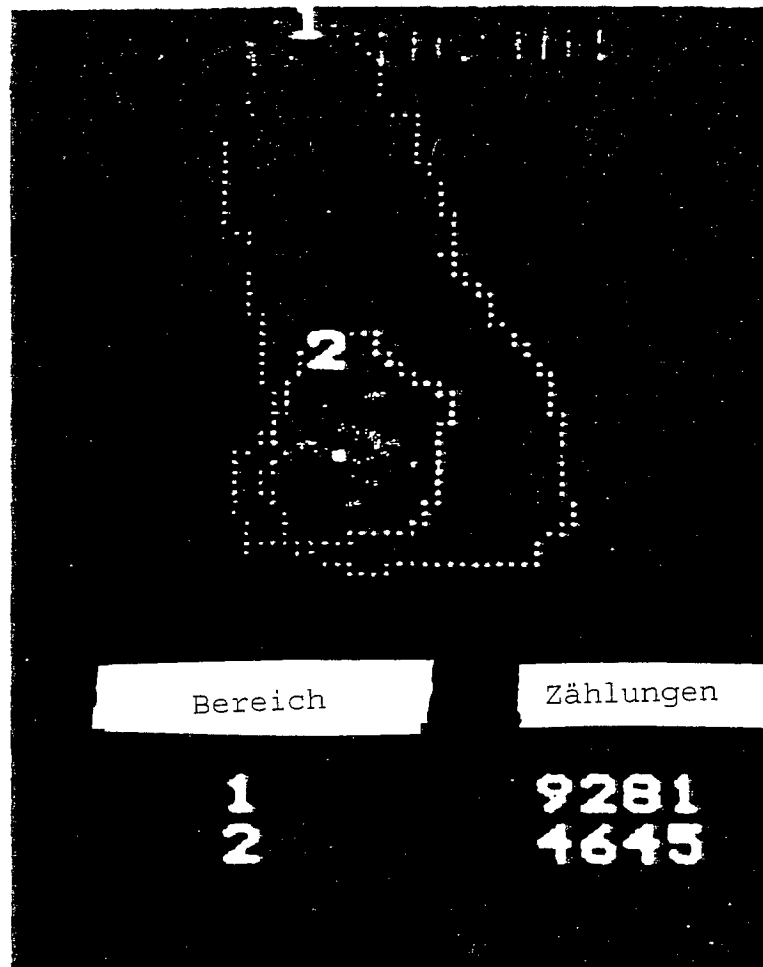


FIG. 13

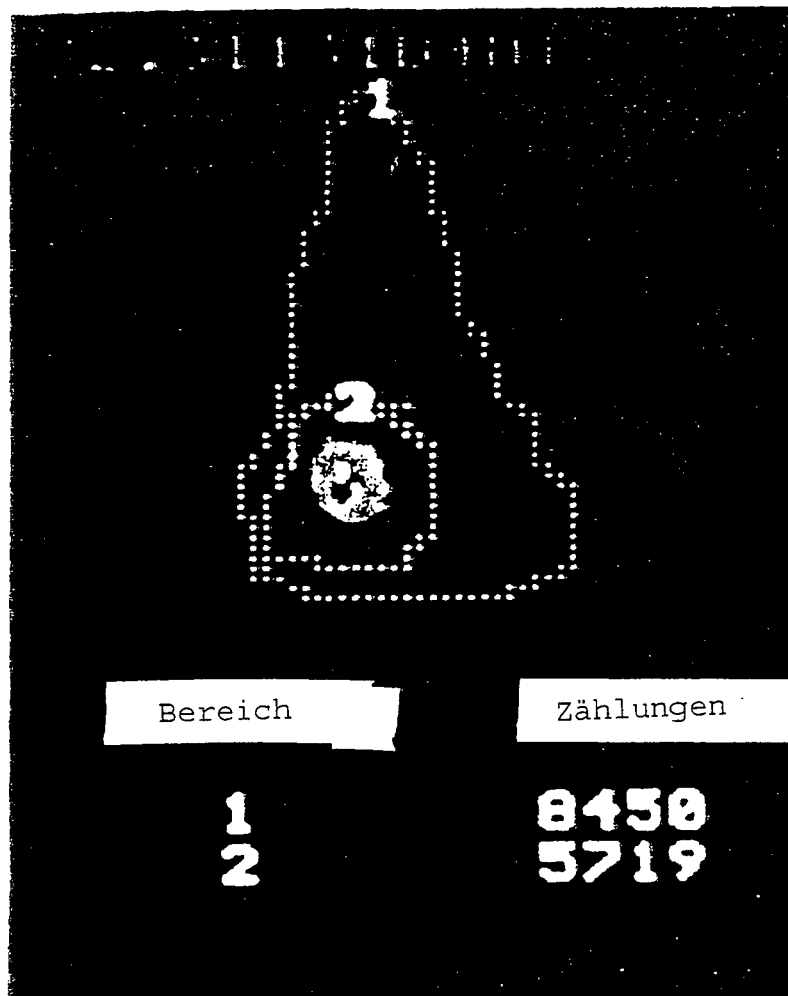
FIG. 14



Bilddarstellung, welche am Tag 1 nach der Injektion von I-131 markiertem verändertem B72.3 erzielt worden ist.

Bereich 1, ganze Maus; Bereich 2, LS174T Tumor

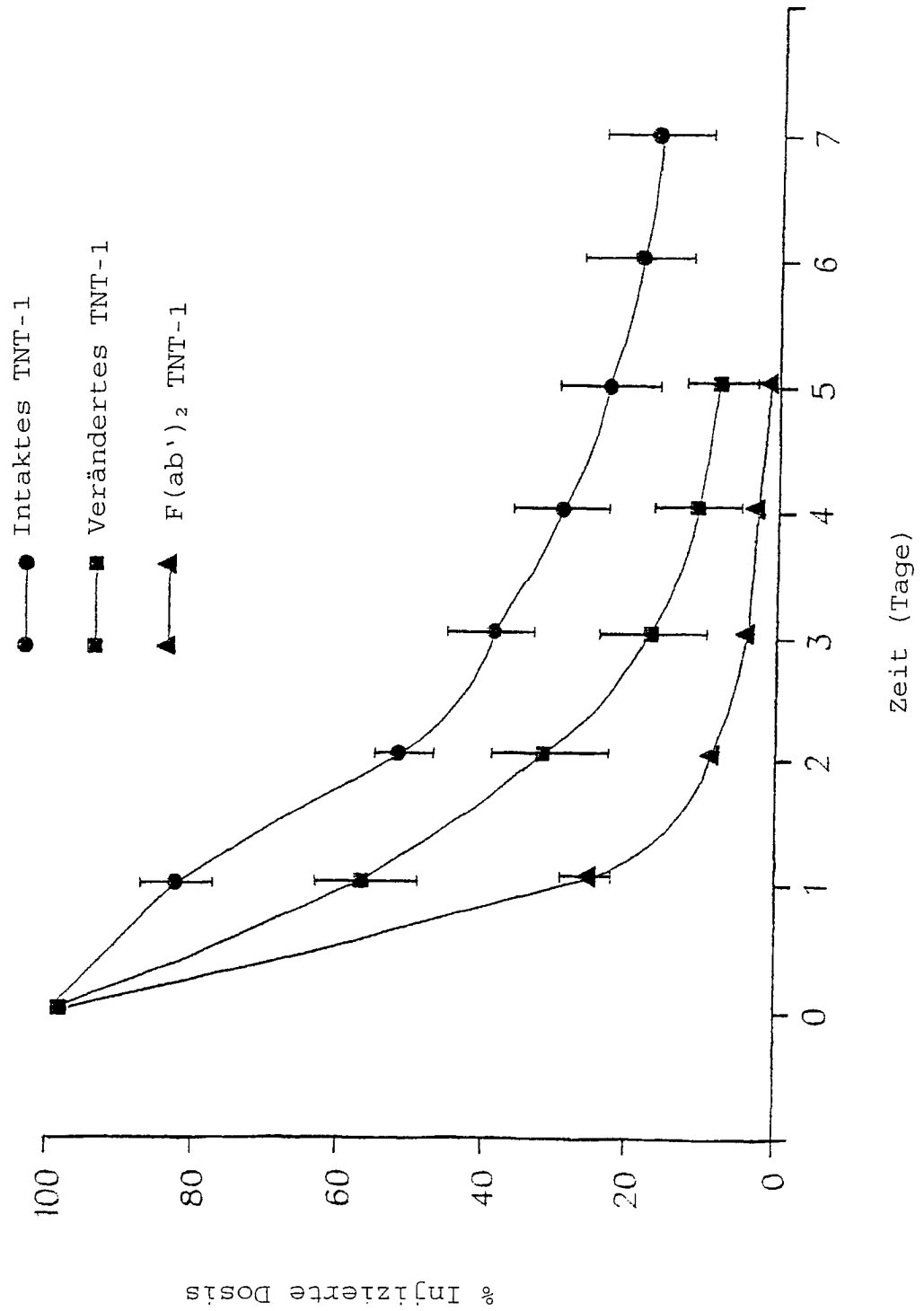
FIG. 15



Bilddarstellung, welche am Tag 4 nach der Injektion von I-131 markiertem verändertem B72.3 erzielt worden ist.

Bereich 1, ganze Maus; Bereich 2, LS174T Tumor

FIG. 16



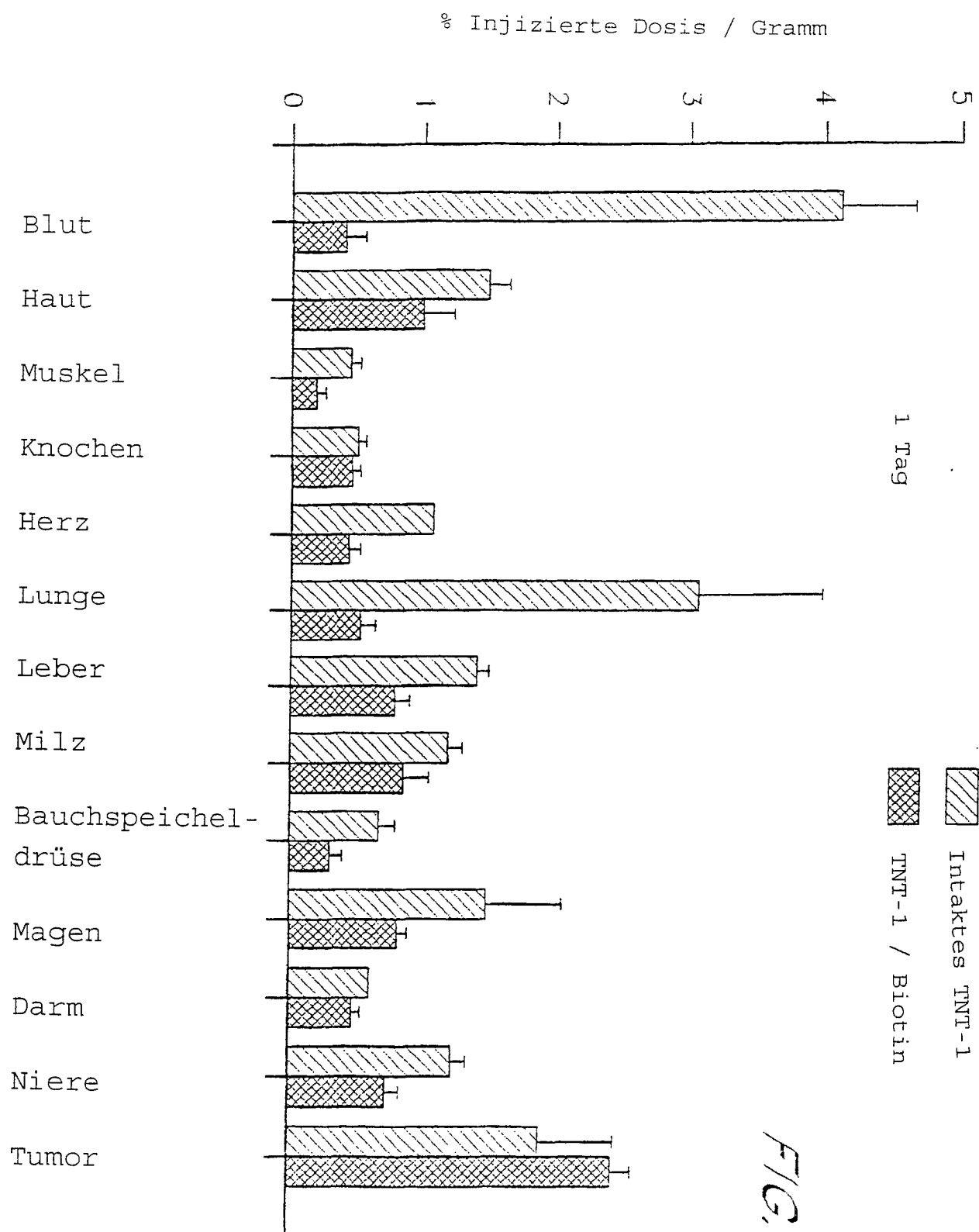


FIG. 17A

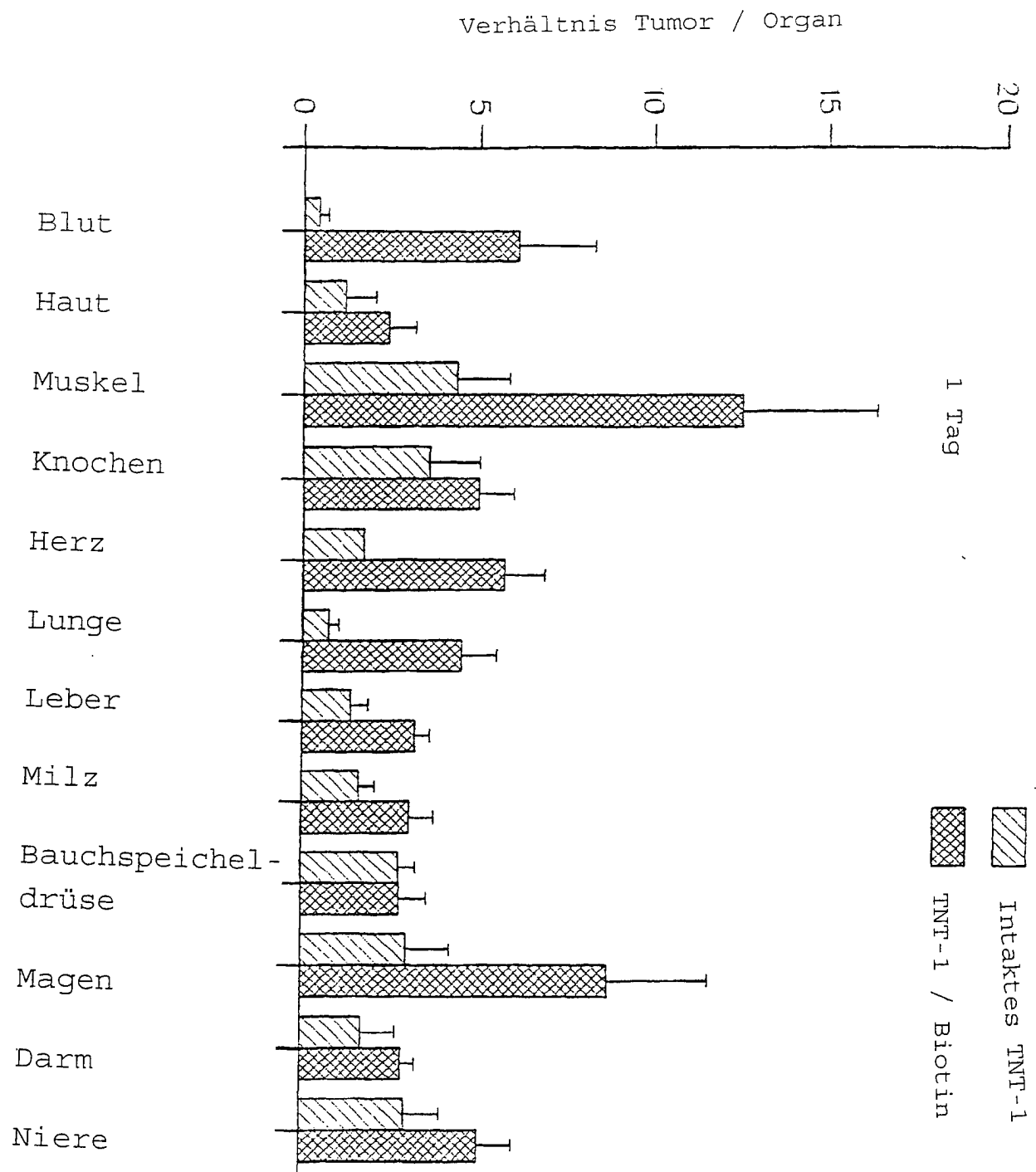
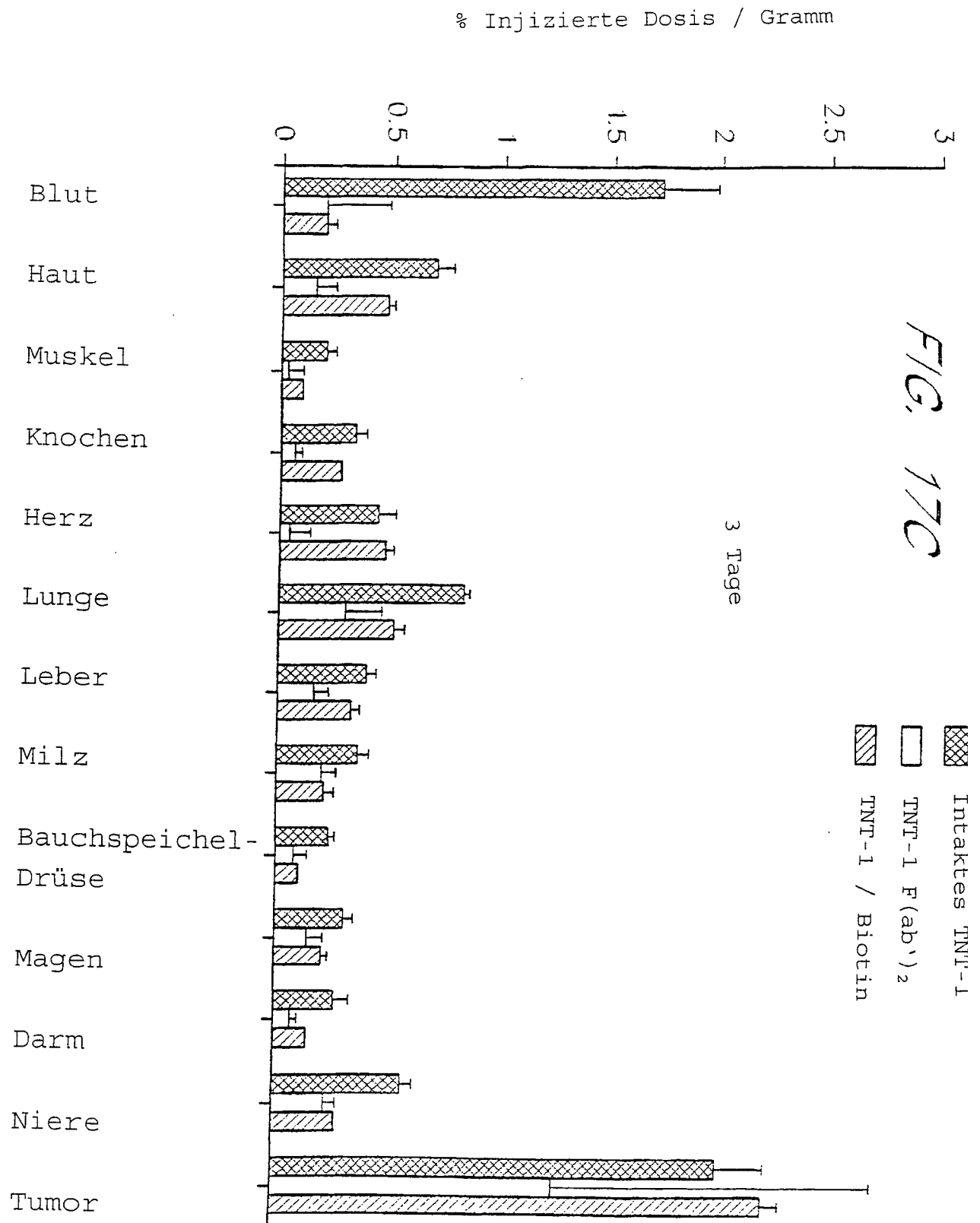


FIG. 17B



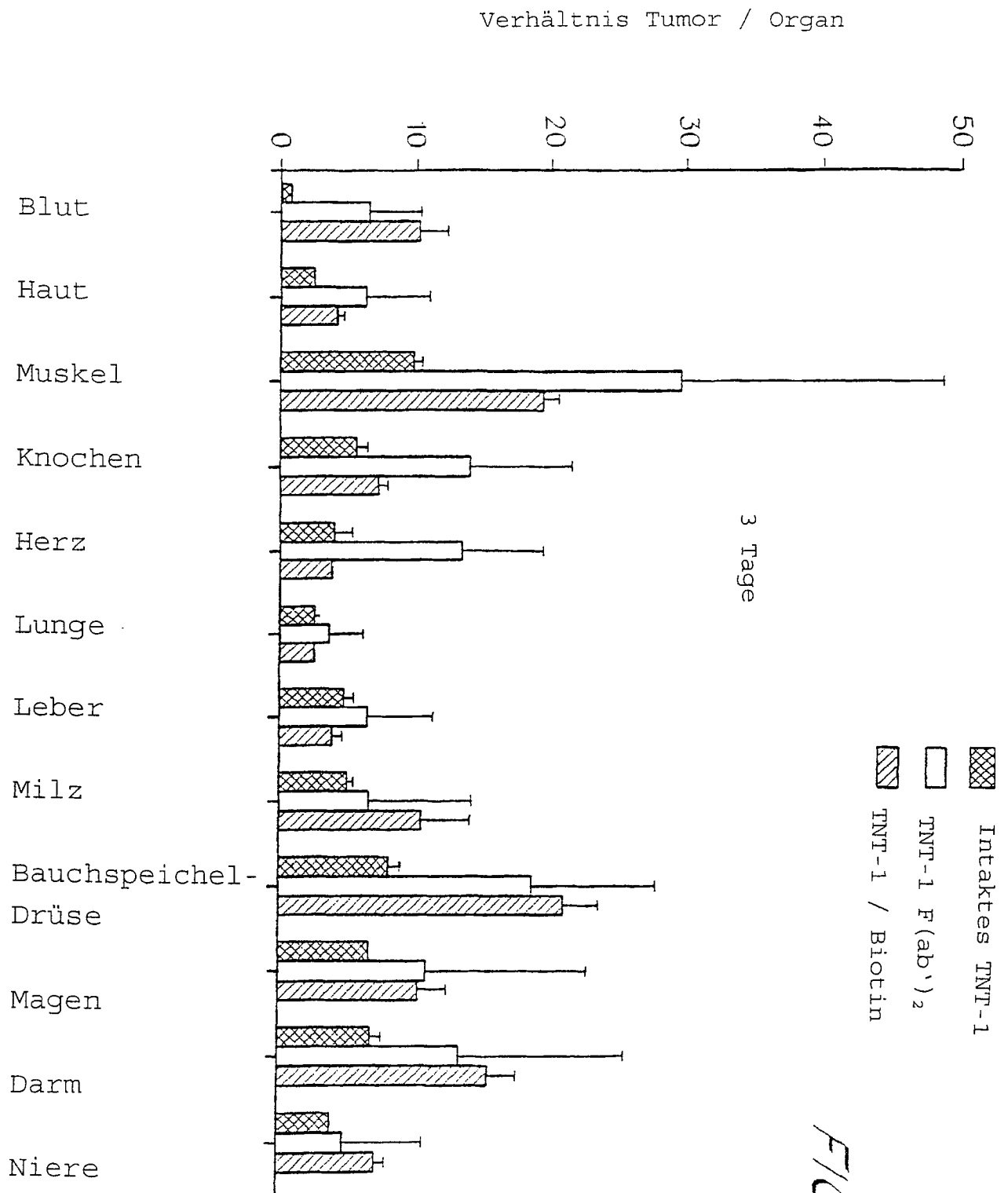
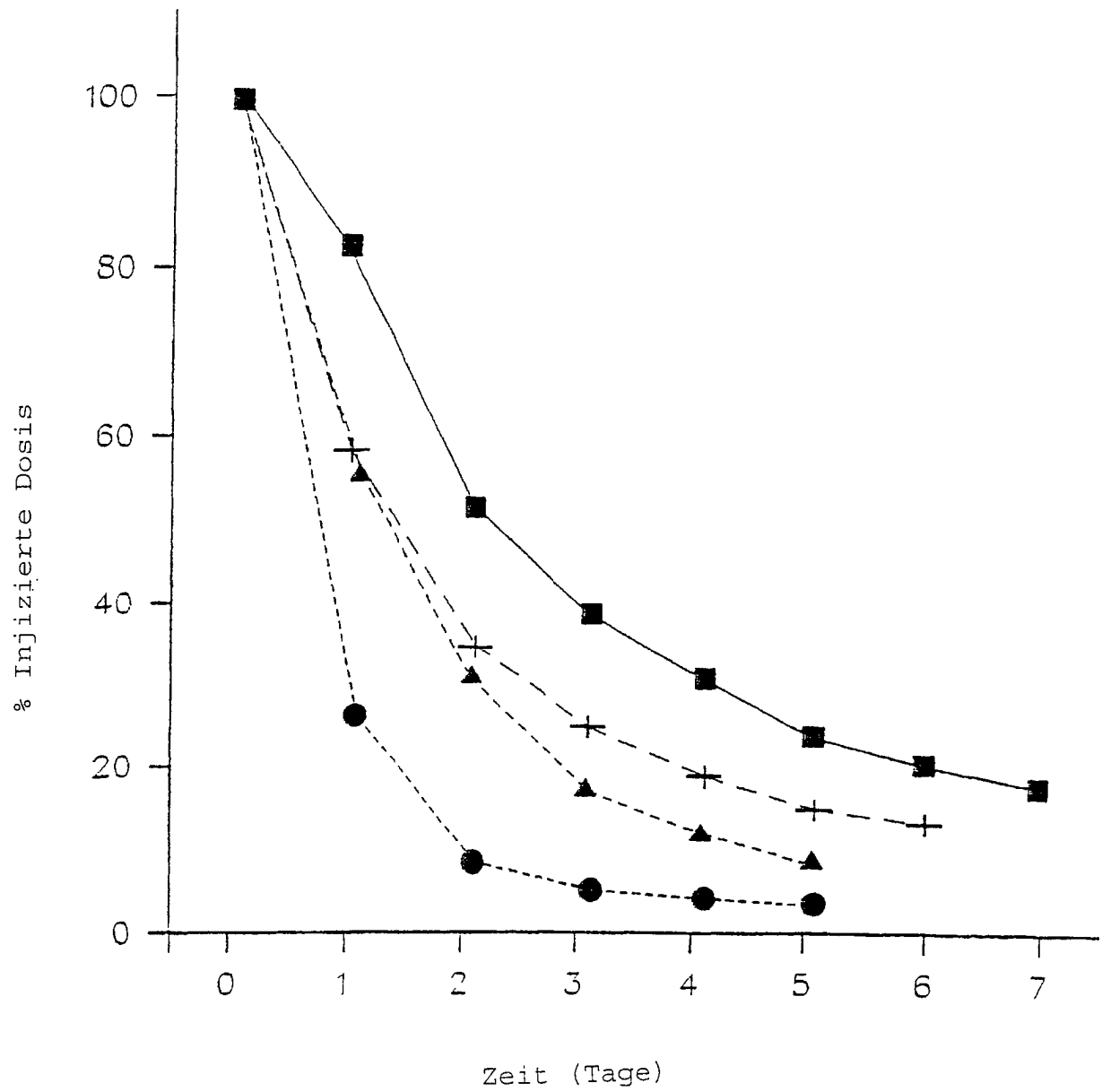


FIG. 17D

*FIG. 18*

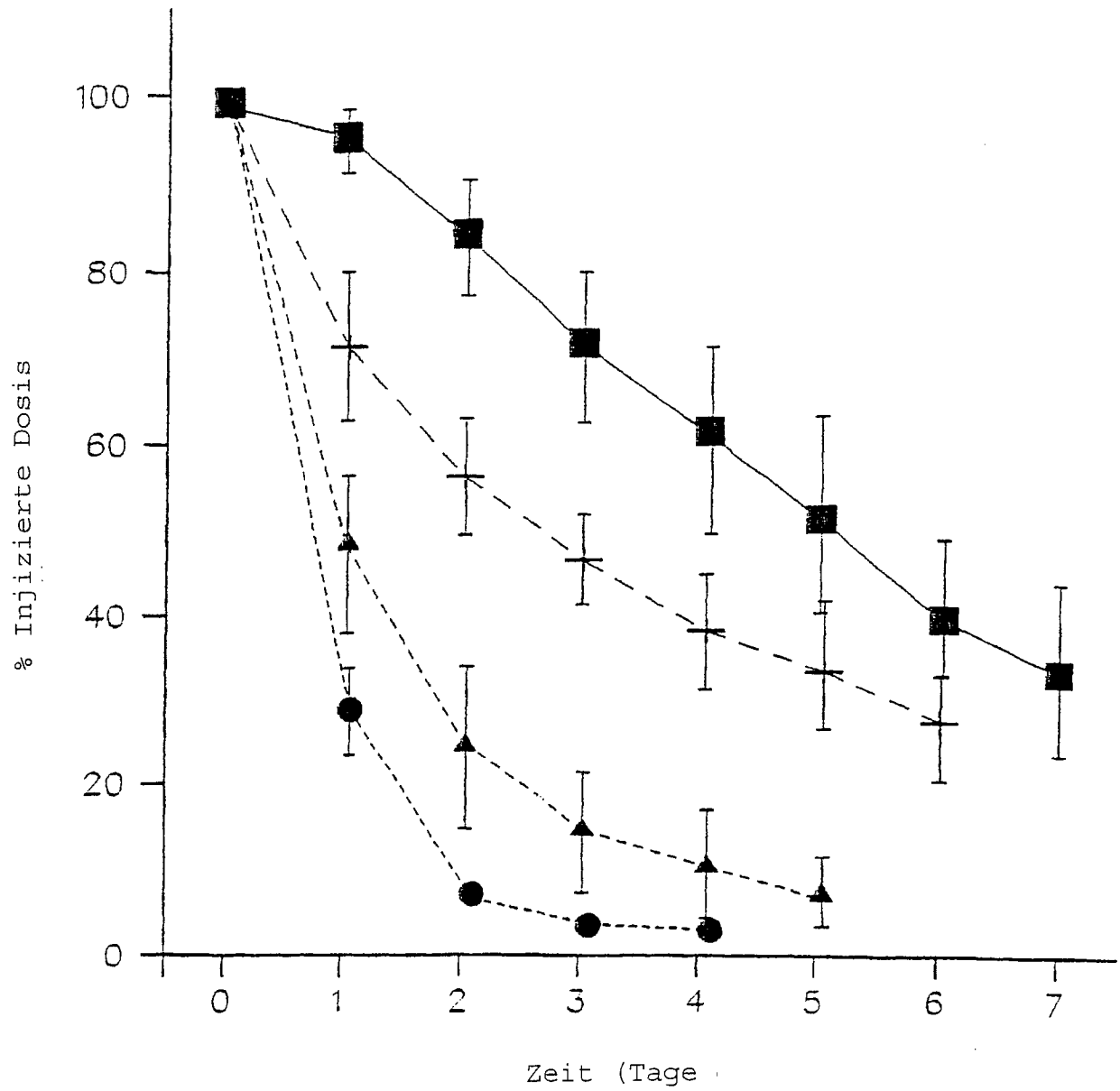


FIG. 19