



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4802/84

(22) Indleveringsdag: 05 okt 1984

(41) Alm. tilgængelig: 07 apr 1985

(44) Fremlagt: 16 sep 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 06 okt 1983 US 539733

(51) Int.Cl.⁵

C 07 K 15/00

C 07 K 15/28

A 61 K 49/00

A 61 K 39/00

(71) Ansøger: The Du *Pont Merck Pharmaceutical Company; Barley Mill Plaza; Wilmington; Delaware 19880, US

(72) Opfinder: Glen Lewis *Tolman; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Sporstofmærkede konjugater af metallothionein eller et fragment deraf og et antistof eller et fragment deraf, fremgangsmåder til deres fremstilling og mellemprodukt til deres fremstilling

(56) Fremdragne publikationer

Konjugaterne kan i modsætning til kendte konjugater fremstilles med mange forskellige metalkationer og har desuden den fordel, at aktiviteten af de biologiske aktive molekyler ikke nedsættes ved konjugation.

(57) Sammendrag:

4802-84

Konjugater af målsøgende, biologisk aktive molekyler, f.eks. antistoffer, og metallothionein, hvori en del af eller alt metallet i metallothioneinet er egnet til diagnostisk eller terapeutisk anvendelse, fremstilles ved, at

a) et metallothionein eller fragment deraf omsættes med et salt eller saltkompleks af et spormærkningsmetal, der har tilstrækkelig affinitet til metallothioneinet eller fragmentet til, at det bindes dertil, hvorved spormærkningsmetallet erstatter i det mindste en del af metallet i metallothioneinet, hvorefter

b) metallothioneinet konjugeres til det biologisk aktive molekyle, eller ved at

a) et thionein omsættes med et metalsalt eller saltkompleks, hvori i det mindste en del af metallet er et spormærkningsmetal, hvorved thionein omdannes til et metallothionein indeholdende i det mindste en del spormærkningsmetal, hvorefter

b) metallothioneinet konjugeres til det biologisk aktive molekyle.

Den foreliggende opfindelse angår sporstofmærkede konjugater af metallothionein eller et fragment deraf og et antistof eller et fragment deraf, fremgangsmåder til deres fremstilling og mellemprodukter til deres fremstilling.

5 Anvendelsen af radioaktivt mærkede, målsøgende, biologisk aktive molekyler, der lokaliseres selektivt i visse organer, væv eller celler hos et pattedyr, (i det følgende betegnet BAM), især antistoffer og andre proteiner, til diagnostiske og terapeutiske formål er et særdeles aktivt
10 område. Vedrørende en diskussion af sådan radioaktiv mærkning se Eckelman et al., "Radiolabelling of Antibodies", Cancer Research, 40, 3036-3042 (1980), og Sfakianakis et al., "Radioimmunodiagnosis and Radioimmunotherapy", J. Nucl. Med. 23, 840-850 (1982). Den mest udbredt an-
15 vendte metode til radioaktiv mærkning af antistoffer har været direkte iodering med I-131, I-125 eller I-123. Imidlertid har disse radionuklider visse dosimetriske og billed- dannelsesmæssige ulemper. Visse metalliske radionuklider, såsom Tc-99m og In-111, er mere egnede til scintigrafisk
20 billeddannelse. Imidlertid har det hidtil været vanskeligt at binde disse metalliske radionuklider direkte til de fleste BAM, da der generelt er utilstrækkelig affinitet mellem radionuklidet og BAM. I nogle tilfælde, hvor en sådan binding har været mulig, medfører bindingen af radionuklidet
25 endvidere undertiden delvist eller fuldstændigt tab af den biologiske aktivitet af BAM

Af disse grunde er det af mange blevet foreslået af radiomærke BAM med metalliske radionuklider ved covalent konjugation under anvendelse af et metalchelateringsmiddel.
30 For eksempel beskriver Khaw et al., Science 209, 295-297 (1980), antistoffer mod hjerte-myosin, der er mærket med In-111-diethylen-triamin-pentaeddikesyre (DTPA), og anvendelse af de mærkede antistoffer til billeddannelse ved myocardiinfarkter. Krejcarek et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 77,
35 581-585 (1977), beskriver anvendelse af DTPA til mærkning af proteiner som humant serumalbumin (HSA) med metal-radio-

nuklider. Pritchard et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151, 297-302 (1976), beskriver konjugering af antistoffer til forskellige midler, der kan chelatere In-111, såsom transferrin, D-penicillamin og deferoxamin. Yokoyama et al., EP-patentansøgning nr. 35.765, offentliggjort i 1981, beskriver deferoxamin som et bifunktionelt chelateringsmiddel til radiomærkning af forskellige BAM, herunder proteiner (f.eks. HSA, urokinase, fibronogen), antibiotika (f.eks. bleomycin, kanamycin), hormoner, saccharider og fedtsyrer.

5

Haber et al., EP-patentansøgning nr. 38.546, offentliggjort i 1981, beskriver DPTA, ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA) og ethylendiamin som bifunktionelle chelateringsmidler til radiomærkning af proteiner, herunder antistoffer, antigener og antistoffragmenter. Yokoyama et al., US-patentskrift nr. 4.287.362, udstedt i 1981, beskriver 3-carboxy-2-oxopropionaldehyd-bis(N-methylthiosemicarbazon) (OPBMT) og analoge som bifunktionelle chelateringsmidler til radiomærkning af proteiner. Sundberg et al., US-patentskrift nr. 3.994.966, udstedt i 1976, Meares et al., US-patentskrift nr. 4.043.998 og Leung et al., Int. J. App. Radiation and Isotopes 29, 687-692 (1978), beskriver bifunktionelle EDTA-analoge som 1-(p-benzendiazonium)-EDTA og 1-p-aminophenyl-EDTA til proteinmærkning. Paik et al., J. Radioanal. Chem. 57, 553-564 (1980), beskriver et azoderivat af DPTA kaldet DTTA-azo-imidat som et bifunktionelt chelateringsmiddel og dets anvendelse til mærkning af HSA med In-111. Hver af de hidtil beskrevne bifunktionelle chelateringsmidler er imidlertid generelt blevet udformet til at koordinere et specifikt metallisk radionuklid. Det ville derfor være ønskeligt at udvikle et chelateringsmiddel, der er i stand til at koordinere forskellige metalkationer og i stand til konjugation med BAM under bibeholdelse af den biologiske aktivitet af BAM.

10

15

20

25

30

Endvidere er gængse intravaskulære radiografiske kontrastmidler baseret på ioderede aromatiske forbindelser. Disse forbindelser viser sig imidlertid ofte ikke at være

35

fysiologisk acceptable i anvendelige koncentrationer. Derfor ville det være ønskeligt at udvikle fysiologisk acceptable alternativer til sådanne ioderede forbindelser.

Også inden for NMR-billeddannelsesområdet, hvor der
5 sker en hurtig udvikling, ville anvendelige kontrastmidler
være værdifulde, især hvis de er i stand i konjugation med
BAM. Brasch (Radiology 147, 781-788 (1983)) anfører i sin
gennemgang af metoder til forbedring af kontrasten ved
NMR-billeddannelse blandt kriterierne for det "ideelle"
10 kontrastforbedrende middel, at forbindelsen bør have en
stærk NMR-aktivitet ved lave koncentrationer, være ikke-reaktiv
in vivo og være ugiftig i diagnostiske doser.

Ifølge den foreliggende opfindelse anvendes metallo-
thionein som bærer for spor-mærknings-metal ved mærkning af
15 BAM. Ud over det store udvalg af metaller, som metallothio-
nein vil koordinere, har det den fordel, at det binder så
mange som 10 gramatomer metal pr. molekyle. Derfor vil metal-
lothionein binde et stort udvalg af spormærkningsmetaller
og giver mulighed for at inkorporere fra 1 til 10 mol metal
20 pr. mol bifunktionelt chelateringsmiddel. Overraskende sætter
konjugation af metallothionein til BAM ikke den biologiske
aktivitet af BAM på spil.

Opfindelsen angår således konjugater af et antistof
eller et fragment deraf og metallothionein eller metallo-
25 thioneinfragmenter, hvori i det mindste en del af metallet
i metallothioneinet eller fragmentet er et spormærkningsmetal
med tilstrækkelig affinitet til metallothioneinet eller
metallothioneinfragmentet til at blive bundet dertil. Sådant
spormærkningsmetal vælges fortrinsvis blandt In, Pb, Tc,
30 Ru, Hg, Ag, Au, Pd, Cu, Re, Sb, Bi, Ga, Pt, W, Co, Ni, Rh
og Os.

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstil-
ling af konjugaterne ifølge opfindelsen, hvilken fremgangs-
måde er ejendommelig ved, at

35 a) et metallothionein eller fragment deraf omsættes
med et salt eller saltkompleks af et spormærkningsmetal,

der har tilstrækkelig affinitet til metallothioneinet eller fragmentet til, at der bindes dertil, hvorved spormærkningsmetallet erstatter i det mindste en del af metallet i metallothioneinet, hvorefter

- 5 b) metallothioneinet konjugeres til antistoffet eller fragmentet deraf.

Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af konjugaterne ifølge opfindelsen, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at

- 10 a) et thionein omsættes med et metalsalt eller saltkompleks, hvori i det mindste en del af metallet er et spormærkningsmetal, hvorved thionein omdannes til et metallothionein indeholdende i det mindste en del spormærkningsmetal, hvorefter

- 15 b) metallothioneinet konjugeres til antistoffet eller fragmentet deraf.

Opfindelsen angår endelig også et mellemprodukt til brug ved en fremgangsmåde til fremstilling af konjugater ifølge opfindelsen, hvilket mellemprodukt er ejendommeligt
20 ved, at det består af et konjugat af et antistof eller et fragment deraf og et metallothionein eller metallothioneinfragment, hvori alt metallet i metallothioneinet eller fragmentet

- a) er ikke-radioaktivt og
25 b) har en mindre affinitet til metallothionein end kationer valgt blandt Tc, Ag, Au, Hg og Cu(II).

Mellemproduktet ifølge opfindelsen er anvendeligt til fremstilling af de sporstofmærkede konjugater ifølge opfindelsen ved mærkestofudveksling, dvs. ved erstatning af
30 i det mindste en del af ikke-spormærkningsmetallet med en metallisk sporstofmærkning.

0 Metallothioneiner.

Metallothioneiner er beskrevet i Metallothioneins: Proceedings of the First International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-Binding Proteins, Zürich, 17.-22. juli 1978, redigeret af Kagi og Nordberg, Birkhauser Verlag, Basel, 1979 (i det følgende betegnet "Kagi og Nordberg"). Side 46-92 i Kagi og Nordberg er særlig relevant for den foreliggende opfindelse og er sammenfattet i det følgende. Metallothionein blev opdaget i 1957. Det cadmium- og zinkholdige protein blev isoleret fra hestenyre. Hovedsagelig det samme protein blev senere fundet hos kaniner, mennesker, aber, kvæg, får, svin, hunde, hamstere, rotter, mus og sæler. Heste-metallothionein blev karakteriseret som havende en molekylvægt på 6000-7000, et højt metalindhold, et højt cysteindhold, ingen aromatisk aminosyre, optiske træk som metalthiolater (mercaptider) og en fast fordeling af cysteinyl-rester. Det blev tiltrådt af plenum ved The First International Meeting on Metallothioneins, som der er henvist til ovenfor, at proteiner, der ligner hestenyre-metallothionein på flere af disse punkter, kan betegnes "metallothionein" (Kagi og Nordberg, side 48), og dette er den måde, hvorpå udtrykket anvendes i den foreliggende beskrivelse. Naturligvis er metallothioneinfragmenter også anvendelige til den foreliggende opfindelses formål ligesom funktionelt lignende polypeptider med mindst ca. 6 aminosyre-rester.

Generelt er metallothioneiner proteiner med lav molekylvægt, der produceres in vivo og chelaterer et stort udvalg af metalioner med høj affinitet. Den fysiologiske funktion af metallothioneiner er ikke helt klarlagt, men det er generelt accepteret, at de har en funktion ved homøstasis af essentielle metaller og afgiftning af tungmetaller. Metallothioneiner er allestedsnærværende hos højere hvirveldyr, hvirvelløse dyr og eukaryotiske og prokaryotiske mikroorganismer. Udsættelse af mange organismer for metalioner af f.eks. Cd, Hg, Zn eller Cu fremkalder en

0 hurtig syntese fra grunden af metallothioneiner ved forøget
produktion af mRNA for apoprotein-thionein. Molekyler
som cadystin, der produceres af visse mikroorganismer som
reaktion på Cd-injektion, påtænkes derfor også anvendt
ved den foreliggende opfindelse.

5 Alle pattedyr-thioneiner indeholder 60-61 aminosyre-
-rester og kan binde 7 gramatomer divalent eller op til
10 gramatomer monovalent metalion pr. mol. Thioneiner inde-
holder ingen aromatiske rester eller histidinrester, og
20 af aminosyreresterne i pattedyr-thioneiner er cysteiner.
10 Spektroskopiske undersøgelser viser, at thioneinets binding
af metal næsten udelukkende sker via sulfhydrylgrupperne
i cysteinerne.

Da sulfhydrylgrupperne i metallothioneiner er bundet
til metalioner, står de i almindelighed ikke til rådighed
15 som funktionelle grupper til konjugation til BAM, men
andre grupper, såsom -NH_2 , -OH og -COOH står til rådighed
og metallothioneinerne kan således blive konjugeret covalent
til BAM ved anvendelse af reagenser og metoder, der udnytter
disse grupper, som beskrevet mere detaljeret nedenfor.

20 Fuldstændige aminosyresekvenser er blevet bestemt for
flere metallothioneiner. De er anført i Kagi og Nordberg,
side 60, og udvalgte sekvenser er gengivet nedenfor:

25

30

35

0

Tabel IAminosyresekvenser af metallothioneiner (MT)

5

1

10

20

30

40

50

60

Humant MT-2

Ac-MDPNCSCAAGDSCTCAGSCKCKECKTSCCKSCCSCPVGCAKCAQGCICKGASDKCCSCA-OH

10

Heste-MT-1A

Ac-MDPNCSCPTGGSTCAGSCKCKECCRCTSCCKSCCSCPGGCARCAQGCVCCKGASDKCCSCA-OH

Muse-MT-1

15

Ac-MDPNCSCSTGGSTCTTSSCACKDCKTSCCKSCCSCPVGCSKACQGCVCCKGAADKCTCCA-OH

Neurospora-MT

H-GDCGCSGASSCNCGSGCSCSNCGSK-OH

20

Anvendte symboler: A = Alanin

C = Cystein

D = Asparaginsyre

E = Glutaminsyre

G = Glycin ..

25

I = Isoleucin

K = Lysin

L = Leucin

M = Methionin

N = Asparagin

30

P = Prolin

Q = Glutamin

R = Arginin

S = Serin

T = Threonin

35

V = Valin

Ac = Acetyl

H = Fri amino-terminus

OH = Fri carboxyl-terminus.

0

Det ses, at cysteinresterne er fordelt over kæden, og at der er et antal -C-X-C-rester, hvor X betyder en anden aminosyre end cystein. Tabellen omfatter et metallothionein fra *Neurospora crassa* med en meget lavere molekylvægt end pattedyr-metallothioneiner. Som rapporteret på side 55 i Kagi og Nordberg er metallothioneiner med højere molekylvægt (9500-10.000) blevet isoleret fra andre mikroorganismer. Alle disse metallothioneiner er omfattet af den foreliggende opfindelse, selv om pattedyr-metallothioneiner foretrækkes. Til in-vivo-diagnostiske og terapeutiske formål foretrækkes det især at anvende et metallothionein fra samme art som det pattedyr, der behandles.

Metalbindende fragmenter af thionein, f.eks. som rapporteret af Yoshida et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 486-490, og af Kondo et al., Tetrahedron Letters 24, 925-928, kan også anvendes ved den foreliggende opfindelse. Fragmenterne af muse-thionein, der er blevet syntetiseret af Yoshida et al., har følgende aminosyresekvenser, hvori symbolerne har den samme betydning som i Tabel I ovenfor.

20

1. H₂N-K-C-T-C-C-A-OH
2. H₂N-A-C-K-D-C-K-C-T-OH
3. H₂N-S-C-T-C-T-S-S-C-A-OH
4. H₂N-G-C-S-K-C-A-Q-G-C-V-OH
- 25 5. H₂N-G-C-V-K-G-A-A-D-K-C-T-C-A-OH

Metalbundne fragmenter af thioneiner (dvs. metallothioneinfragmenter) som de, der er syntetiseret af Yoshida et al., er egnede til anvendelse ved den foreliggende opfindelse, omend komplette metallothioneiner er foretrukne i øjeblikket.

35

0

Metalliske spormærkestoffer.

Blandt de kendte diagnostiske og terapeutiske radionuklider er følgende anvendelige ved den foreliggende opfindelse (halveringstid angivet i d = dage, h = timer):

5

Tabel II

<u>Diagnostisk radionuklid</u>	<u>Halveringstid</u>
Ruthenium-97	2,9 d
Technetium-99m	6,0 h
10 Kviksølv-197	2,7 d
Gallium-67	77,9 h
Gallium-68	1,1 h
Osmium-191	15 d
Indium-111	2,8 d
15 Indium-113m	1,7 h
Bly-203	52 h

<u>Terapeutisk radionuklid</u>	<u>Halveringstid</u>
Palladium-103	17,0 d
20 Sølv-111	7,5 d
Antimon-119	1,6 d
Guld-198	2,7 d
Kobber-67	2,6 d
Rhenium-188	17,0 h
25 Bismuth-212	1,0 h

De diagnostiske radionuklider er gamma-emittere og/eller positron-emittere, der udsender energier mellem 30 KeV og 1 MeV og har halveringstider på mellem ca. 1 minut og 8 dage. Disse radionuklider er anvendelige i forbindelse med konventionelle radioscintigrafiske billedannelsesmetoder baseret på f.eks. plane, enkeltfoton- eller positron-tomografiske metoder. De terapeutiske radionuklider udsender alfa-, beta- gammastråling, omdannelseselektroner eller Auger-elektroner med energier mellem 100 eV og 2 MeV og er i stand til at dræbe celler in vivo.

35

0

Det vil forstås af en fagmand, at ved de diagnostiske og terapeutiske anvendelser af disse forskellige radionuklider vil de anvendte doser afhænge af mange variable. Ved anvendelse af radionukliderne til billeddannelsesformål skal den anvendte dosis blot være høj nok til, at der fås diagnostisk anvendelige billeder, sædvanligvis i området 0,1-20 mCi/70 kg legemsvægt. Derimod kan der til terapeutiske formål anvendes højere doser, sædvanligvis i området 0,1-500 mCi/70 kg legemsvægt. Naturligvis vil den anvendte dosis i sidste instans afhænge af de fysiske egenskaber af radionuklidet, såsom halveringstiden, strålingstypen, strålingsenergien og det radiomærkede middels farmakokinetiske forhold.

Af de kontrastmidler, der er kendt som værende anvendelige til NMR-billeddannelse, betragtes cobalt, nikkel, kobber og ruthenium som anvendelige ved den foreliggende opfindelse.

Af de kontrastmidler, der er kendt som værende anvendelige til radiografisk billeddannelse, betragtes de metalliske grundstoffer med nr. 72 til 83 som anvendelige ved den foreliggende opfindelse, og bismuth, bly, kviksølv, guld, platin, rhenium og wolfram foretrækkes.

Sporstofmærkning af metallothionein

Der er generelt to procedurer, der kan anvendes til fremstilling af sporstofmærket metallothionein. Den første er direkte mærkning af thionein. Den anden er udvekslingsmærkning af et metallothionein, såsom Zn-metallothionein, ved anvendelse af et ønskeligt metal-spormærkestof.

Den første procedure, dvs. direkte mærkning af thionein med et spormærkestof, ligner den, der er beskrevet af M. Vasak og J. Kagi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6709 (1981). Generelt opløses pattedyr-thionein ved en pH-værdi på 2, og eventuelt foreliggende uopløseligt materiale fjernes ved filtrering. Til denne opløsning af thionein sættes metal-spormærkestoffet og eventuelt ønsket metalkation, som ikke er spormærkestof. Den samlede koncentration af metalkation i form af spormærkestof og

35

0

ikke-spørmærkestof bør være tilstrækkelig til at sikre, at der foreligger mindst 7 divalente eller 10 monovalente metalkationer pr. thionein eller passende kombinationer af divalente og monovalente kationer til at udfylde alle metalbindingssteder på metallothioneinet. På grund af de enestående egenskaber af thionein kan der fremstilles metallothioneiner indeholdende mere end én metalkation. Da det er muligt at udfylde alle thioneinets metalbindende steder med metal-spørmærkestof, kan der fremstilles spormærkede metallothioneiner med meget høj koncentration.

10

Ved anvendelse af et radionuklid som metal-spørmærkestof afhænger koncentrationen af tilsat radionuklid af den specifikke aktivitet, der er nødvendig til den pågældende kliniske anvendelse. Til diagnostiske anvendelser kan forholdet mol radionuklid/mol thionein være så lille som 1 eller mindre. Til terapeutiske anvendelser kan dette forhold være højere. Ikke-radioaktive metalkationer kan tilsættes i tilstrækkelige mængder til at optage de metalbindende steder, der ikke er optaget af radioaktive kationer. Efter tilsætning af radionuklider og eventuelt ikke-radioaktiv metalkation afgasses den fremkomne opløsning omfattende til fjernelse af oxygen og neutraliseres i indifferent atmosfære, indtil pH-værdien er større end 7. Under denne neutralisation folder thioneinet sig omkring radionuklidet og ikke-radioaktive metalkationer til dannels af det ønskede radiomærkede metallothionein. Det mærkede metallothionein kan derefter renses ved konventionelle metoder, såsom dialyse, størrelsesudelukkelse eller ionbytningschromatografi. Indholdet af ikke-radioaktivt metal i det radiomærkede metallothionein kan bestemmes ved atomabsorption, og indholdet af radionuklid kan vurderes ved tælling af det radioaktive henfald. Dette rensede radionuklidmærkede metallothionein kan derefter kobles direkte til et antistof eller fragment deraf ved anvendelse af bifunktionelle koblings- eller tværbindingmidler, der beskrives nedenfor. På grund af den tid, der er nødvendig

20

25

30

35

0

til fremstilling af radionuklidmærket metallothionein og kobling af dette til det ønskede antistof eller fragment deraf, foretrækkes radionuklider som Ru-97 og Hg-197 med halveringstider på mere end 24 timer ved denne direkte mærkningsmetode.

5

Den anden mærkningsprocedure involverer udveksling af alle eller en del af ikke-sporstofmærknings-metalkationerne i metallothionein med spormærkningsmetalkation. Det er nødvendigt for at opnå et godt resultat af denne udvekslingsreaktion, at spormærkningskationen har en højere affinitet til metallothioneinets mercaptider end ikke-spormærkningskationen i det forud dannede metallothionein.

10

Ved anvendelse af radionuklider som metal-spormærkestof har f.eks. zinkkationer lavere affinitet til mercaptiderne i metallothionein end kationer af technetium, kviksølv og sølv. I nærværelse af kationer af technetium-99m, kviksølv-197 eller sølv-111 forskydes Zn(II)-kationerne i Zn-metallothionein (MTh) let til dannelselse af henholdsvis Zn/^{99m}Tc-MTh, Zn/¹⁹⁷Hg-MTh eller Zn/¹¹¹Ag-MTh. Da Zn-MTh let fremstilles ved proceduren ifølge Vasak et al., supra, kan udvekslingsmærkning af Zn-MTh eller et konjugat af Zn-MTh-BAM gennemføres ved at blande Zn-MTh eller Zn-MTh-BAM-konjugat med et opløselig udvekslelig form af et radionuklid, f.eks. ^{99m}Tc-glucoseheptonat, ¹⁹⁷HgCl₂ eller ¹¹¹Ag(NH₃)₂⁺. Efter udvekslingen kan det radiomærkede metallothionein renses ved konventionelle metoder, såsom dialyse, størrelsesudelukkelse eller ionbytningsschromatografi. Udbyttet af udvekslingsmærkningen kan bestemmes ved tælling af det radioaktive henfald og repræsenterer den procentdel af den totale radioaktivitet, der er inkorporeret i metallothioneinet. Cobalt(II)-, nikkel(II)- og zink(II)-kationer danner metallothioneiner, der kan anvendes ved en udvekslingsmærkningsproces, der involverer de i tabel II anførte radionuklider, men zink(II)-kationer er de foretrukne ikke-radioaktive kationer til denne udvekslingsmærkning. Anvendelsen af

20

25

30

35

0 udvekslingsmærkningsproceduren er specielt nyttig, når
der anvendes radionuklider med halveringstider på mindre
end 24 timer, fordi denne udvekslingsmærkning kan gennemføres
på anvendelsesstedet. Som diskuteret nærmere nedenfor
muliggør udvekslingsmærkning af et Zn-MTh-BAM-konjugat
5 med kortlivede radionuklider indføring af radionuklider
umiddelbart før anvendelsen, og derved undgås det ellers
uundgåelige tab af radioaktivitet ved henfald.

Blandt de ovennævnte radionuklider er ^{99m}Tc mest
foretrukket til udvekslingsmærkning ved den foreliggende
10 opfindelse på grund af dets relativt korte halveringstid,
dets lette tilgængelighed fra Mo-99/Tc-99m-generatorer og
de ønskelige fysiske egenskaber af radionuklidet. Radio-
nukliderne Ag-111, Au-198 og Hg-197 er mest foretrukne
til både direkte mærkning af thionein og udvekslingsmærkning
15 på grund af den lethed, hvormed begge mærkningsprocedurer
kan gennemføres. Radionukliderne Ru-97, Pd-103 og Sb-119
anvendes bedst ved direkte thionein-mærkningsprocedurer.

Metoder, der er analoge med dem, der er beskrevet
til radiomærkning af metallothionein, kan anvendes til
20 inkorporering af ikke-radioaktive metalliske spormærke-
stoffer. Blandt dem, der vil være anvendelige til radiografisk
kontrast, dvs. Bi, Rh, Hg, Au, Pt, Re og W, kan kviksølv
og guld inkorporeres i metallothionein ved udvekslingsmær-
kning eller ved direkte konjugation til apoproteinet. Inkor-
porering af de øvrige grundstoffer opnås ved direkte
25 mærkning. Blandt dem, der vil være anvendelige til NMR-
-billeddannelse, dvs. Co, Ni, Cu(II) og Ru, inkorporeres
kobber(II) bedst i metallothionein ved udvekslings-
mærkning, medens cobalt, nikkel og ruthenium inkorporeres
30 ved direkte mærkning.

Antistoffer og fragmenter deraf.

Ved den foreliggende opfindelse anvendes antistoffer (især monoklonale antistoffer) eller Fab-, Fab'- og F(ab')₂-fragmenter af antistoffer, der lokaliseres i bestemte organer, væv eller celler i et pattedyrs krop.

Det har overraskende vist sig, at f.eks. de monoklonale antistoffer anti-THY 1.1 (L.L. Houston, R.C. Nowinski og I.D. Bernstein, J. Immunology 125, 837 (1980) og anti-(humant brystcarcinom B6.2) (D. Colcher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3199 (1981) såvel som andre kan konjugeres til Zn-metallothionein, og at konjugatet kan udvekslingsmærkes med f.eks. Tc-99m uden væsentlig nedsættelse af immunreaktiviteten.

15 Konjugation

Antistoffet eller fragmentet deraf kan konjugeres til metallothioneiner enten før eller efter radiomærkning af metallothioneinet. Det foretrækkes generelt at radiomærke før konjugationen, fordi der kan anvendes strengere betingelser til radiomærkning end til konjugation. Når det ønskes at radiomærke ved udveksling med et kortlivet radionuklid, såsom Tc-99m, umiddelbart før den kliniske anvendelse, foretrækkes imidlertid konjugation før radiomærkning, som eksemplificeret nedenfor.

Pattedyr-metallothioneiner indeholder typisk følgende aminosyrerester, som har funktionelle grupper, via hvilke metallothioneiner kan konjugeres direkte til et antistof eller fragment deraf: cystein, 20 thiolgrupper (-SH); lysin, 8 aminogruupper (-NH₂); asparagin/glutaminsyre, 4 eller 5 carboxylgrupper (-COOH); og serin/threonin, 10 til 14 hydroxylgrupper (-OH). Ikke alle aminosyrerester i metallothionein står til rådighed for konjugation, da nogle deltager i forskellige funktioner i selve metallothioneinet. Cystein-SH-grupperne er involveret i metalbinding og reagerer generelt ikke med reagenser, der er rettet mod thiol, under normale betingelser. Anvendelsen af delvis metalleret metal-

lothionein eller fragmenter af metallothionein muliggør omsætning af SH-grupper, der ikke anvendes til metalbinding. Fjernelse af en del af metallet fra metallothioneinet for at gøre sådanne SH-grupper tilgængelige for direkte konjugation

5 kan gennemføres ved behandling med stærke chelateringsmidler, såsom EDTA eller DPTA. Lysin- og argininresterne er i stort omfang utilgængelige for konjugation, fordi de deltager i elektrostatiske bindinger med de meget negative metalgrupper i metallothioneiner. Omend nogle (1 til 3)

10 af lysinresterne normalt er tilgængelige, fører udsættelse af metallothionein for opløsninger med høj ionstyrke til nedbrydning af elektrostatiske bindinger og medfører en større tilgængelighed af lysin- og argininrester. Carboxyl- og hydroxylgrupperne på overfladen af metallothionein står

15 generelt til rådighed for konjugation til antistof eller -fragment og kan derfor være mest foretrukne til konjugation. Bindingen af antistof eller -fragment til radiomærkede metallothioneiner dannet ved direkte mærkning af thionein eller ikke-radioaktive metallothioneiner til efterfølgende ud-

20 vekslingsmærkning med radionuklider kræver konjugation af de tilgængelige SH-, NH_2 -, -NHC(=NH)NH_2 -, COOH- eller OH-grupper i metallothioneiner til komplementære funktionelle grupper på antistoffet eller fragmentet deraf. Hvis der er tale om et moniklonalt antistof, vil det indeholde de samme

25 funktionelle grupper som metallothionein, dvs. -SH, -NH_2 , -OH, -COOH og -NHC(=NH)NH_2 . Når der er tale om antistoffer eller antistoffragmenter, der ikke indeholder sådanne grupper, kan en af disse grupper inkorporeres syntetisk, således at der kan ske konjugation med metallothionein. Metodologien

30 vil variere stærkt fra et antistof eller antistoffragment til et andet, som det er velkendt for en fagmand, idet der primært skal tages hensyn til bevarelsen af biologisk specificitet og affinitet. Vedrørende en generel diskussion af sådanne syntetiske modifikationer, se Means og Feeney,

35 "Chemical Modification of Proteins", Holden Day, Inc. (1971). Derefter kan metallothionein og antistof eller antistoffrag-

ment konjugeres direkte ved anvendelse af passende reagenser og metoder. Til konjugation af proteiner til metallothionein samt til modifikation af metallothioneiner eller proteiner til konjugation kræves der generelt milde betingelser for at undgå denaturering af metallothioneinet og protein og tab af biologisk aktivitet. pH-værdien ved reaktionen bør være i området ca. 3-11, fortrinsvis 5-9, temperaturen i området 0-60°C, og koncentrationerne af protein hhv. metallothionein i området 10^{-2} til 10^{-6} M, fortrinsvis ca. 10^{-4} M.

10 Det foretrukne opløsningsmiddel er generelt vand, selv om forskellige mængder af opløsningsmidler som dimethylsulfoxid kan tilsættes til opløsning af ikke-polære konjugationsmidler.

Hvis metallothioneinet og antistoffet eller antistoffragmentet ikke indeholder komplementære konjugerende grupper, er det muligt i stedet for syntetisk modifikation af metallothionein og/eller antistoffet eller antistoffragment at anvende tværbindingmidler til at tilvejebringe den ønskede konjugation. Tværbindingmidlet bør indeholde to kemisk forenelige reaktive grupper X og Y, der danner covalente bindinger med funktionelle grupper på metallothioneinet og antistoffet eller fragmentet deraf og er forbundet med en alkyl- og/eller arylkæde, dvs. $X-C_n-Y$, hvor C_n betyder alkyl eller aryl. De reaktive grupper X og Y skal være kemisk forenelige, dvs. de må ikke reagere med hinanden til dannelse af polymere forbindelser. Da metallothionein og de fleste antistoffer og fragmenter deraf indeholder NH_2- , $SH-$ og $OH-$ grupper, er alkylerende og acylerende grupper blandt de foretrukne reaktive grupper for X og Y. De foretrukne alkylerende grupper for X og Y er -halogensyrer, -halogenestere eller -halogenamider, arylhalogenider og maleimider. Tværbinding ved anvendelse af reduktiv alkylering af NH_2 -grupper på metallothioneinet og antistoffet eller fragmentet deraf er også foretrukket. Tværbindingmidler som glutaraldehyd, hvor X og Y er aldehyder, og $n = 3$, har vist sig at være anvendelige til binding af radiomærkede metallothioneiner

til monoklonale antistoffer ved reduktiv alkylering af sådanne NH_2 -grupper. Foretrukne acylerende midler for X og Y omfatter aktiverede carboxylfunktionaliteter, såsom chlorider og anhydrider, imidoestere, thiolester og N-hydroxysuccinimidestere. I almindelighed foretrækkes acylering af amin snarere end hydroxyl, da amider er kendt for at være mere stabile in vivo end estere.

De foretrukne grupper for X og Y ved dannelsen af covalente bindinger med $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ -grupper omfatter 1,2- og 1,3-dicarbonylforbindelser som malondialdehyd, cyclohexan-1,2-dion og campherquinon. Reaktionen af argininrester med disse reagenser er meget selektiv og er reversibel.

Den foretrukne gruppe for X og Y ved anvendelse af carboxygrupper i metallothionein og antistof eller antistoffragment til tværbinding er amingruppen. Efter aktivering med et vandopløseligt carbodiimid, såsom 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl)-carbodiimid eller 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid, vil den aktiverede carboxylgruppe i metallothionein eller antistof eller antistoffragment reagere med X og/eller $\text{Y} = \text{NH}_2$ i et tværbindingmiddel til dannelsen af en amidbinding. Reaktionen af sådanne carboxylgrupper i metallothionein og antistof eller antistoffragment med tværbindingmidler indeholdende aminogru-
per er en foretrukket metode til binding af metallothionein til antistof eller antistoffragment.

Generelt kan carbonkæden, der adskiller X og Y, være enten alkyl eller aryl med $n = 1-12$. Valget af kædelængde afhænger af naturen af det antistof eller antistoffragment, der bindes. Med store antistoffer eller antistoffragmenter kan en længere kæde være nødvendig for at muliggøre en optimal covalent bindingsdannelse mellem tværbindingmidlet bundet til metallothionein og de funktionelle mål-grupper på det store protein. Med små antistoffer eller antistoffragmenter kan en meget lang carbonkæde være nødvendig for at muliggøre, at antistoffet eller antistoffragmentet bundet

til metallothioneinet kan vekselvirke med sin celleoverfladereceptor. Kædelængden kan således varieres til enten optimering af tværbindingprocessen eller til maksimering af bevarelsen af biologisk aktivitet af metallothionein-
5 -antistof(fragment)-konjugatet.

Nogle kommercielt tilgængelige tværbindingmidler foretrækkes til binding af metallothioneiner til monoklonale antistoffer. Eksempler på foretrukne tværbindingmidler omfatter glutaraldehyd, N-(2-chlorethyl)-maleimid, disuccinimidyl-tartrat, succinimidyl-4-p-maleimidophenyl)-butyrat,
10 2-iminothiolan og dimethyl-adipimidat.

De spormærkede konjugater ifølge opfindelsen anvendes på samme måde som kendte spormærkede antistoffer eller antistoffragmenter. De kan frysetørres til oplagring og forsendelse, og derefter rekonstrueres i normal fysiologisk saltopløsning og injiceres intravenøst til diagnostisk billeddannelse eller terapi, eller de kan fremstilles umiddelbart før anvendelsen ved udvekslingsmærkning. De kan også anvendes
15 til in vitro-bestemmelser og kliniske diagnostiske metoder på samme måde som kendte spormærkede forbindelser.
20

Eksempel 1

Fremstilling af kviksølv-203-mærket metallothionein ud fra
25 thionein.

Thionein fås ud fra kaninlever ved metoden ifølge M. Vasak et al., Biochemistry 20, 2852 (1981). Dette thionein (3-5 mg) opløses i 1 ml metalfri 0,1N saltsyre og filtreres til fjernelse af eventuelt uopløst materiale. Koncentrationen
30 af det fremkomne thionein bestemmes spektrofotometrisk, idet der til beregning anvendes en absorptionskoefficient ved 220 nm på $7,9 \text{ mg}^{-1} \text{ ml/cm}^{-1}$. Til en opløsning af dette thionein (0,5 mg/ml) sættes 0,76 mCi af $^{203}\text{HgCl}_2$ (specifik aktivitet = $8,76 \times 10^2 \text{ mCi/mmol}$). Den fremkomne thionein/ $^{203}\text{HgCl}_2$ -opløsning afgasses grundigt til fjernelse af oxygen
35 ved skiftevis frysning og optøning af blandingen i vakuum.

0 Under en argonatmosfære neutraliseres thionein/ $^{203}\text{HgCl}_2$
 med metalfri 0,5M tris(hydroxymethyl)aminomethan-puffer
 (tris-puffer) til en pH-værdi større end 7. Det fremkomne
 ^{203}Hg -MT vurderes ved størrelsesudelukkelses-HPLC under
 5 anvendelse af en I-60-gelfiltreringssøjle (fra Waters assoc.,
 Inc. Milford, Mass.), idet der elueres med 0,025 M phosphat-
 puffer (pH-værdi 7,0) med 2,0 ml/min. Efter chromatografering
 er 98% af den tilsatte ^{203}Hg -radioaktivitet tilbage i ^{203}Hg -MT.
 Da der ikke er nogen isotopeffekt med hensyn til metallo-
 10 thioneinpræpareringen, vil erstatning med $^{197}\text{HgCl}_2$ give
 sammenlignelige resultater.

Eksempel 2

15 Fremstilling af $\text{Zn}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -metallothionein ved udvekslingsmærk-
 ning af Zn -metallothionein.

Zn-metallothionein fremstilles ved metoden ifølge
 M. Vasak og J. Kagi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6709
 (1981), ved anvendelse af ikke-radioaktivt $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ og
 20 dialyseres ved anvendelse af "Spectra Por 6"-dialyserør
 (afskæring ved en molekylvægt på 2000) fra Spectrum
 Medical Instruments, Inc., Los Angeles, Calif., med
 0,01M phosphatpuffer (pH-værdi 6,5). Til 0,5 mg Zn-
 -metallothionein (1,0 ml, 10^{-4}M) sættes 9,7 mCi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -
 "Glucoscan"
 25 (New England Nuclear Corp.), der fremstilles ved tilsætning af
 48,7 mCi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetat i 0,5 ml fysiologisk saltopløsning,
 der fås fra det oxidantfrie eluat fra en $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -radionuklid-
 generator. Den fremkomne udvekslingsblanding rystes og inku-
 beres i 30 minutter. Det udvekslingsmærkede $\text{Zn}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -metallo-
 30 thionein renses ved størrelsesudelukkelses-HPLC som i
 eksempel 1. Efter rensningen er 88% af technetium-99m-akti-
 viteten, som er sat til Zn-metallothioneinet, tilbage i
 $\text{Zn}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MT. Idet det antages af technetium-99m er bærer-
 frit, inkorporeres 16 pmol technetium-99m i 0,5 mg Zn-metallo-
 35 thionein.

0 Eksempel 3

Fremstilling af Zn/^{110m}Ag-metallothionein ved udvekslings-
mærkning af Zn-metallothionein.

5 Zn-metallothionein fremstilles som beskrevet i
eksempel 2 og dialyseres ("Spectra Por 6" (afskæring ved en
molekylvægt på 2000)) mod 0,01M fosfatpuffer (pH-værdi
7,0). ^{110m}AgNO₃ i 0,5M HNO₃ fra New England Nuclear Corp.
(specifik aktivitet = 1017 mCi/mmol) neutraliseres til en
10 pH-værdi på 7,0 ved tilsætning af 0,5N NH₄OH. Til 0,5 mg
Zn-metallothionein (0,5 ml, 10⁻⁴M) sættes 50 µCi af
^{110m}Ag(NH₃)₂⁺. Efter 30 minutters inkubering renses
det udvekslingsmærkede Zn/^{110m}Ag-MT ved størrelsesude-
lukkelses-HPLC som i eksempel 1. Efter rensningen er
70% af sølv-110-aktiviteten tilsat som ^{110m}Ag(NH₃)₂⁺
15 tilbage i Zn/^{110m}Ag-MT, dvs. 34 nmol sølv-110m inkorpo-
rerer i 0,5 mg Zn-MT. Da der ikke er nogen isotopeffekt
med hensyn til metallothioneinpræparering, vil erstatning
af ^{110m}Ag(NH₃)₂⁺ med ¹¹¹Ag(NH₃)₂⁺ give sammenlignelige
20 resultater.

20 Eksempel 4

Fremstilling og vurdering af Zn/^{99m}Tc-metallothionein
(MT)/anti-THY 1.1-konjugat.

25 a) Fremstilling af Zn/^{99m}Tc-MT/anti THY 1.1-konjugat
Til Zn-metallothionein (1,0 mg/ml, 10⁻⁴M) i
0,01M fosfatpuffer (pH-værdi 7,0) sættes glutaraldehyd
(1 mg, slutkoncentration 10⁻²M). Efter 1 time ved stuetempe-
ratur fjernes det uomsatte glutaraldehyd ved dialyse
30 ("Spectra Por 6" (afskæring ved en molekylvægt på 2000))
i 6 timer mod 0,01M fosfatpuffer (pH-værdi 7,0). Til
0,5 ml af dette glutaraldehydbehandlede metallothionein
(10⁻⁴M) sættes i 0,5 ml 0,2M hydrogencarbonatpuffer (pH-værdi
9,5) 1 mg af det monoklonale antistof (MAb) anti-THY 1.1.
35 Reaktionen mellem anti-THY 1.1 og glutaraldehydbehandlet
Zn-metallothionein fortsættes ved 4°C og en pH-værdi på 9,3

0 i 18 timer, hvorefter der tilsættes 0,1 ml af en opløsning
 af 0,5M tris/0,1M NaBH₄. Efter reduktion i 1 time ved
 stuetemperatur dialyseres Zn-metallothionein/anti-THY
 1.1-konjugatet i 24 timer ("Spectra Por 6" (afskæring ved en
 5 molekylvægt på 50.000)) mod 0,01M fosfatpuffer (pH-værdi 6,8)
 til fjernelse af uomsat natriumborhydrid og glutaraldehyd-
 behandlet Zn-metallothionein. Til 0,1 mg af dette konjugat
 sættes 3,5 mCi ^{99m}Tc-"Glucoscan" (New England Nuclear Corp.),
 og blandingen inkuberes i 30 minutter. Det udvekslingsmærkede
 Zn/^{99m}Tc-metallothionein/anti-THY 1.1-konjugat renses ved
 10 HPLC under anvendelse af en BioRad "TSK-250"-gelfiltrerings-
 søjle (fra BioRad Corp.), idet der elueres med 0,1M
 fosfatpuffer (pH-værdi 7,0) ved 1,0 ml/min. Efter rensningen
 er 0,53 mCi af ^{99m}Tc tilbage i Zn/^{99m}Tc-MT/anti-THY 1.1-konju-
 gatet (0,1 mg).

15 b) Binding af Zn/^{99m}Tc-MT/anti-THY 1.1-konjugat til
muse-SL1- og -SL2-tumorceller

Reaktiviteten af Zn/^{99m}Tc-MT/anti-THY 1.1-konjugatet
 over for antigen vurderes ved anvendelse af cellebindings-
 -bestemmelsen beskrevet af L.L. Houston, R.C. Nowinski og
 20 I.D. Bernstein (J. Immunol. 125, 837 (1980)), idet AKR/Jackson-
 og AKR/Cumberland-thymocyter erstattes med muse-SL1- og
 -SL2-tumorceller. Tumorcellerne SL1 (THY 1.1. antigen-nega-
 tive) og SL2 (THY 1.1. antigen-positive) (R.C. Nowinski
 et al., Virology 81, 363 (1977)) dyrkes ved 37°C i en
 25 befugtet inkubator med 6% CO₂ i Roswell Park Memorial
 Institute (RPMI) 1640 medium suppleret med 20% hesteserum
 og 20 mM L-glutamin. Gellernes vækst er ca. 3 gange pr.
 dag for SL1 og 5 gange pr. dag for SL2. Tumorcellerne
 til anvendelse ved bestemmelsen isoleres, gensuspenderes
 30 i RPMI 1640 medium og tælles ved anvendelse af standard-
 metoder. Både SL1- og SL2-celler inkuberes med Zn/^{99m}Tc-MT/-
 anti-THY 1.1 (28nCi af konjugat, 5 mCi/mg) eller
 Zn/^{99m}Tc-MT (482 nCi af MT, 395 mCi/mg) i 30 minutter,
 skilles fra ikke-bundet MAb ved centrifugering og vaskes,
 35 og ^{99m}Tc-aktiviteten bestemmes ved tælling. Ca 55% af det
^{99m}Tc-mærkede anti-THY 1.1 er bundet til de antigen-posi-

0 tive SL2-celler, medens lidt eller intet ^{99m}Tc -mærket konju-
 gat er bundet til de antigen-netative SL1-celler. En
 grafisk afbildning af ^{99m}Tc -mærket anti-THY 1.1 mod koncen-
 5 trationen af det undersøgte antigen viser faktisk ingen tegn
 på udfladning ved 55% binding. Der er ringe eller ingen
 binding af ukonjugeret ^{99m}Tc -mærket MT til SL1- og
 SL2-tumorcellerne. Følgelig er bindingen af anti-THY 1.1
 af antigen i det store og helt upåvirket af dets konju-
 gations-MT, og Zn/ ^{99m}Tc -MT/anti-THY 1.1-konjugatet
 10 bibeholder den specificitet for antigen, der observeres
 med anti-THY 1.1. Derfor har tilsætningen af ^{99m}Tc -MT over-
 raskende lille effekt på den biologiske specificitet af
 anti-THY 1.1.

15 Eksempel 5

Fremstilling og vurdering af Zn/ ^{99m}Tc -metallothionein/anti-
 -(humant brystcarcinom B6.2).

a) Fremstilling af Zn/ ^{99m}Tc -metallothionein/B6.2-konjugat.

20 Proceduren beskrevet i eksempel 4 til fremstilling af
 Zn/ ^{99m}Tc -metallothionein/anti-THY 1.1 følges, idet der anven-
 des 0,6 mg Zn-MT ($5 \times 10^{-5}\text{M}$), 1 mg glutaraldehyd og 3 mg
 anti-(humant brystcarcinom B6.2). Efter slutdialyse af
 Zn-MT/B6.2 mod 0,01M phosphatpuffer indeholdende 0,15M
 NaCl (pH-værdi 8,0) i 6 timer og derefter mod 0,01M
 25 phosphatpuffer indeholdende 0,15M NaCl (pH-værdi 7,0) i
 18 timer ("Spectra Por 6" (afskæring ved en molekylvægt
 på 50.000)) udvekslingsmærkes konjugatet (2 mg) ved tilsæt-
 ning af 150 mCi ^{99m}Tc -"Glucoscan" (New England Nuclear Corp.)
 og blanding i 30 minutter. Det ^{99m}Tc -MT-mærkede B6.2
 30 renses ved størrelsesudelukkelses-HPLC under anvendelse
 af en BioRad "TSK-250"-gelfiltreringsøjle, idet der
 elueres med 0,1M phosphatpuffer (pH-værdi 7,0) ved 1,0 ml/-
 min. Efter rensning er der 30 mCi af ^{99m}Tc tilbage i
 35 Zn/ ^{99m}Tc -MT/B6.2-konjugatet.

0 b) Binding af Zn/^{99m}Tc-MT/B6.2 til humane MCF-7-
og A375-tumorceller.

Virksomheden, som konjugation af MT har på evnen af
MAB B6.2 til at binde det antigen, som det er rettet mod,
vurderes ved en cellebindingsbestemmelse, hvorved der anvendes
5 to humane tumorcellelinier, der holdes i vævskultur,
nemlig humant brystcarcinom MCF-7 (H.D. Soule, J. Vasguerz,
A. Long, S. Alberg og M. Brennan, J. Natl. Cancer Inst.
51, 1409-1416 (1973)) og humant melanom A375 (D.J. Giard,
S.A. Aaronson, G.J. Tordaro, P. Arnstein, J.H. Kersey,
10 H. Dosik og W.P. Parks, J. Natl. Cancer Inst. 51, 1417 (1973)).
MCF-7-tumorcellerne har det antigen, som B6.2 bindes til
(D. Colcher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3199 (1981),
medens A375-cellerne ikke har det. De tjener til kontrol
af uspecifik binding af radiomærket B6.2. Tumorcellerne
15 til anvendelse ved bestemmelsen fås ved følgende procedure.
Tre til fire dage efter podning sættes et trypsin/EDTA-reagens
(kat.nr. 610-5300, Gibco Laboratories, Grand Island, New York)
til monolag af tumorceller i stedet for vækstmedium. Efter
omrystning i 1-2 minutter fjernes trypsin/EDTA-blandingen
20 og erstattes med en frisk portion af samme blanding.
Den fremkomne blanding inkuberes ved 37°C i 5-10 minutter
for at sikre fuldstændig frigørelse af cellerne. Cellerne
suspenderes i RPMI 1640-medium indeholdende 1% kvægserum-
albumin (BSA) og tælles ved anvendelse af standardmetoder.
25 MCF-7- og A375-cellerne, der er fremstillet på denne måde,
inkuberes med Zn/^{99m}Tc-MT/B6.2 (0,01665 µCi konjugat,
1,53 mCi/mg) ved 37°C i 2 timer i mikrocentrifugerør
overtrukket med BSA. Efter inkuberingen skilles cellerne
fra ubundet MAB ved centrifugering, vaskes 3 gange med
30 RPMI 1640-medium (+1% BSA), og ^{99m}Tc-aktiviteten bestemmes
ved tælling. Ca 70% af det Tc-mærkede B6.2 bindes til
antigenpositive MCF-7-celler i enkeltcellesuspension,
medens mindre end 5% ^{99m}Tc-aktivitet er knyttet til
A375-kontrolcellerne. Som observeret med anti-THY 1.1 MAB
35 medfører konjugation af MT til B6.2 dannelse af et kompleks,
hvis specificitet for antigenet generelt bibeholdes.

0 c) In-vivo-farmakokinetik af Zn/^{99m}Tc-metallothio-
nein/B6.2.

Det er blevet vist, at radioioderet B6.2 bindes til
humant brystcarcinom indpodet i mus uden thymus in vivo
(D. Colcher, M. Zalutsky, W. Kaplan, D. Kufe, F. Austin og
5 J. Schlom, Cancer Research 43, 736 (1983)). Til be-
stemmelse af den indflydelse, som konjugation af MT
har på evnen af B6.2 til at bindes til humant bryst-
carcinom, vurderes ^{99m}Tc-mærket MT/B6.2 hos mus uden
thymus, der bærer faste Clouser- eller A375-tumorer.
10 Clouser-tumorer (B.C. Giovanella, J.S. Stehlin, L.J. Williams,
S.S. Lee og R.C. Shepart, Cancer 47, 2269 (1978)), der
er B6.2-antigenpositive, og A375-tumorer (D.J. Giard,
S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersy,
H. Dosik og W.P. Parks, J. Natl. Cancer Inst. 51, 1417
15 (1973)), der er B6.2-antigennegative, dyrkes på et subcutant
sted på rygoverfladen af mus uden thymus. Hver mus (17-25 g)
bærende en 200-600 mg's tumor modtager en injektion af
50 μ Ci af Zn/^{99m}Tc-MT/B6.2, og musene aflives på forskellige
tidspunkter (3-4 mus pr. tidspunkt) i løbet af 48 timer.
20 Udvalgte organer fjernes og vejes, og ^{99m}Tc-aktiviteten
bestemmes ved tælling. Procentdelen af den injicerede dosis
pr. g Zn/^{99m}Tc-MT/B6.2, der findes i antigenpositive (ag⁺)
Clousertumorer og uspecifikt antigennegative (ag⁻)
A375-kontroltumorer er anført i tabel III. Det fremgår
25 af resultaterne i tabel III, at Zn/^{99m}Tc-MT/B6.2 bibeholder
evnen af B6.2 til at bindes til humant brystcarcinom in vivo,
især ved 24 timers tidspunktet, hvor forholdet mellem
optagelsen i Clousertumoren og optagelsen i A375-tumoren er
ca. 3:1. I sammenligning med publicerede bio-fordelings-
30 data for radioioderet B6.2 (Colcher et al., supra (1983))
fjernes det ^{99m}Tc-mærkede B6.2 meget hurtigere fra
blodet. Sammenfattende nedsætter konjugation af MT til
B6.2 ikke dets evne til at blive lokaliseret specifikt i
humant brystcarcinom, men fremskynder fjernelsen af det
35 radiomærkede B6.2 fra blodet.

0

Tabel III

 ^{99m}Tc -Metallothionein/B6.2 (% injiceret dosis/g)

Tumor- type	Organ	Tid (Timer)			
		1	6	24	48
Clouser	Tumor	3.37±0.39	7.72±3.38	17.00±4.50	6.18±1.01
	Blod	33.62±2.83	13.58±2.29	7.74±6.04	2.53±0.24
	Milt	13.99±3.36	14.17±3.06	34.66±14.48	5.64±0.49
	Lever	15.72±1.78	14.53±0.97	21.93±4.74	3.61±0.71
	Nyre	18.07±0.91	14.27±2.42	18.54±2.34	3.50±0.59
	Muskel	0.96±0.14	0.86±0.11	2.92±2.00	0.52±0.16
	Lunge	10.25±1.53	4.76±0.68	2.11±0.46	1.17±0.14
A375	Tumor	2.63±1.30	1.98±1.06	5.41±0.47	2.15±0.24
	Blod	31.05±3.80	17.13±1.06	6.49±7.57	6.95±0.08
	Milt	17.43±9.33	9.58±4.05	23.53±10.43	6.25±4.30
	Lever	15.42±6.08	12.94±2.39	16.28±5.87	5.70±0.72
	Nyre	17.06±2.44	13.54±1.52	18.01±2.01	5.95±0.75
	Muskel	1.62±0.92	1.03±0.25	2.31±2.02	0.47±0.66
	Lunge	7.24±0.69	6.14±0.32	3.89±1.38	2.69±0.12

15

20

25

30

35

d) Tumordetektion ved anvendelse af $\text{Zn}/^{99m}\text{Tc}/\text{MT}/\text{B6.2}$.

For at vise, at ^{99m}Tc -mærket B6.2 vil være anvendeligt til påvisning af brystcarcinom, injiceres 200 μCi $\text{Zn}/^{99m}\text{Tc}/\text{MT}/\text{B6.2}$ intravenøst i mus uden thymus, der bærer Clouser- eller A375-tumorer. Der tages et billede af hvert dyr ved anvendelse af et standard-gammakamera med en 5,0 mm hul-kollimator.

Så tidligt som 6 timer efter injektion er der tegn på synlig specifik akkumulering af $\text{Zn}/^{99m}\text{Tc}/\text{MT}/\text{B6.2}$ i Clouser-tumoren (ag^+), medens der ikke er nogen tydelig optagelse i

A375-tumorerne (ag^-). Det eneste andet organ, der viser sig på billedet, er leveren. 24 Timer efter injektion er

Clouser-tumoren klart aftegnet. ^{99m}Tc -tællingen, der observeres i tumoren, viser sig at være den samme som den, der observeres

0

i leveren. Der er også aktivitet i blære og nyre. Derimod er der ingen synlig akkumulering af ^{99m}Tc -mærket B6.2 i A375-tumorer. Disse resultater viser den hurtige og specifikke lokalisering af et ^{99m}Tc -mærket MT/B6.2 i brysttumorb5væv in vivo og den anvendelighed, som ^{99m}Tc -mærket MAb kan have ved diagnosticeringen og bestemmelsen af stadiet af brystcancer hos mennesker.

Eksempel 6

10

Fremstilling og vurdering af $\text{Zn}/^{99m}\text{Tc}$ -metallothionein/anti-humant brystcarcinom B6.2 F(ab')_2 .

a) Fremstilling af $\text{Zn}/^{99m}\text{Tc}$ -MT/B6.2 F(ab')_2 .

En opløsning af pepsin (60 μg , Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) og anti-humant brystcarcinom B6.2 (3 mg) i 3 ml 0,1M natriumacetatpuffer (pH-værdi 4,0) inkuberes ved 37°C natten over. De dannede proteolytiske fragmenter skilles fra B6.2 F(ab')_2 ved dialyse ved 4°C ("Spectra Por 6" med afskæring ved en molekylvægt på 50.000) mod 0,05M natriumphosphatpuffer (pH-værdi 7,0) indeholdende 0,15M natriumchlorid. B6.2 F(ab')_2 analyseres ved størrelsesudelukkelses-HPLC under anvendelse af en BioRad "TSK-250"-søjle, idet der elueres med 0,1M natriumphosphatpuffer (pH-værdi 7,0) ved 1,0 ml/min. og ikke-reducerende SDS-polyacrylamid-gelelektroforese. Efter en 2. dialyse for at bringe B6.2 F(ab')_2 over i 0,2M carbonat/hydrogencarbonat-puffer (pH-værdi 9,5) gennemføres konjugationen med Zn-MT som beskrevet for B6.2 i eksempel 5, idet der anvendes 0,6 mg Zn-MT og 1 mg glutaraldehyd. Det fremkomne Zn-MT/B6.2 F(ab')_2 (1,56 mg) udvekslingsm30ærkes ved tilsætning af 165 mCi ^{99m}Tc -"Glucoscan" (New England Nuclear Corp.) og blanding i 30 minutter. Efter rensning ved størrelsesudelukkelses-HPLC under anvendelse af en BioRad "TSK-250"-gelfiltreringssøjle, idet der elueres med 0,1M phosphatpuffer (pH-værdi 7,0) ved 1,0 ml/min., er 17,6 mCi af ^{99m}Tc tilbage i $\text{Zn}/^{99m}\text{Tc}$ -MT/B6.2 F(ab')_2 .

35

0

b) Binding af Zn/^{99m}Tc-MT/B6.2 F(ab')₂-konjugat.

Virksomheden af konjugation af MT på reaktiviteten af F(ab')₂-dimeren af B6.2 over for antigenet, som B6.2 er rettet mod, vurderes ved anvendelse af cellebindingsbestemmelsen beskrevet i afsnit b, eksempel 5. Zn/^{99m}Tc-MT/B6.2 F(ab')₂-konjugatet (2,29 ng, specifik aktivitet = 11,3 μ Ci/ μ g) inkuberes med forskellige koncentrationer af MCF-7-celler (ag⁺) og A375-celler (ag⁻), og mængden i procent af bundet ^{99m}Tc-mærket konjugat bestemmes. Resultaterne viser, at 70-80% af det ^{99m}Tc-mærkede konjugat bindes til MCF-7-cellerne, medens mindre end 5% bindes til A375-cellerne. Konjugation af Zn-MT til F(ab')₂ af B6.2 nedsætter således ikke dets binding til antigenet eller ændrer dets specificitet for antigenet.

c) In-vivo-farmakokinetik af Zn/^{99m}Tc-MT/B6.2 F(ab')₂.

Evnen af radioioderet B6.2 F(ab')₂ til at bindes til humant brystcarcinom indpodet i mus uden thymus er demonstreret af Colcher et al. (Colcher et al., supra (1983)). Ved anvendelse af Clouser- og A375-tumorbærende mus uden thymus bestemmes specificiteten og farmakokinetikken in vivo af Zn/^{99m}Tc-MT/B6.2 F(ab')₂. Hver tumorbærende mus modtager en injektion med 48,5 μ Ci af ^{99m}Tc-mærket F(ab')₂-konjugat (specifik aktivitet = 6,7 μ Ci/ μ g), og procentdelen af den injicerede dosis pr. g bestemmes på forskellige tidspunkter. Resultaterne er anført i tabel IV. Forholdet mellem optagelsen i Clouser- og A375-tumorer på 24-timers tidspunktet er ca. 2:1, hvilket klart viser bibeholdelsen af tumorspecificiteten af B6.2 F(ab')₂ efter MT-konjugation. Fjernelsen fra blodet af ^{99m}Tc-mærket B6.2 F(ab')₂ er omtrent den samme som den, der er observeret med det ^{99m}Tc-mærkede intakte B6.2. Specificiteten af ^{99m}Tc-mærket B6.2 F(ab')₂ og dets hurtige fjernelse fra blodet viser således, at fragmenter af B6.2 mærket med MT er anvendelige til binding in vivo til tumorer på lignende måde som observeret for Zn/^{99m}Tc-MT/intakt B6.2.

35

0

Tabel IV

 ^{99m}Tc -Metallothionein-B6.2-F(ab')₂ (% injiceret dosis/g)

TUMOR- TYPE	ORGAN	Tid (timer)			
		1	4	16	26
Clouser	Tumor	3.98±0.56	6.45±1.36	6.08±0.68	4.54±0.64
	Blod	32.54±12.95	27.71±3.05	11.47±1.27	7.35±1.36
	Milt	5.71±0.53	6.00±0.58	6.20±0.99	4.81±0.39
	Lever	38.20±5.01*	45.60±13.46	36.09±10.06	53.72**
	Nyre	7.45±1.00*	6.78±1.59	5.89±2.46	2.28**
	Muskel	2.91±2.50	1.84±0.20	1.39±0.47	2.18±1.37
	Hjerte	10.66±3.64	10.38±2.26	4.76±0.76	2.99±0.88
	n=	3	3	3	3
A375	Tumor	2.56±1.30	3.46±1.73	2.97±0.54	2.07 **
	Blod	30.70±5.41	27.63±1.73	10.95±0.64	5.72
	Milt	7.23±0.77	7.22±0.49	6.28±0.79	4.01
	Lever	51.53±10.77	46.96±18.98	33.45±13.10*	9.06
	Nyre	6.60±1.08	8.60±3.23	6.55±0.32*	10.24
	Muskel	1.76±0.49	2.00±0.82	2.29±1.88	0.90
	Hjerte	8.01±1.38	9.37±2.27	3.19±1.66	4.33
	n=	3	3	3	1

15

20

25

*n=2

**n=1

30

35

P A T E N T K R A V.

1. Konjugater af et antistof eller et fragment deraf og metallothionein eller metallothioneinfragment, hvori i det mindste en del af metallet i metallothioneinet eller
5 fragmentet er et spormærkningsmetal med tilstrækkelig affinitet til metallothioneinet eller metallothioneinfragmentet til at blive bundet dertil.
2. Konjugater ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at spormærkningsmetallet er valgt blandt In, Pb, Tc,
10 Ru, Hg, Ag, Au, Pd, Cu, Re, Sb, Bi, Ga, Pt, W, Co, Ni, Rh og Os.
3. Konjugater ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at spormærkningsmetallet er et radionuklid.
4. Konjugater ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t
15 ved, at radionuklidet er valgt blandt Tc-99m, In-111, In-113m, Pb-203, Ru-97, Hg-197, Ag-111, Au-198, Pd-103, Cu-67, Re-188, Sb-119, Bi-212, Ga-67, Ga-68 og Os-191.
5. Konjugater ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at radionuklidet er valgt blandt Tc-99m, Hg-197, Ag-
20 111, Au-198, Pd-103, Cu-67, Re-188, Sb-119 og Ru-97.
6. Konjugater ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at radionuklidet er valgt blandt Tc-99m, Hg-197, Ag-111 og Au-198.
7. Konjugater ifølge et af kravene 1-6, k e n d e -
25 t e g n e t ved, at antistoffet er et monoklonalt antistof.
8. Konjugater ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at det monoklonale antistof er valgt blandt anti-THY 1.1 og anti-humant brystcarcinom B6.2.
9. Konjugater ifølge et af kravene 1-8, k e n d e -
30 t e g n e t ved, at metallothioneinet eller metallothioneinfragmentet er fra et pattedyr.
10. Fremgangsmåde til fremstilling af konjugater ifølge krav 1-9, k e n d e t e g n e t ved, at
 - a) et metallothionein eller fragment deraf omsættes
35 med et salt eller saltkompleks af et spormærkningsmetal, der har tilstrækkelig affinitet til metallothioneinet eller

fragmentet til, at det bindes dertil, hvorved spormærkningsmetallet erstatter i det mindste en del af metallet i metallothioneinet, hvorefter

5 b) metallothioneinet konjugeres til antistoffet eller fragmentet deraf.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 10, k e n d e t e g - n e t ved, at spormærkningsmetallet er et radionuklid.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 10 eller 11, k e n - d e t e g n e t ved, at antistoffet er et monoklonalt anti-
10 stof.

13. Fremgangsmåde ifølge krav 12, k e n d e t e g - n e t ved, at det monoklonale antistof er valgt blandt anti-THY 1.1 og anti-humant brystcarcinom B6.2.

14. Fremgangsmåde ifølge krav 11, k e n d e t e g -
15 n e t ved, at radionuklidet er valgt blandt Tc-99m, Ag-111, Au-198 og Hg-197.

15. Fremgangsmåde til fremstilling af konjugater ifølge krav 1-9, k e n d e t e g n e t ved, at

20 a) et thionein omsættes med et metalsalt eller saltkompleks, hvori i det mindste en del af metallet er et spormærkningsmetal, hvorved thionein omdannes til et metallothionein indeholdende i det mindste en del spormærkningsmetal, hvorefter

25 b) metallothioneinet konjugeres til antistoffet eller fragmentet deraf.

16. Fremgangsmåde ifølge krav 15, k e n d e t e g - n e t ved, at antistoffet er et monoklonalt antistof.

17. Fremgangsmåde ifølge krav 16, k e n d e t e g - n e t ved, at det monoklonale antistof er valgt blandt
30 anti-THY 1.1 og anti-humant brystcarcinom B6.2.

18. Fremgangsmåde ifølge krav 15, 16 eller 17, k e n - d e t e g n e t ved, at spormærkningsmetallet er et radionuklid.

19. Fremgangsmåde ifølge krav 18, k e n d e t e g -
35 n e t ved, at radionuklidet er valgt blandt Ru-97, Pd-103 og Sb-119.

20. Mellemprodukt til brug ved en fremgangsmåde til fremstilling af konjugater ifølge krav 1-9, k e n d e t e g - n e t ved, at det består af et konjugat af et antistof eller et fragment deraf og et metallothionein eller metallothioneinfragment, hvori alt metallet i metallothioneinet eller fragmentet

a) er ikke-radioaktivt og

b) har en mindre affinitet til metallothionein end kationer valgt blandt Tc, Ag, Au, Hg og Cu(II).

21. Mellemprodukt ifølge krav 20, k e n d e t e g - n e t ved, at det ikke-radioaktive metal er Zn.

22. Mellemprodukt ifølge krav 12 eller 13, k e n - d e t e g n e t ved, at antistoffet er et monoklonalt antistof.

23. Mellemprodukt ifølge krav 22, k e n d e t e g - n e t ved, at det monoklonale antistof er valgt blandt anti-THY 1.1 og anti-humant brydtkarcinom B6.2.

24. Mellemprodukt ifølge et af kravene 20-23, k e n - d e t e g n e t ved, at metallothioneinet eller metallothioneinfragmentet er fra et pattedyr.

25. Mellemprodukt ifølge krav 12 eller 13, k e n - d e t e g n e t ved, at metallothioneinet eller metallothioneinfragmentet er fra et pattedyr.