معرفی مشتق جدیدی از بیوتین و DTPA جهت نشاندار ساختن آنتی بادیهای منوکلونال با In^{111} با هدف شناسائی تومورهای سرطانی

دکتر ثریا شاه حسینی[۱]،دکتر غلامرضا فرشیدفر[۲]، دکتر رضا نجفی[۳]

[۱] دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

[۲] دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس

[۳] بخش رادیوایزوتوپ، مرکز تحقیقات هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران

چکیده

آنتی بادیهای منوکلونال که یک دسته از داروهای پروتئینی را تشکیل می‌دهند همراه با رادیوایزوتوپها، نوآوری جدیدی در زمینه تشخیص، تحقیق و درمان بیماری‌ها محسوب می شوند. یکی از محدودیت‌های جدی کاربرد آنتی‌بادی‌های نشاندار درتجربیات درون تنی (in vivo) نسبت کم اکتیویته هدف به زمینه می باشد. بررسی‌ها و تحقیقات زیادی در جهت رفع این مشکل صورت گرفته است. نظریه Tumor pre-targeting که در سال ۱۹۸۹ پیشنهاد شد تا به حال نتایج خوبی را در جهت کاهش جذب زمینه نشان داده است. با توجه به اهمیت روز افزون آنتی بادیهای منوکلونال و رادیوایزوتوپها، در این تحقیق بر اساس نظریه Tumor pre-targeting مشتق جدیدی از بیوتین و DTPA تهیه شد. مشتق جدید DTPA-bio-10X به همراه DTPA-bio با In^{111} نشاندار شدند. ترکیبات نشاندار از طریق سیاهرگ دمی به موشهای Balb/c تزریق شدند. در صد دوز تزریقی در هر گرم خون (%ID/g of blood) در زمانهای ۱۵، ۳۰، ۶۰،۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰ دقیقه بعد از تزریق تعیین شد. نتایج نشان دادند که In^{111}-DTPA-bio به سرعت از گردش خون پاک می شود و زمان کافی برای رسیدن اکتیویته به هدف وجود ندارد. در حالی که در In^{111}-DTPA-bio-10X با اتصال ۱۰ باز آدنین (10X) وزن مولکولی ترکیب افزایش یافته، کلیرانس آهسته تر بوده و به نظر می رسد که متناسب با وزن مولکولی باشد. بنابراین فرصت کافی جهت تجمع ترکیب در هدف و پاک شدن از بافت های سالم وجود دارد. با ظهور نسل دوم آنتی بادیهای منوکلونال و مهندسی آنتی بادی، روش های جدید Tumor pre-targeting ارائه شده است و به نظر میرسد که مشتق جدید بتواند به خوبی در این موارد ایفای نقش کند.

واژگان کلیدی

آنتی بادی منوکلونال (MAb)، دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید(DTPA)، ایندیوم-۱۱۱ (In^{111})، FPLC(Fast Performance Liquid Chromatography).

مقدمه

بعد از معرفی تکنولوژی هیبریدوما توسط Kohler و Milstein در سال ۱۹۷۵ که منجر به تولید آنتی بادیهای منوکلونال شد [۱] کاربردهای بالینی آنتی بادیهای نشاندار شده با مواد رادیواکتیو به سرعت افزایش یافت. رادیو ایمونوسنتی‌گرافی(RIS) که یکی از این کاربردها می‌باشد، در بیش از هزاران مریض انجام شد و ارزش بالینی آن در تشخیص تومورها، تعیین محل عفونت و التهاب، مشکلات قلبی ـ عروقی مثل تشخیص نکروزیز میوکاردیال و ترومبوزیز سمی

مشخص شد [۵-۲]. علاوه بر موارد تشخیصی، آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده با مواد رادیو اکتیو در موارد درمانی (رادیو ایمونوتراپی RIT) هم به کار رفته‌اند [۲و ۳]. در هر حال کاربردهایRIS وRIT با توجه به نسبت پایین اکتیویته هدف به زمینه (target to background ratio) محدود می‌باشد.

موقعی که آنتی‌بادی نشان‌دار شده با مواد رادیو اکتیو درin vivo تجویز می‌شود، آنتی‌بادی به مقدار کم (0.0007-0.01% ID/g tissue) در تومور تجمع می‌یابد و غالب دوز تجویز شده در محل‌های دیگری در بدن مثل خون، کبد، کلیه و سایر بافت‌های طبیعی یافت می‌شود [۸-٦] که باعث افزایش رادیواکتیویته زمینه شده و تشخیص بیماری‌های بدخیم و غیر بدخیم با اشکال مواجه می‌شود و در واقع یکی از مشکلات استفاده از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده با مواد رادیواکتیو در تشخیص و درمان می‌باشد. به منظور بهبود نسبت رادیواکتیویته هدف به زمینه جذب آنتی‌بادی نشان‌دار شده با مواد رادیو اکتیو به تومور باید افزایش یابد یا فعالیت غیر اختصاصی در بافت‌های طبیعی کاهش یابد و یا هر دو با هم انجام پذیرد [۱٦-۹]. روش دیگر جهت کاهش رادیو اکتیویته زمینهTumor pre-targeting می‌باشد. اساس نظریهٔ فوق تجویز جداگانه آنتی بادی و ماده نشان‌دار می‌باشد. با توجه به ویژگی بالای MAb اگر زمان رسیدن ماده نشان‌دار به هدف تا موقعی که نسبت آنتی بادی متصل به تومور به آنتی بادی متصل نشده به تومور به بالاترین مقدار خود برسد، به تأخیر بیفتد نسبت هدف به زمینه افزایش پیدا کرده و تصویر مناسب به دست خواهدآمد. در راستای رسیدن به این هدف اول آنتی بادی غیر رادیواکتیو تجویز می‌شود و بعد از گذشت زمان کافی جهت جایگزین شدن در هدف و پاک شدن از بافت‌های سالم، ماده نشان‌دار در شکل شیمیایی با افینیتی بالا برای آنتی بادی تجویز می‌شود [۲۳-۱۷]. ماده نشان‌دار بایدکلیرانس سریعی داشته ودر عین حال توسط آنتی بادی که قبلاً در سلول‌های هدف یا تومور جایگزین شده است، گرفته شود. دو روش کلی تاکنون در مدل‌های حیوانی و در انسان‌ها بر اساس سیستم آویدین ـ بیوتین در راستای تحقق نظریه Tumor pre-targeting آزمایش شده‌اند که شامل روش دو مرحله‌ای(Two-step) و سه مرحله‌ای (Three-step) می باشند [۲٤]. روش دو و سه مرحله ای بر اساس پیوند قوی بین آویدین-بیوتین (10^{-15}M $k_d = 1.3\times$at pH5) پایه گذاری شده است. در روش دو مرحله ای ابتدا آنتی بادی ضد تومور بیوتینه شده به مدل آزمایشگاهی حاوی تومور یا انسان تجویز می‌شود ۲ تا ۳ روز بعد از تجویز آنتی بادی بیوتینه شده، زمانی که غلظت آنتی بادی در بافت‌های سالم کاهش یافت و قبل از اینکه مقدار آنتی بادی در هدف کاهش یابد، آویدین یا استرپت آویدین نشان‌دار تجویز می‌شود و سپس تصویربرداری صورت می‌گیرد. حال آنکه در روش سه مرحله ای ابتدا هدف (تومور) با تجویز آنتی بادی های بیوتینه شده ضد تومور، هدف‌گیری(Pre-targeting) می‌شود سپس ٤٨-٢٤ ساعت بعد آویدین سرد (غیر نشان‌دار) تجویز شده تا آنتی بادی های بیوتینه در گردش خون و هدف را آویدینه کند در مرحله آخر مشتق بیوتین نشان‌دار تجویز می‌شود. (^{111}In-DTPA-bio). روش سه مرحله‌ای به طور موفقیت آمیزی در مدل‌های حیوانی و انسانی به کار رفته است [۲٤و۲۵]. با توجه به مشکلات ناشی از جذب زمینه، روش دو مرحله ای جای خود را به روش سه مرحله ای داده است. در روش سه مرحله ای جذب زمینه به شدت کاهش می یابد (۲۳-۲۱) اما کلیرانس سریع مشتق بیوتین نشان‌دار(^{111}In-DTPA-bio) امکان تجمع کافی را در هدف کاهش می‌دهد که از مشکلات روش فوق می باشد. با افزایش وزن مولکولی مشتق بیوتین، کلیرانس کاهش یافته و ماده نشان‌دار زمان بیشتری را در خون بسر برده که شانس رسیدن به هدف افزایش می‌یابد.. ما در این تحقیق برای افزایش وزن مولکولی از ۱۰ باز آدنین (10X) استفاده کردیم. DTPA-bio-10X به همراه DTPA-bio (خریداری شده از شرکت سیگما) توسط ایندیوم-۱۱۱ نشاندار شدند و غلظت خونی آنها در موشهای Balb/c در زمانهای مختلف تعیین شد.

مواد و روشها

- DTPA α , ω bis (biocytinamide)
  Sigma
- DTPA-biotin-AAAAAAAAA(DTPA-bio-10X)
  e trombosi unita biologia molecolare, Milano, Italy
  Medicina interna-centro emofilia
- ITLC-SG
  Sigma , T-6770 , 20×20 cm

$^{111}InCl_3$ در بخش سیکلوترون مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران تولید و مورد مصرف قرار گرفت.

اکتیویته ^{111}In توسط دستگاه گاما کانتر با مشخصات زیر اندازه گیری شد.

Gama counter, EG & G, ORTEC Model 4001 M, USA

در این مقاله به جای DTPA α, ω bis (biocytinamide) به اختصار DTPA-bio نوشته شده است.

نشاندار کردن:

به ۱۰۰ µl از محلول DTPA α, ω bis (biocytinamide) (1 µg/µl PBS) مقدار ۵۰ µCi ایندیوم-۱۱۱ در بافر استات با pH6 اضافه شد. مخلوط مدت یک ساعت در حرارت اتاق انکوبه شد و سپس جهت تعیین خلوص رادیو شیمیایی و کارآیی نشاندار شدن از روش کروماتوگرافی ITLC-SG آمونیوم استات ۱۰٪ - متانل ۱:۱ استفاده شد.

به ۲۰۰ µl از محلول DTPA-bio-10X (0.2 µmol/ml PBS) مقدار ۵۰ µCi ایندیوم-۱۱۱ در بافر استات با pH6 اضافه شد. مخلوط مدت یک ساعت در حرارت ٤ °C انکوبه شد. جهت تعیین خلوص رادیو شیمیایی و کارآیی نشاندار شدن از روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون استفاده شد.

بررسی تغییرات غلظت مشتقات بیوتین نشاندار با ^{111}In در خون موشهای Balb/c:

مقدار 1ml/20µCi از کمپلکسهای ^{111}In-DTPA α , ω bis (biocytinamide) , ^{111}In-DTPA-bio-10X به دو سری موش‌های Balb/c از طریق سیاهرگ دمی تزریق شد. در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ٦۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲٤۰ دقیقه بعد از تزریق سه عدد موش ازهر سری را با اتر کشته و از قلب آنها خون گرفته شد و در لوله‌های از پیش وزن شده ریخته و اکتیویته آنها اندازه‌گیری شد و مقدار %ID/g blood محاسبه شد. با اندازه‌گیری اکتیویته سرنگ قبل و بعد از تزریق دوز کل حاصل شد.

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از آنتی‌بادی‌ها یا مشتقات آنها که با مواد رادیو اکتیو نشان‌دار شده‌اند جهت تشخیص بالینی سرطان و سایر بیماری‌ها و همینطور درمان، در دهۀ گذشته به سرعت افزایش یافته است که به طور عمده مدیون گسترش تکنولوژی هیبریدوما و استفاده از MAbs می باشد. از آنجایی که آنتی بادی‌ها پروتئین‌هایی با وزن مولکولی نسبتاً بالا می‌باشند به طور طبیعی کلیرانس خونی آنها آهسته بوده و آنتی بادی‌های نشان‌دار زمان زیادی را در خون مانده که زیادتر از زمان لازم برای رسیدن به هدف می‌باشد و طی یک روند آهسته از بدن حذف می‌شوند. بنابراین اگر آنتی‌بادی نشان‌دار با مواد رادیو اکتیو در حد نسبتاً کم در تومور تجمع یابد، اغلب دوز تجویز شده آزاد بوده و در جاهای دیگری مثل خون، کبد و سایر اعضاء طبیعی دیگر تجمع یافته و در نتیجه رادیواکتیویته زمینه افزایش یافته و تشخیص تومور مشکل می‌شود [٦]. عوامل اصلی که کاربردهای بالینی ایمونو سنتی گرافی و ایمونوتراپی را محدود می‌کنند، عبارتند از : نسبت ضعیف هدف به زمینه در تصاویر، ایمونوژنیسیته آنتی‌بادی‌های موشی تجویز شده، هزینه سنگین تولید. یک روش جهت کاهش رادیو اکتیویته زمینه روش سه مرحله ای بر اساس تجویز جداگانه آنتی بادی و ماده

نشاندار(Tumor pre-targeting) می‌باشد. یکی از مشکلات روش سه مرحله ای بر اساس نظریه Pre-targeting کلیرانس سریع ماده نشاندار است که امکان تجمع کافی را در هدف کاهش میدهد. به منظور کاهش کلیرانس ماده نشاندار، ۱۰ باز آدنین به DTPA-bio ، ماده نشاندار در روش سه مرحله ای، اضافه شد. DTPA-bio که در آن بیوتین به صورت بیوسیتین به طور کووالان به DTPA ،کونژوگه شده است، از شرکت Sigma خریداری شد. مشتق دیگر DTPA-bio-10X می باشد که DTPA-bio ساخت شرکت سیگما توسط شرکت Medicina interna در میلان ایتالیا به انتهای 5' رشته حاوی ۱۰ باز آدنین متصل شده است.

ایندیوم ـ۱۱۱در بافر استات با pH6 بر روی DTPA-bio وDTPA-bio-10X اضافه شد. جهت تعیین کارآیی نشاندار شدن و خلوص رادیو شیمیایی، کروماتوگرافی صورت گرفت. در سیستم کروماتوگرافی ITLC-SG ، استات آمونیوم۱۰٪ ـ متانل (۱:۱)، ایندیوم-۱۱۱ در بافر استات با pH6 و ^{111}In-DTPA-bio-10X در مبداء مانده (R_f=0) در حالی که ^{111}In-DTPA-bio کمی با جبهه حلال به بالا حرکت می‌کند (R_f=0.2). کارآیی نشاندار شدن DTPA-bio با ^{111}In توسط کروماتوگرافی انجام شده بیش از ۹۵٪ بود.

برای تعیین کارآیی نشاندار شدنDTPA-bio-10X بعد از نشاندار کردن با ^{111}In ، حاصل به دستگاه Size exclusion FPLC, Suprose 12HR تزریق شد. همینطور محلولی از ایندیوم در بافر استات با pH6 هم به دستگاه FPLC در شرایط مشابه تزریق شد. فراکشنهای 1 ml در هر مورد جمع آوری و اکتیویته آنها اندازه گیری شد. با توجه به نتایج حاصل کارآیی نشاندار شدن ^{111}In-DTPA-bio-10X بالای ۹۵٪ تعیین شد.

جهت اندازه گیری غلظت خونی مقدار 0.1ml/20 μCi از کمپلکس^{111}In-DTPA-bio و ^{111}In-DTPA-bio-10X به موش‌های Balb/c از طریق سیاهرگ دمی تزریق شد. ID/g % خون در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ دقیقه بعد از تزریق تعیین شد. اطلاعات حاصل در جدول ۱ نشان داده شده است.

همان طور که از نمودار ۱ مشخص است-^{111}In DTPA-bio به سرعت از گردش خون پاک می‌شود نیمه عمر بیولوژیکی آن تقریباً ۳۰ دقیقه است. بنابراین زمان کافی برای رسیدن اکتیویته به هدف وجود ندارد ولی کاهش غلظت^{111}In-DTPA-bio-10X آهسته تر بوده و به نظر می‌رسد که متناسب با وزن مولکولی می‌باشد پس فرصت کافی جهت تجمع در هدف و در عین حال پاک شدن از بافت‌های سالم وجود دارد.

Henatowich و همکاران [۲۶] با اتصال پروتئین با وزن مولکولی مشخص به DTPA-bio کلیرانس آن را کاهش دادند. از آنجائی که پروتئین ایمونوژن بوده و در عین حال به عنوان راه اصلی کاتابولیسم وارد کبد می شود و اکتیویته کبد و طحال را افزایش می دهد پس ترکیب مناسبی برای کاهش کلیرانس DTPA-bio نمی باشد. ما برای کاهش کلیرانس از اتصال ۱۰ باز آدنین (10X) به DTPA-bio استفاده کردیم. 10X وزن مولکولی مشتق را افزایش داده و غلظت خونی آهسته تر از DTPA-bio کاهش یافت. ضمن اینکه تعداد بازهای آدنین قابل تغییر بوده پس میتوان سرعت کاهش غلظت خونی را تغییر داد. باز آدنین ایمونوژن نبوده و وارد کبد هم نمی شود، به این ترتیب جذب کبد و طحال افزایش نمی یابد. تنها مشکل مشتق جدید عدم اتصال کافی و مناسب به آویدین می باشد که به خاطر قرار گرفتن بیوتین بین DTPA و 10X می باشد. از آنجائی که روش سه مرحله ای بر اساس سیستم آویدین-بیوتین طراحی شده است در صورتی که مشتق جدید به نحوی تهیه شود که بیوتین و DTPA در دو محل مختلف رشته باز آدنین قرار گیرند، در روش سه مرحله ای بکار خواهد رفت زیرا هم امکان تشکیل کمپلکس با ایندیوم فراهم می شود و هم اتصال با آویدین به خوبی صورت می گیرد.

از طرفی با ظهور نسل دوم آنتی بادیهای منوکلونال

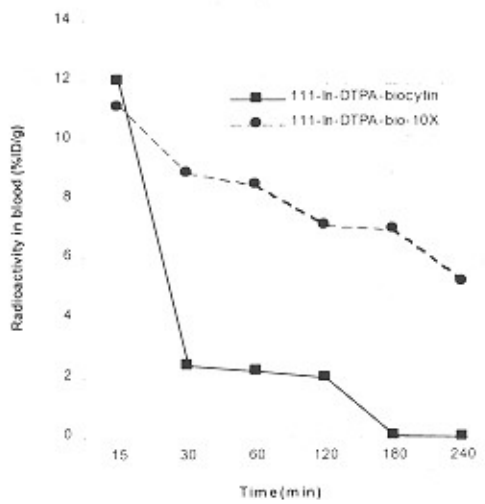
یا Bispecific MAbs و مهندسی آنتی بادی، جهت کاهش جذب زمینه در روش Pre-targeting به جای روش سه مرحله ای، روشهای دیگری ارائه شده است که بر اساس سیستم آویدین-بیوتین نمی باشد. Chatal و همکاران [۲۷] Bispecific Mab جدیدی را تهیه کرده اند که یک بازوی آن علیه CEA (Carcinoma emberionic antigen) و بازوی دیگر علیه ^{111}In-DTPA می باشد.

(anti-CEA/anti-^{111}In-DTPA bifunctional antibody)

و از ترکیب ^{111}In-labeled-bivalent (^{111}In-di-DTPA-tyrosyl-lysine) به عنوان ماده نشاندار استفاده کرده‌اند. به این ترتیب که اول Bispecific MAb را تجویز کرده و بعد از چند روز ماده نشاندار تجویز شده وسپس تصویربرداری صورت گرفته است. با توجه به وجود اسیدهای آمینه در مشتق بکار رفته (^{111}In-di-DTPA-tyrosyl-lysine) ^{111}In-labeled-bivalent ، مشتقی که ما معرفی کردیم به خوبی بدون وجود بیوتین به صورت ^{111}In-DTPA-10X در این مورد یا سایر روشهای جدید Pre-targeting بکار خواهدرفت.

جدول ۱- %ID/g of blood کمپلکس های ^{111}In-DTPA-bio-10X و ^{111}In-DTPA-bio در موشهای Balb/c در زمانهای ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، و ۲۴۰ دقیقه بعد از تزریق

Time (min)	^{111}In-DTPA-bio	^{111}In-DTPA-bio-10X
15	12 ± 0.85	11.09 ± 0.85
30	2.4 ± 0.03	8.89 ± 1.29
60	2.22 ± 0.02	8.5 ± 2.6
120	1.98 ± 0.001	7.12 ± 0.48
180	0.03 ± 0.005	6.97 ± 0.84
240	0.02 ± 0.005	5.22 ± 0.4



نمودار ۱- غلظت خونی ^{111}In-DTPA-bio-10X و ^{111}In-DTPA-bio در موش های Balb/c در زمانهای ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، و ۲۴۰ دقیقه بعد از تزریق

منابع

1. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256: 495.
2. Chatal JF., Peltier P., Bardies M., et al. Does immunoscintigraphy serve clinical needs effectively? Is there a future for radioimmunotherapy? Eur J Nucl Med 1992; 19: 205-213.
3. Goldenberg DM.Monoclonal antibodies in cancer detection and therapy. Am J Med 1993; 94: 297-312.
4. Corstens FHM., Oyen WJG and Becker WS. Radioimmunoconjugates in the detection of infection and inflammation. Semin Nucl Med 1993; 23(2): 148-164.
5. Manspeaker P., Weisman HF and Schaible TF. Cardiovascular applications: Current status of immunoscintigraphy in the detection of myocardial necrosis using antimyosin (R11D10) and deep venous thrombosis using antifibrin (T2G1S). Semin Nucl Med 1993; 23(2): 133-147.
6. Hnatowich DJ. Antibody radiolabeling, problems and promises. Int J Radiat Appl Instrum Part B 1990; 17(1): 49-55.
7. Bradwell AR., Fairweather DS., Dykes PW., et al. Limiting factors in the localization of tumors with radiolabeled antibodies. Immunol Today 1985; 6: 163-170.
8. Epenetos AA., Snook D., Durbin H., et al. Limitations of radiolabeled monoclonal antibodies for localization of human neoplasms. Cancer Res 1986; 46: 3183-3191.
9. Msirikale JS., Klein JL., Schroeder J., et al. Radiation enhancement of radiolabeled antibody deposition in tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1987; 13: 1839-1844.
10. Srivastava S., Schlom J., Raubitschek A., et al. Studies concerning the effect of external irradiation on localization of radiolabeled monoclonal B72.3 to human colon carcinoma xenografts. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 16: 721-729.
11. Smyth MJ., Pietersz GA and Mckenzie IFC. Use of vasoactive agents to increase tumor perfusion and the antitumor efficacy of drug monoclonal antibody conjugates. J Natl Cancer Inst 1987; 79: 1367-1373.
12. Munz DL., Alavi A., Koprowski H., et al. Improved radioimmunoimaging of human tumor xenografts by a mixture of monoclonal antibody $F(ab')_2$ fragments. J Nucl Med 1984; 27: 1739-1745.
13. Kemshead JT., Jones DH and Lashford L. ^{131}I-coupled to monoclonal antibodies as therapeutic agents for neuroectodermally derived tumors. Fact or fiction? Cancer Drug Deliv 1986; 3: 25-43.
14. Gaffar SA., Pant KD., Shochat D., et al. Experimental studies of tumor radioimmunodetection using antibody mixtures against carcinoembryonic antigen (CEA) and colon-specific antigen-p (CSAP). Int J Cancer 1981; 27: 101-105.
15. Greiner JW., Pestka S., Fisher PB., et al. Recombinant interferon enhances monoclonal antibody targeting of carcinoma lesions in vivo. Science 1987; 235: 895-898.

Intraperitoneal radio-localization of tumors pre-targeted by biotinylated monoclonal antibodies. Int J Cancer 1990; 45: 1184-1189.

22. Oehr P., Westermann J., Biersack HJ. Streptavidin and biotin as potential tumor imaging agents. J Nucl Med 1988; 29: 728-729.
23. Sinitsyn VV., Mamontova AG., Checkneva YY., Shnyra AA., Dokogatsky SP. Rapid blood clearance of biotinylated IgG after infusion of avidin. J Nucl Med 1989; 30: 66-69.
24. Paganelli G., Malcovati M., Fazio F. Monoclonal antibody pretargetting techniques for tumor localization: the avidin-biotin system. Nucl Med Comm 1991; 12: 211-234.
25. Paganelli G., Magnani P., Zito G., et al. Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients. Cancer Res 1991; 51: 5960-5966.
26. Henatowich DJ., Virzi F., Rusckowski M. Investigations of avidin and biotin for imaging applications. J Nucl Med 1987; 28: 1294-1302.
27. Chatal JF., Faivre-Chauvet A., Bardied M., et al. Bifunctional antibodies for radioimmunutherapy. Hybridoma 1995; 14: 125-128.

16. Guadagni F., Schlom J., Pothen S., et al. Parameters involved in the enhancement of monoclonal antibody targeting in vivo with recombinant interferon. Cancer Immunol Immunother 1988; 26: 222-230.
17. Goodwin DA., Meares GF., McCall MJ., et al. Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111- labeled bifunctional haptens. J Nucl Med 1988; 29: 226-234.
18. Hnatowich DJ., Virzi F., Rusckowski M. investigations of avidin and biotin for imaging applications. J Nucl Med 1987; 28: 1294-1302.
19. Paganelli G., Riva P., Deleide G., et al. In vivo labeling of biotinylated monoclonal antibodies by radioactive avidin: a strategy to increase tumor radiolocalization. Int J Cancer 1988; 2: 121-125.
20. Le Doussal JM., Martin M., Gautherot E., Delaage M., Barbet J. In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and divalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates: enhanced divalent hapten affinity for cell-bound antibody conjugate. J Nucl Med 1989; 30: 1358-1366.
21. Paganelli G., Pervez S., Siccardi AG., Rowlinson G., Deleide G ., Chiolerio F., Malcovati M., Scassellati GA., Epenetos AA.