

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 51/08 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

A61K 103/32 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00805729. X

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1251767C

[22] 申请日 2000.2.29 [21] 申请号 00805729. X

[30] 优先权

[32] 1999. 3. 1 [33] US [31] 09/259,338

[86] 国际申请 PCT/US2000/005078 2000.2.29

[87] 国际公布 WO2000/052031 英 2000.9.8

[85] 进入国家阶段日期 2001.9.28

[71] 专利权人 拜奥根 IDEC 公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 P·钦

审查员 许磊

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 樊卫民

权利要求书 4 页 说明书 29 页 附图 1 页

[54] 发明名称

用钷-90 放射性标记蛋白质的试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了用辐射分解同位素（特别是钷-90）放射性标记蛋白质和肽，由此获得足够的纯度、比活性、和结合亲和力的方法和试剂盒，使得放射性标记的蛋白质可以直接施用于患者而不需要进一步的柱纯化。这些试剂盒和方法在为医院和门诊病人的癌症治疗提供放射免疫疗法方面特别有用。

1. 一种用治疗性放射性同位素放射性标记螯合剂缀合蛋白质或肽方法，包括：
 - a) 将螯合剂缀合蛋白质或肽与含放射性同位素或其盐的溶液混合；且
 - b) 将混合物在可接受的温度、pH和缓冲条件下温育足够的时间，由此制备具有超过95%的放射性掺入、足够的比活性、和至少50%的结合特异性的放射性标记蛋白质或肽，使得放射性标记的蛋白质或肽可以被稀释到合适的浓度，不需要进一步的纯化以从未掺入的放射性同位素中分离放射性标记的蛋白质或肽而直接应用。
2. 权利要求1的方法，其中所述治疗性放射性同位素选自 α 和 β 发射体。
3. 权利要求2的方法，其中所述治疗性放射性同位素是 β 发射体。
4. 权利要求3的方法，其中所述 β 发射体是 ^{90}Y 。
5. 权利要求1的方法，其中所述蛋白质是抗体或抗体片段。
6. 权利要求4的方法，其中所述足够的温育时间小于8分钟。
7. 权利要求6的方法，其中所述足够的温育时间在2分钟与5分钟之间。
8. 权利要求1的方法，其中所述螯合剂是选自MX-DTPA、苯基-DTPA、苄基-DTPA、CHX-DTPA、DOTA、及其衍生物的双功能螯合剂。
9. 权利要求8的方法，其中所述螯合剂是MX-DTPA。
10. 权利要求1的方法，其中所述可接受的温度范围为 $25^{\circ}\text{C} - 43^{\circ}\text{C}$ 。
11. 权利要求1的方法，其中所述可接受的pH范围为3.0 - 6.0。
12. 权利要求1的方法，其中所述可接受的缓冲液是醋酸盐缓冲液。
13. 权利要求12的方法，其中所述缓冲液是浓度为10 - 1000mM之间的醋酸钠缓冲液。
14. 权利要求1的方法，其中所述可接受的缓冲液包含良性辐射防护剂。
15. 权利要求14的方法，其中所述良性辐射防护剂是抗坏血酸盐。
16. 权利要求1的方法，其中所述结合特异性为至少70%。
17. 权利要求5的方法，其中抗体标记的比活性为至少5mCi/mg。
18. 一种用治疗性放射性同位素放射性标记螯合剂缀合蛋白质或肽以施

用于患者的试剂盒，包括：

- a) 在适当缓冲物中包含螯合剂缀合蛋白质或肽的小瓶，
 - b) 装有用于使放射性标记的蛋白质或肽稳定且施用于患者的缓冲液制剂的小瓶，和
 - c) 用于进行放射性标记操作的指令，当在该指令中推荐的可接受的温度、pH和缓冲条件下将螯合剂缀合蛋白质或肽暴露于放射性同位素或其盐足够时间后，制备具有高于95%放射性掺入、足够的比活性、和至少50%结合特异性的放射性标记蛋白质或肽，使得放射性标记的蛋白质或肽可以在所述缓冲液制剂中稀释至适当浓度并直接施用于患者，而不需要进一步的纯化以从未掺入的放射性同位素中分离放射性标记的蛋白质或肽。
19. 权利要求18的试剂盒，其中所述治疗性放射性同位素是发射 α 和 β 的放射性同位素。
20. 权利要求19的试剂盒，其中所述治疗性放射性同位素是 β 发射体。
21. 权利要求20的试剂盒，其中所述 β 发射体是 ^{90}Y 。
22. 权利要求18的试剂盒，其中所述蛋白质是抗体或抗体片段。
23. 权利要求18的试剂盒，其中所述足够温育时间小于8分钟。
24. 权利要求23的试剂盒，其中所述足够温育时间在2分钟与5分钟之间。
25. 权利要求18的试剂盒，其中所述螯合剂是选自MX-DTPA、苯基-DTPA、苜基-DTPA、CHX-DTPA、DOTA、及其衍生物的双功能螯合剂。
26. 权利要求25的试剂盒，其中所述螯合剂是MX-DTPA。
27. 权利要求18的试剂盒，其中所述可接受的温度范围为 $25^{\circ}\text{C} - 43^{\circ}\text{C}$ 。
28. 权利要求18的试剂盒，其中所述可接受的pH范围为3.0 - 6.0。
29. 权利要求18的试剂盒，其中所述可接受的缓冲液是醋酸盐缓冲液。
30. 权利要求29的试剂盒，其中所述缓冲液是浓度为10 - 1000mM之间的醋酸钠缓冲液。
31. 权利要求18的试剂盒，其中所述可接受的缓冲液包含良性辐射防护剂。

32. 权利要求31的试剂盒，其中所述良性辐射防护剂是抗坏血酸盐。
33. 权利要求18的试剂盒，其中所述结合特异性为至少70%。
34. 权利要求18的试剂盒，其中抗体标记的比活性为至少5mCi/mg。
35. 权利要求18的试剂盒，还包括用于调节放射性同位素pH的无菌缓冲液的小瓶。
36. 权利要求35的试剂盒，其中所述小瓶装含有醋酸盐缓冲液。
37. 权利要求18的试剂盒，其中所述缓冲液制剂包含生理盐水、辐射防护剂、和未缀合螯合剂。
38. 权利要求37的试剂盒，其中辐射防护剂选自人血清白蛋白、抗坏血酸盐、抗坏血酸、酚、亚硫酸盐、谷胱甘肽、半胱氨酸、龙胆酸、尼克酸、棕榈酸抗坏血酸酯、 $\text{HOP}(:\text{O})\text{H}_2$ 、甘油、甲醛合次硫酸钠、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、和 SO_2 。
39. 权利要求38的试剂盒，其中辐射防护剂是抗坏血酸盐。
40. 权利要求39的试剂盒，其中抗坏血酸盐的浓度为1 - 100mg/mL。
41. 权利要求38的试剂盒，其中未缀合螯合剂是DTPA。
42. 权利要求41的试剂盒，其中DTPA的浓度为1mM。
43. 权利要求18的试剂盒，还包括反应瓶。
44. 权利要求18的试剂盒，还包括装有放射性同位素的小瓶。
45. 权利要求1的方法，其中放射性标记为 ^{90}Y ，螯合剂为MX-DTPA。
46. 权利要求1的方法，其中b)的混合物在pH3-6下温育。
47. 权利要求1的方法，其中螯合剂与肽或蛋白质的比例范围为1.5-1。
48. 权利要求5的方法，其中蛋白质为治疗性抗体或抗体片段。
49. 权利要求48的方法，其中抗体或抗体片段特异性结合CD20。
50. 权利要求49的方法，其中抗体或抗体片段为特异性结合人CD20的单克隆抗体或其片段。
51. 权利要求5的方法，其中抗体片段选自Fab， $\text{F}(\text{ab}')_2$ 和Fv片段。
52. 权利要求1的方法，其中结合特异性至少为50%。
53. 权利要求1的方法，其中结合特异性至少为80%。
54. 权利要求1的方法，其中实现了放射性掺入水平大于96%。

-
55. 权利要求1的方法，其中实现了放射性掺入水平的范围为96.3-99.5%。
56. 权利要求18的试剂盒，其中放射性标记为⁹⁰Y，螯合剂为MIX-DTPA。
57. 权利要求18的试剂盒，其中步骤c)的指令描述了将螯合剂缀合的蛋白质或肽在pH3-6下暴露于放射性同位素或其盐。
58. 权利要求18的试剂盒，其中螯合剂与肽或蛋白质的比例范围为1.5-1。
59. 权利要求22的试剂盒，其中所述蛋白质为治疗性抗体或抗体片段。
60. 权利要求59的试剂盒，其中抗体或抗体片段特异性结合CD20。
61. 权利要求60的试剂盒，其中抗体或抗体片段为特异性结合人CD20的单克隆抗体或其片段。
62. 权利要求59的试剂盒，其中抗体片段选自Fab，F(ab')₂和Fv片段。

用钇-90放射性标记蛋白质的试剂盒

发明领域

本发明涉及用治疗性放射性同位素放射性标记蛋白质和肽的试剂盒和方法，使得这些放射性标记的蛋白质可以直接施用于患者而不需要额外纯化。这些试剂盒和方法特别可以用于使用钇-90 (^{90}Y) 标记蛋白质和肽。通过优化放射性标记方案，使得不需要进一步纯化放射性标记的蛋白质，通过解决如何以对使用者友好的形式提供钇标记药物的持久难题，使得可以容易的制备这些药物并在医院或门诊病人的治疗中施用，本发明满足了本领域中长期悬而未决的需要。

技术背景

引入此处所有出版物和专利申请作为参考文献，就像引入特定并单独指定的单项出版物或专利申请作为参考文献。

放射性标记的蛋白质，特别是抗体，作为潜在的诊断性和治疗性试剂的评价已经进行了多年。认为这些试剂用于癌症治疗特别有用，现在研究人员开始鉴定肿瘤特异抗原和结合这些抗原的同源配基或者抗体。通过施用特异结合肿瘤特异抗原且与范围短、能量高、粒子发射丰富的放射性同位素偶联的放射性标记配基或抗体，我们能够将致死剂量的辐射直接投递至肿瘤细胞。

取决于特定同位素的粒子范围，可以根据其对于靶向的特定细胞类型的适合性选择标记物。例如， γ 发射体通常用于诊断性目的，即使肿瘤可视化，但是作为杀伤剂通常无效。相反， α 和 β 发射体可以用于实现细胞杀伤。 α 发射体特别可用于血液性疾病或血管肿瘤，在此它们能够实现良好穿透；虽然在某些情况中发射一种粒子对于实现细胞杀伤是足够的，但是 α 发射体通常必须恰好定位于细胞表面。相反， β 发射体，即 ^{90}Y ，特别适用于更大、更局部化的疾病，因为它们通常具有更长的发

射范围。

钇-90标记的抗体和肽已经在临床治疗方案中显示了令人鼓舞的结果 (Thomas等人, 1995, ^{90}Y 放射性标记抗体治疗后的 γ -干扰素施用: 存活和造血毒性研究, 国际辐射肿瘤学生物物理学杂志(Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.) 31: 529 - 534; DeNardo等人, 1995, 钇-90/铟-111 DOTA 肽嵌合L6: 乳腺癌患者的药代动力学、剂量测定、和初始治疗研究, 核医学杂志(J. Nucl. Med.) 36: 97P)。这些缀合物通常通过将蛋白质或抗体与双功能螯合剂偶联、然后经双功能螯合剂将蛋白质构建物与放射性标记物缀合而产生。例如, 共同悬而未决的申请08/475,813、08/475,815、和08/478,967 (此处引入作为参考) 描述了用于靶向并破坏B细胞淋巴瘤和肿瘤细胞的放射性标记治疗性抗体。特别公开了含抗人CD20鼠单克隆抗体2B8、经双功能螯合剂MX-DTPA连接 ^{90}Y 的Y2B8缀合物。

涉及螯合剂和螯合剂缀合物的专利在本领域是知道的。例如, Gansow的美国专利号4,831,175涉及多取代二乙撑三胺五乙酸螯合剂和含此螯合剂的蛋白质缀合物及其制备方法。Gansow的美国专利号5,099,069、5,246,692、5,286,850、和5,124,471还涉及多取代DTPA螯合剂。如Kozak等人所述, 多种DTPA螯合剂, 包括MX-DTPA, 已经显示适用于钇-单克隆抗体放射免疫疗法 (1989, 用于钇-90单克隆抗体放射免疫疗法的双功能螯合剂的本质: 决定体内存活和器官毒性的决定性因素, 癌症研究(Cancer Res.) 49: 2639 - 2644)。此处完整引入这些参考文献。

钇-90由于多种原因特别适合于放射免疫疗法和放射肽疗法。 ^{90}Y 的64小时半衰期足够长, 使得抗体在肿瘤处累积, 而且与 ^{131}I 不同, 它是纯粹的 β 发射体, 能量高 ($E_{\text{max}} 2.27\text{MeV}$), 衰变时无伴随 γ 辐射。其粒子发射范围为100 - 1000细胞直径, 这是门诊病人可能施用的足够小量的穿透放射。此外, 细胞杀伤不需要标记抗体的内在化, 而且离子化放射的局部放射对于邻近的可能缺乏靶抗原的肿瘤细胞将是致死的。

然而, 无论是钇标记抗体已经承认的效用还是某些钇标记疗法令人鼓舞的临床结果, 由于在单一位点进行放射性标记和施用的固有难度, 许多患者不能享受这些疗法可能提供的益处。这一显著问题表现为几乎

没有能够使用发射 α 和 β 的放射性同位素进行原位标记的试剂盒和产品，否则的话可以证明这种技术的商业适用性。

提供放射性标记及随后用破坏性同位素标记治疗剂的施用的试剂盒的问题，似乎是本领域中长期存在的，在这些治疗剂可以施用于患者之前，需要充分纯化过程以除去未结合的标记物，使得患者不暴露于可能在骨和其它非靶器官累积的游离的放射性同位素。甚至那些目前可获得的使用钇标记抗体的试剂盒，在治疗剂能够用于施用之前，需要复杂的纯化步骤。

例如，Antisoma目前提供用于使用 ^{90}Y 放射性标记单克隆抗体HMFG1随后施用于经诊断患卵巢癌患者的试剂盒（Theragyn®）。延伸的I-II期研究证明，这种治疗可能对传统手术和化疗的随诊患者特别有益（Hird等人，1993，使用放射性单克隆抗体辅助治疗卵巢癌，英国癌症杂志（Br. J. Cancer）68: 403 - 406）。但Antisoma的标记方法需要通过交联葡聚糖（Sephadex）G50凝胶过滤除去未结合的标记物，这显著妨碍了Theragyn®标记试剂盒取得商业性成功，并妨碍了确认这种疗法可容易的用于可能由此受益的全部卵巢癌患者。

这些试剂目前在施用前需要柱纯化的事实已经并将继续成为其用于可能由这种技术受益的患者的主要障碍，除非提出简化方法使得医师能够快速、有效、安全的施用这些试剂。例如，给门诊病人进行治疗的医生没有时间或设备在将试剂施用于患者之前通过HPLC或凝胶过滤层析纯化试剂。也就是说，需要附加设备当场立即生成试剂并立即传递给医生，这显著增加了治疗费用，并且在某些情况中可能需要患者旅行很长距离来接受治疗。或者，药物可以不用当场标记，这需要事先制备治疗剂并至少短期保存。这不仅使放射性同位素在保存期间通过放射性衰变而降低强度，而且通过过度暴露于放射性同位素而显著损害蛋白质的结构完整性。

例如，许多报告已经讨论了 ^{90}Y 和相似放射性同位素的辐射分解本质（Salako等人，1998，辐射分解对钇-90标记的Lym-1抗体制剂的影响，核医学杂志（J. Nucl. Med.）39: 667 - 670；Chakrabarti等人，1996，

预防单克隆抗体在标记过程中的辐射分解，核医学杂志（*J. Nucl. Med.*）37: 1384 - 1388）。正如Chakrabarti等人记录的，放射性核素诸如 ^{90}Y 在标记过程以及保存过程中向抗体投递大量的辐射。据报告，辐射导致抗体损害的显著例证，这能够消除肿瘤细胞优选靶，并将非靶组织暴露于显著水平的毒性。

辐射损伤的机制归咎于产生自由基（Pizzarello, 1975, 直接和间接作用, Pizzarello和Witcofski编,《基础辐射生物学》,第2版, Philadelphia: Lea&Febger, 第20 - 29页）。但是正如Salako等人记录的,能量处于2.2MeV时,由 ^{90}Y 发射的 β 粒子能够容易的切断大多数化学键,包括键能只有4.4eV的抗体二硫键（Skoog, 1985,《仪器分析原理》,第3版, San Francisco: Saunders）。由此,待标记蛋白质暴露于破坏性放射性同位素（诸如 ^{90}Y ）的时间越短,蛋白质维持其与靶抗原相互作用所需的结构完整性和结合特异性直至施用并到达靶位点的机会越多。

^{90}Y 的辐射分解本质在本领域已知多年,许多人试图解决这些治疗剂在商业适用性中存在的 ^{90}Y 问题。例如,Salako等人和Chakrabarti等人都评价了在 ^{90}Y 标记的抗体制剂中使用辐射防护剂作为降低对抗体的损害的方法。Salako等人特别报告了人血清清蛋白能够将 ^{90}Y 标记抗体的免疫反应性维持长达72小时。然而,Salako制剂展示的比活性相当低（低于2mCi/mL）。此外,Salako或Chakrabarti都没有报告放弃抗体标记之后所需充分纯化过程的努力。Salako等人标记了45分钟 - 1小时,然后通过分子筛层析法纯化抗体;而Chakrabarti标记了几乎3小时,并通过凝胶过滤层析法纯化。这些方法都不能将 ^{90}Y 标记的治疗剂用于门诊病人的治疗。

Chinol和Hnatowich使用他们自己的发生器产生的 ^{90}Y ,在不进行标记后纯化的情况下,比活性范围1 - 3 mCi/mg的 ^{90}Y 标记蛋白质能够获得90%的放射化学纯度（1987,发生器产生的用于放射免疫疗法的钇-90,核医学杂志（*J. Nucl. Med.*）28（9）: 1465 - 1470）。然而,作者明确不赞成将纯度低于95%的制剂施用于患者,并建议HPLC可以作为重要的且“可能必要的”步骤。

已经认识到在门诊病人和医院治疗中必须排除HPLC和其它类型纯化的那些人，尚未在发展实现高水平的标记掺入并维持可接受水平的抗体稳定性的用于⁹⁰Y的足够标记方案中获得成功。如果不能一贯的实现高水平的放射掺入，如果该标记物又没有由试剂纯化除去，患者将可能暴露于不可接受水平的游离的、未结合的放射性标记物。此外，如果抗体结构完整性受损，使得抗体失去靶特异性，则这些试剂将不能特异结合其同源配基。

Mather及其同事的目标是，以可以避免标记后纯化的方式，使用⁹⁰Y标记肿瘤特异抗体（1989，用⁹⁰Y标记单克隆抗体，欧洲核医学杂志（*Eur. J. Nucl. Med.*）15: 307 - 312）。然而，Mather发现高标记效率（超过95%）只有在适度比活性时（1mCi/mg）能够实现。此外，Mather等人报告，他们的抗体制剂在几小时后就显示断裂信号（归咎于辐射分解）。这可能是由于Mather等人进行的标记反应超过1小时，正如本领域许多其他人所做的。

例如，已经提出了用于使用较低破坏性标记物诸如¹¹¹In标记蛋白质试剂而放弃其它纯化步骤的方法。Richardson等人提出了用¹¹¹In标记抗体的这样一种方法，其目的是有助于诊断性用途的试剂盒形式（Richardson等人，1987，在¹¹¹In免疫闪烁成像中用于常规用途的DTPA标记抗体试剂盒的优化和批量生产，核医学通讯（*Nucl. Med. Comm.*）8: 347 - 356）。然而，Richardson等人提出的标记方法进行时间超过1小时，其可能适用于辐射分解不严重的¹¹¹In，但是似乎不适用于⁹⁰Y标记应用，正如在Mather等人的报告中证明的困难。

这将我们看到了本发明令人惊讶的、未曾期望的有利之处，提供用本领域其他人尚未认可的⁹⁰Y放射性标记蛋白质的无价洞察。令人惊讶的是，本发明已经发现，其他人长期认为实现纯试剂必需的HPLC过程或其它纯化步骤和其他人在增加其试剂比活性的努力中采用的长温育时间对于制备⁹⁰Y标记试剂的过程实际上是有害的。这些时间相关过程，由于辐射分解，只能够增加对蛋白质的损害，到放射性标记蛋白质能够用于注射时导致了特异性降低、蛋白质降解速率升高。令人惊讶的是，本发明

人已经发现能够在短至2-5分钟的时间内实现使用⁹⁰Y的有效标记（掺入>95%且比活性至少15mCi/mg），事实上这种标记随反应时间增加，超过甚至8分钟时，而损失其效率。

现在可以通过本发明的方法在短至2分钟的时间内实现使用⁹⁰Y标记的事实将完全消除目前针对钇放射性标记试剂盒在医院和门诊病人治疗中的适用性的怀疑。本发明的试剂盒将因此最终满足许多癌症患者和医师可能已经认可的长期感受到的需要，如对于基于蛋白质的、放射性标记的癌症治疗剂的商业适用性和易获得性的关注。

发明概述

本发明涉及使用治疗性放射性同位素来放射性标记螯合剂缀合蛋白质或肽，从而施用于患者的方法和试剂盒。本发明的方法主要包括（i）将螯合剂缀合蛋白质或肽与含放射性同位素或其盐的溶液混合，和（ii）将混合物在温和条件下温育足够时间，由此获得具有足够纯度，即放射性掺入水平、比活性、和结合特异性的放射性标记蛋白质或肽，使得放射性标记的抗体可以直接施用于患者而不需要进一步的纯化。

本发明的试剂盒主要包括（i）装有螯合剂缀合的蛋白质或肽的小瓶，（ii）装有使放射性标记抗体稳定并施用于患者的缓冲液制剂的小瓶，和（iii）用于进行放射性标记操作的指令，当在该指令中推荐的温和条件下将螯合剂缀合蛋白质或肽暴露于放射性同位素或其盐足够时间后，获得具有足够纯度、比活性、和结合特异性的放射性标记蛋白质或肽，使得放射性标记的抗体可以在所述缓冲液制剂中稀释至适当浓度，并直接施用于患者而不需要进一步的纯化。

图的简述

图1. A) 清洗SB细胞，并用稀释缓冲液（1X PBS, pH7.4, 含1% (w/v) 牛血清清蛋白）重悬至 90×10^6 细胞/mL。将浓度升高的细胞与使用2B8-MX-DTPA lot#0165A制备的2ng/mL Y2B8一起温育3小时。B) 细胞浓度对结合放射性/总放射性（B/AT）的双倒数曲线（double-inverse plot）。

以 $1/y$ -截距 $\times 100$ 计算免疫反应性。免疫反应性和相关系数(R)的数值分别为72.2%和0.999。

发明详述

除非另有定义，此处所用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域普通技术人员的通常理解相同。虽然与此处所述相似或等同的任何方法和材料都可以用于实践或测试本发明，但是仍描述了优选的方法和材料。

本发明包括使用治疗性放射性同位素放射性标记螯合剂缀合蛋白质或肽，从而施用于患者的方法，包括(i)将螯合剂缀合蛋白质或肽与含放射性同位素或其盐的溶液混合，(ii)将混合物在温和条件下温育足够时间，由此获得具有足够纯度(即放射性掺入水平)、比活性、和结合特异性的放射性标记蛋白质或肽，使得放射性标记的抗体可以直接施用于患者而不需要进一步的纯化。“进一步的纯化”包括HPLC、凝胶过滤、其它类型的柱层析、和以除去游离的或结合的未缀合放射性标记物为目的而采用的任何其它分离技术。

本发明的方法特别适用于通常发生辐射分解并由此具有对蛋白质结构完整性的潜在危险的治疗性放射性同位素。这些治疗性放射性同位素通常选自 α 和 β 发射体。优选的治疗性放射性核素包括 ^{203}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{109}Pd 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{77}Br 、 ^{211}At 、 ^{97}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{195}Au 、或 ^{177}Lu 。具有治疗性效用的其它放射性核素描述于美国专利号5,541,287，此处引入作为参考。特别优选的放射性核素是可以引起分子内分解的强 β 辐射发射体，诸如 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、和 ^{188}Re 。虽然“治疗性”放射性同位素通常指诸如具有细胞毒性效果的 β 和 γ 发射体等放射性同位素，这些放射性同位素还可以用于诊断性目的，但是这些目的并不从本发明的范围内除去这些同位素，因为正是这些同位素的辐射分解本质使得它们适用于公开的方法和试剂盒。

本发明的方法可用于标记蛋白质或肽，特别是那些为了靶特异性必须维持结构完整性的蛋白质或肽。优选的蛋白质是抗体或抗体片段，诸

如识别肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原的Fab、(Fab)₂、和Fv片段。优选的肽包括生长激素释放抑制因子、作用于血管的肠肽(VIP)、物质P、和结合于细胞受体的其它肽。这些肽和这些肽的螯合剂缀合衍生物公开于美国专利号5,830,431, 此处引入作为参考。

“足够的温育时间”，如本发明的方法中提及的，指获得足够放射性掺入和放射化学纯度，使得试剂可以直接施用于患者而不需要进一步纯化的可接受的时间范围。足够的放射性掺入和纯度在本领域通常认为是至少95%，但是可以根据标记物的毒性而变化。对于本领域技术人员应当是清楚的，认为是足够的放射性掺入程度还是功效期望水平的函数。对于⁹⁰Y，特别是本发明的⁹⁰Y标记抗体，假定待标记的螯合剂缀合蛋白质中蛋白质与螯合剂的摩尔比是合适的，则足够时间通常可以小于大约8分钟，更优选在大约2-大约5分钟之间。

对于本领域技术人员应当是清楚的，标记特定蛋白质所需最佳时间可以根据采用的蛋白质、特定放射性标记物、和特定缀合物而变化。优化放射性标记时间中的潜在因素是待标记试剂中螯合剂与蛋白质的比率。例如，螯合剂与蛋白质的比率必须足够高以达到放射性掺入的治疗性有用水平，即95%，但是还不能太高使得蛋白质的结构完整性或免疫反应性受到损害。这要求某个平衡过程，在某些情况中可能导致缀合螯合剂水平较低而标记时间较长。

例如，本发明人已经发现，在5分钟内，使用MX-DTPA作为螯合剂，螯合剂与抗体的摩尔比只有大约1½:1, 可以实现使用⁹⁰Y标记至期望的纯度水平。虽然螯合剂与抗体的比率实际上可以升高，但是没有必要，因为在较短标记时间后就获得了期望水平的放射性掺入和比活性。考虑到这一发现，诸如螯合剂与蛋白质浓度等参数，可以通过本领域技术人员关于其它蛋白质和肽的经验方法，根据选择的治疗性标记物、选择的螯合剂、可用于附着螯合剂的位点数目、蛋白质对辐射分解的易感性、功效的期望水平、等等，从而容易的确定。

任何双功能螯合剂都可以用于本发明的方法，只要它能够结合研究的目标蛋白质和放射性同位素。优选的螯合剂可以选自MX-DTPA、苯基

-DTPA、苜基-DTPA、CHX-DTPA、DOTA、及其衍生物。特别优选的螯合剂是MX-DTPA。

“温和条件”，如本方法中所提及的，包括可接受的温度、pH、和缓冲液条件。对于本领域技术人员应当是清楚的，反应条件不应当选择抑制或不利于标记反应的。Lewis等人讨论了放射性标记免疫缀合物时要考虑的反应条件，此处引入作为参考（1994，用于使用DOTA修饰蛋白质的温和的水溶性方法，通过升高温度并优化pH在放射性标记的免疫缀合物中获得高比活性和高螯合物稳定性，生物缀合物化学（Bioconjugate Chem.）5: 565 - 576）。

可接受的反应温度可以根据待标记的蛋白质而变化，但是范围通常为大约25℃ - 大约43℃。Lewis等人已经发现，将放射性标记反应的温度由25℃升高至43℃，则检测的放射性金属掺入和DOTA放射性缀合物的动力学稳定性升高。

可接受的pH可以根据所用放射性标记物而显著变化。推荐用于使用不同放射性核素进行标记的pH在本领域通常是知道的，而且可以根据放射性同位素进行选择。例如，对于⁹⁰Y，可接受的pH范围为大约3 - 大约6，但是更优选大约4.2。

可接受的缓冲液也将根据特定的放射性标记物而变化。例如，Lewis等人和其他人已经发现，柠檬酸盐的存在抑制⁹⁰Y的标记反应。因此，如果选择⁹⁰Y作为放射性标记物，则柠檬酸盐缓冲液将是不合适的。当使用⁹⁰Y标记时，优选的缓冲液是醋酸盐缓冲液，特别是浓度在大约10 - 大约100mM之间的醋酸钠缓冲液。

如果它不抑制或对标记反应没有不利影响，则它也可能是反应缓冲液中要包括的良性（非不利的）辐射防护剂。根据Chakrabarti，抗坏血酸就是不妨碍标记过程的这样一种辐射防护剂。然而，当在标记反应中采用人血清清蛋白时，由于存在将妨碍标记过程的金属，则应当小心。

因为本发明涉及使用特定辐射分解同位素放射性标记蛋白质，当熟练技工实践本发明的方法时，可能会遇到结合特异性和比活性之间可能存在的平衡。例如，当比活性很高时（即适当超过5mCi/mg，优选超过

10mCi/mg, 更优选超过15mCi/mg), 具有期望的结合特异性的蛋白质构建物将在肿瘤区域具有显著的杀伤能力。然而, 就整体而言, 由于放射性标记物的辐射分解, 保留其免疫反应性的蛋白质群体可能低于具有较低比活性的群体。根据期望水平的比活性, 熟练技工可以选择损失一定水平的免疫反应性。

例如, 本发明已经发现, 当使用⁹⁰Y标记抗体的比活性至大约15mCi/mg时, 蛋白质的结合特异性或免疫反应性通常为至少70%。这当然可能根据抗体的敏感性和采用的放射性同位素的辐射分解本质而变化, 而且如果期望更高水平的免疫反应性或比活性, 可以由熟练技工来操作。本发明已经使用⁹⁰Y获得高至大约20mCi/mg的比活性。治疗性应用期望至少50%的结合特异性。

与此共同拥有且同时提交的共同悬而未决的申请09/_____和09/_____, 公开了可用于评价标记后(如果需要)缀合物的结合亲和力和免疫反应性百分率的结合实验。应当强调, 虽然本发明的标记方法之后不需要进一步的纯化, 但是始终应当进行用于确认放射性掺入水平的基于TLC的实验, 使得不危及患者的健康。这种实验可以在大约3-4分钟内进行, 而且不应当显著影响放射疗法的稳定性或功效。

本发明还包括使用治疗性放射性同位素放射性标记螯合剂缀合蛋白质或肽从而施用于患者的试剂盒, 包括(i)装有螯合剂缀合蛋白质或肽的小瓶, (ii)装有使放射性标记抗体稳定并施用于患者的缓冲液制剂的小瓶, 和(iii)用于进行放射性标记操作的指令, 当在该指令中推荐的、上文描述的温和条件下将螯合剂缀合蛋白质或肽暴露于放射性同位素或其盐足够时间后, 获得具有足够纯度、比活性、和结合特异性的放射性标记蛋白质或肽, 使得放射性标记的抗体可以在所述缓冲液制剂中稀释至适当浓度并直接施用于患者而不需要进一步的纯化。所述螯合剂缀合蛋白质或肽可以以冻干形式供应。

应当理解, 本发明的试剂盒设计用于完成此处所述方法, 而且可能由此用于该目的。因此, 当相关人员阅读本发明时应当清楚知道, 试剂盒指令将根据上文所述方法, 并且由试剂盒实施方案看来, 上文提出的

考虑具有相同的相关性和含义。另外，阅读了整篇公开书后应当清楚知道，本发明涵盖其它试剂盒实施方案，可以包括诸如上述用于调节放射性标记物pH的醋酸盐缓冲液等成分。

试剂盒中特别有利的成分是用用于针对辐射分解作用提供稳定作用并将放射性标记缀合抗体施用于患者的缓冲液制剂。缓冲液制剂是制药学可接受的载体，其同时作为标记抗体的稀释剂和施用缓冲液。虽然任何制药学可接受的稀释剂都可以用于将治疗性或诊断性抗体施用于患者，但是本发明的缓冲液制剂特别适用于施用放射性标记抗体。

例如，本发明的缓冲液制剂包括将钷和其它强放射性核素的辐射分解最小化的辐射防护剂，诸如人血清清蛋白（HAS）或抗坏血酸盐。其它辐射防护剂在本领域是知道的，而且也可以用于本发明的缓冲液制剂，即自由基清除剂（酚、亚硫酸盐、谷胱甘肽、半胱氨酸、龙胆酸、尼克酸、棕榈酸抗坏血酸酯、 $\text{HOP}(:\text{O})\text{H}_2$ 、甘油、甲醛合次硫酸钠、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、和 SO_2 。

本发明的缓冲液制剂还包含过量的未缀合螯合剂。包含未缀合螯合剂的目的是用这些螯合剂清除患者体内的任何非蛋白质结合放射性标记物，并引起放射性标记物的排泄，由此降低患者骨对“寻骨”同位素即 ^{90}Y 的摄取。例如，当试剂盒中的抗体与DTPA螯合剂缀合后，缓冲液制剂中可以包含过量的DTPA或任何其它螯合剂。缓冲液制剂还优选以一定体积供应，使得所有内容转移至反应瓶。如上所述，由于不需要量取并转移精确体积，这导致易用性和可重复性增加。

优选的缓冲液制剂包含磷酸缓冲盐液或生理盐水、人血清清蛋白和DTPA。人血清清蛋白的浓度优选大约5 - 25% (w/v)，更优选约7.5% (w/v)。DTPA的浓度优选约1mM。抗坏血酸盐可以作为人血清清蛋白的替代品使用，通常使用的浓度为约1 - 100mg/ml，但是可以使用更广范围的浓度而不危及患者的安全。

根据购买者的偏爱，可以在其它备选实施方案中供应试剂盒。例如，试剂盒还可以包括在其中进行标记反应和在缓冲液制剂中稀释的无菌反应瓶。构思了在实际的反应瓶中提供用于调节放射性标记物pH的缓冲液

的其它实施方案，以降低浪费。还构思了还包括装有放射性同位素的小瓶的试剂盒，虽然事先订购试剂盒并在此后且施用前分开订购放射性同位素可能更可行。还构思了包括装有在评价放射性标记产物的结合亲和力中作为对照或者在某些情况中与放射性标记蛋白质或肽一起用于联合治疗方案的第二种蛋白质或肽的小瓶的试剂盒。

优选实施方案的详述

^{90}Y 标记的鼠单克隆抗CD20抗体（Y2B8）目前正在临床试验中评价对复发B细胞淋巴瘤的治疗作用。2B8抗体是识别人CD20的鼠抗体。这种抗体的嵌合版本（Rituxan®）最近已经获得了FDA认证用于非何杰金氏淋巴瘤的治疗。此处引入作为参考的美国申请流水号08/475,813公开了在联合治疗方案中相继施用Rituxan®与钇标记的鼠单克隆抗体，其中随施用Rituxan®后施用钇标记的抗CD20抗体足以（a）清除由嵌合抗CD20抗体未清除的任何剩余外周血B细胞；（b）开始由淋巴结消耗B细胞；或（c）开始由其它组织消耗B细胞。

由此，考虑到抗CD20抗体在非何杰金氏淋巴瘤治疗中经证明的功效和淋巴细胞对放射性的已知敏感性，这些治疗性抗体以试剂盒形式商品化将是高度有利的，由此它们可以容易的用放射性标记修饰并直接施用于临床治疗中的患者。

2B8抗体的放射性标记试剂盒优选包括4种成分：1）2mg/mL 2B8-MX-DTPA，溶于低金属生理盐水，2）用于将放射性同位素溶液调节至适当标记pH的50mM醋酸钠，3）缓冲液制剂（1X PBS，pH7.4，含7.5%人血清清蛋白和1mM DTPA），和任选的4）空的10mL玻璃瓶（反应瓶）（“10mL”反应瓶实际能够充裕的装10mL，在技术上比“10mL”大一些）。所有成分经测试是无菌的而且不含热原。

这部分概述了这种简单易用、产生放射性掺入 $\geq 95\%$ 且保留的抗原阳性细胞结合能力可接受的放射性标记抗体之放射性标记试剂盒的确证。还进行了影响结合和放射性掺入的实验参数的评价。

实施例1. 用于使用⁹⁰Y标记2B8的放射性标记试剂盒和方法

A. 放射性标记试剂盒中的试剂

1. 2B8-MX-DTPA; Lot#082395RM2
2. 50mM 醋酸钠, 低金属, IDEC; Lot#082395RM3
3. 缓冲液制剂(1X PBS, pH7.4, 含7.5% (w/v)人血清清蛋白和1mM DTPA), IDEC; Lot#082395RM1
4. 反应瓶, 10mL, IDEC

B. 材料和设备

1. Biodex Tec-Control放射性掺入试剂盒, Cat.#151-770
2. 手套: 无粉末
3. 无菌聚丙烯注射器
4. 无菌注射器针头
5. 带封口的小管; 1.5ml

C. 方法

1. 使用放射性标记试剂盒制备Y2B8

配制试剂盒试剂并装在玻璃壁小瓶中。用无菌的注射用水(WFI)漂洗I型硼硅酸盐小瓶(2或10mL), 并在装瓶前高压灭菌。用无菌的WFI漂洗丁基橡胶隔片, 并在使用前高压灭菌。在等级100的房间中将试剂手工灌装并封口, 并使用USP方法测试热原性和无菌性。

其它试剂:

1. 钇-90: 盐酸盐, 无载体, 溶于HCl

预防措施:

1. 所有步骤应当使用无菌技术进行。
2. 放射性标记试剂盒成分在使用前应当平衡至室温。

放射性标记方案:**1. 加入反应瓶的⁹⁰YCl₃的体积如下计算:****a. 放射性标记时的放射性浓度:**

C_0 = 校准时的放射性浓度 (见制造商的分析鉴定)

Δt = 时间变化 (正数表示校准后, 负数表示校准前)

标记时的放射性浓度 = $C_0/e^{0.0108(\Delta t)}$

b. 加入反应瓶的⁹⁰YCl₃的体积:

45mCi/标记时的放射性浓度 = 加入反应瓶的体积

2. 加入反应瓶的50mM 醋酸钠的体积如下计算:**a. 对于溶于0.040M HCl中的⁹⁰YCl₃ (AMersham):**

⁹⁰YCl₃的体积 (步骤1b) x 0.8 = 加入的醋酸钠体积

b. 对于溶于0.050M HCl中的⁹⁰YCl₃ (Nordion):

⁹⁰YCl₃的体积 (步骤1b) x 1.0 = 加入醋酸钠的体积

3. 用乙醇擦洗反应瓶和醋酸钠瓶的隔片。使用1cc注射器, 将计算所得体积 (步骤1a或1b) 的50mM 醋酸钠 (步骤2) 转移至反应瓶。通过颠倒数次混合小瓶。

4. 用乙醇擦洗⁹⁰YCl₃源小瓶的隔片。在插有针头的小瓶上安装无菌的0.2 μm 滤器。使用1cc无菌注射器, 排气, 将所需体积 (步骤1b) 的⁹⁰YCl₃ 转移至反应瓶。通过颠倒数次混合小瓶。

5. 用乙醇擦洗2B8-MX-DTPA瓶的隔片。使用3cc无菌注射器, 将1.5mL 2B8-MX-DTPA转移至反应瓶。通过颠倒数次混合小瓶。

6. 计算反应混合物的总体积, 方法是将加入的⁹⁰Y氯化物的量 (步骤4)、加入的50mM 醋酸钠的量 (步骤3)、加入的2B8-MX-DTPA的量 (步骤5) 相加求和。

7. 计算获得终体积10mL需要加入反应瓶的缓冲液制剂的体积, 用10减去步骤6中计算的总反应体积。

8. 用乙醇擦洗制剂缓冲液瓶并使之排气。由于缓冲液制剂的粘性, 在插有针头的反应瓶上安装无菌的0.2 μm 滤器。使用安装了适当口径针头的10cc无菌注射器, 将步骤7中计算所得体积的缓冲液制剂转移至反应瓶。

由反应瓶除去通气针头，并通过颠倒数次混合小瓶（终产物）。在进行“放射性掺入实验”前，将小瓶温育至少5分钟。溶液是琥珀色的，且反应瓶是满的，由此确认加入了缓冲液制剂。

9. 使用用于测量⁹⁰Y的适当仪器测量终产物瓶的总放射性。
10. 将终产物立即保存于2-8℃直至需要施用于患者。

2. 放射性掺入实验

通过即时薄层层析法（ITLC），使用Biodex Tec-Control放射性层析试剂盒，根据下列方案，测定放射性掺入百分率：

其它材料和设备：

1. ⁹⁰Y放射性标记的2B8-MX-DTPA
2. 用于TLC条放射性计数的管
3. 剪刀
4. 无菌注射器，1cc
5. 无菌针头，26G
6. 伽马计数器或闪烁计数器
7. 移液器

操作：

1. 首先应当完整阅读Biodex操作手册。
2. 根据试剂盒的指示，每份放射性标记样品测试三次；每管展开一条。
3. 为了在层析条上点放射性标记样品，使用移液器在起点线点1μL。或者，可以由装在1cc无菌注射器上的26G针头分发一小滴来点样。抗体停留在起点，而未掺入的⁹⁰Y-DTPA随溶剂前沿移动。
4. 使用适当计数器（即用于⁹⁰Y的闪烁计数器）对每部分的活性计数，依背景调节。
5. 遵循Biodex用于计算放射性标记抗体百分率的指示。

3. 结合实验

其它试剂:

1. $^{90}\text{Y}2\text{B8-MX-DTPA}$

2. 冻干细胞

由美国典型培养物收藏中心获得人细胞系SB (CD20阳性) 和HSB (CD20阴性), 并在T烧瓶中使用含10%胎牛血清的RPMI-1640 (添加2%谷氨酰胺) 进行培养。将培养液维持在37℃和5% CO_2 。通常细胞隔天1:2分裂, 并于 $0.5\text{-}2.5 \times 10^6$ 细胞/mL收获, 生存力>80%。使用血细胞计数器测定细胞浓度, 通过锥虫蓝排斥测定生存力。

于环境温度和细胞浓度 $0.5\text{-}2 \times 10^6$ 细胞/mL通过离心(1300rpm, Sorvall离心机) 收获细胞, 并用1X HBSS清洗两次。将沉淀的细胞在含1% (w/v) 牛血清清蛋白 (BSA) 和10% (w/v) 甘露醇 (冻干缓冲液) 的1X HBSS中重悬至 50×10^6 细胞/mL, 将0.5mL分装至带O环垫圈的1.5mL聚丙烯微量离心管中, 并保存于-70℃, 于30-60毫托冻干过夜。将冻干细胞管干燥保存于2-8℃, 并在无菌水中重建用于实验; 装有冻干细胞的微量离心管与干燥剂一起保存。

3. 用于冲洗的无菌水或用于注射的无菌水

4. 稀释缓冲液 (1X PBS, pH7.2-7.4, 含1%牛血清清蛋白 (BSA) 和0.02%叠氮化钠)

操作:

放射性标记抗体样品的制备

1. 取得保存于2-8℃的放射性标记抗体。

2. 用P20取10 μL 体积, 并加入装有990 μL 稀释缓冲液的1.5mL微量离心管中 (1:100稀释)。漂洗枪头, 并轻微振荡小管。

3. 取带帽50mL无菌聚丙烯管, 并使用10mL血清学移液器向管中加入10mL稀释缓冲液。

4. 用P200由1:100稀释管取35 μL 体积, 并加入装有10mL稀释缓冲液的锥形管。彻底混匀。

冻干细胞的制备

1. 取得3管冻干SB细胞。
2. 向每管中加入0.5mL SWFI, 振荡小管直至获得单细胞悬浮液。
3. 取3个1.5mL微量离心管; 向3个小管中加入0.5mL稀释缓冲液, 作为无细胞对照。

实验方案

1. 向每管中加入0.5mL体积的经稀释⁹⁰Y2B8-MX-DTPA。
2. 在确认管帽盖紧后, 将管底置于混合仪上45分钟。
3. 于环境温度温育45分钟后, 通过微量离心5分钟沉淀细胞。
4. 将0.8mL体积的上清液转移至闪烁瓶。
5. 向每瓶中加入闪烁混合液。
6. 使用闪烁计数器测定每瓶中放射性的量, 依背景调节。

D. 结果

通过使用不同批号的每种放射性同位素进行数次确认实验, 评价了用于Y2B8的放射性标记方案的可重复性和稳定性。6个确认批号的Y2B8由5名操作者制备。这些批号命名如下并在下列实验室进行:

- #1: IDEC Pharmaceuticals
- #2: IDEC Pharmaceuticals
- #3: IDEC Pharmaceuticals
- #4: MD Anderson Health Center
- #5: Mayo Clinic
- #6: City of Hope

每个确认批号的测试结果概述于表1。

表1. 用于Y2B8确认的释放实验结果

批号	%放射性掺入	%结合
1	99.5	78.6
2	99.3	87.0
3	99.4	85.9
4	99.2	81.8
5	99.2	79.6
6	96.3	80.8
	平均值 = 98.8	平均值 = 82.3
	标准偏差 = 1.24	标准偏差 = 3.4
	% CV = 1.25%	% CV = 4.2%

对于制备的6个确认批号，获得的结合百分率的范围为78.6% - 87.0%，平均值为82.3%。Y2B8放射性掺入值平均为98.8%（范围为96.3% - 99.5%）。总之，这些结果确认了用于制备Y2B8的放射性标记试剂盒方法的可重复性和稳定性，同时指出使用这种放射性标记试剂盒制备的Y2B8可用于临床治疗。

实施例2. 反应参数的初步评价 - - pH和反应时间

初步进行了动力学研究来评价在不同pH和反应时间的条件下进行标记反应后，放射性掺入和⁹⁰Y标记抗体（Y2B8）结合。对于pH范围3.9 - 4.7和温育时间5分钟的放射性标记反应，放射性掺入>96%，且保留的CD20阳性细胞结合>80%（表2）。温育时间3、5、10分钟和pH范围2.9 - 4.6获得了相似结果（表3）。

表2. Y2B8放射性标记动力学: pH对放射性掺入和CD20阳性细胞结合的影响¹

反应pH	放射性掺入 (%)	结合 (%)
3.9	98.4	80.7
4.2	97.8	81.0
4.4	96.1	80.0
4.6	97.0	80.2
4.7	97.4	80.6

表3. Y2B8放射性标记动力学: 温育时间对放射性掺入和CD20阳性细胞结合的影响¹

温育时间 (min)	放射性掺入 (%)	结合 (%)	
pH3.9:	3	97.0	82.0
	5	98.9	82.1
	10	99.2	82.3
pH4.7:	3	97.2	82.5
	5	96.7	81.8
	10	97.6	81.5

¹表2和表3中报告的标记反应结果和参数的评价研究使用由CHO细胞表达系统衍生的2B8进行; 使用与用于先前描述的2B8-49相似的方案制备MX-DTPA缀合物。如共同拥有、共同悬而未决的申请流水号09/_____ (同时申请, 此处引入作为参考) 中所述, 使用大约3mg抗体和与抗体摩尔比4:1的螯合剂进行反应。

使用Lindmo等人的方法测定了Y2B8制剂的免疫反应性。将升高量的新鲜收获CD20阳性SB细胞与固定量的Y2B8在抗原过量条件下一起温育。结合数据的倒数曲线分析显示Y2B8的一份试验制剂的免疫反应性为72.2%。

实施例3. 其它反应参数的评价

A. 序言

这部分描述的实验检验方案偏差对使用Y2B8放射性标记试剂盒制备的Y2B8结合的影响。放射性标记抗体的结合可能在放射性标记过程中受多种参数的影响（表4）。

表4

放射性标记 试剂盒偏差	对标记条件 的预测影响	对结合的预测 影响
1) 加入过量体积的 ⁹⁰ Y	pH降低; 辐射分解升高	降低
2) 加入不足体积的 ⁹⁰ Y	pH无变化; 辐射分解降低	升高或无
3) 加入过量体积的NaAc	pH无变化; 辐射分解降低	升高或无
4) 加入不足体积的NaAc	pH降低; 辐射分解升高	降低
5) 加入过量体积的2B8-MX- DTPA	pH无变化; 辐射分解降低 (比 活性较低)	升高
6) 加入不足体积的2B8-MX- DTPA	pH无变化; 辐射分解升高 (比 活性较高)	降低
7) 温育>5分钟	辐射分解升高	降低
8) 温育<5分钟	辐射分解降低	升高或无

鉴定放射性标记方案的下列偏差，因为它们最有可能对结合具有消极影响，包括1) 加入不足体积的醋酸钠；2) 加入过量的⁹⁰Y氯化物溶液；3) 加入不足量的2B8-MX-DTPA；和4) 超过最大反应温育时间。分别并同时评价了这些偏差的影响。

当分别评价时，上文第1-3项的20%体积偏差（甚至当温育8分钟时）导致IDEC-Y2B8跨过了为临床试验中的结合建立的释放规格。在同时进行所有3项体积偏差（上文1-3）的研究中，只有使用星期一标记方案制备的药剂（最有辐射分解潜力的）和温育8分钟（比标准长60%）略微低于（<3%）临床释放规格。相反，尽管无论所有4项参数偏差（上文1-4）

的累积影响，使用星期五标记方案制备的药剂维持可接受的结合结果。对于所有偏差，分别的和全体的，放射性掺入高于95%的临床释放规格。

B. 参数的选择

我们决定用所需试剂体积偏差20%或允许反应时间由通常使用的最大值6分钟延长30%，代表放射性药理学中所用方案的潜在极端偏差。在该研究中，我们评价了这些偏差对结合IDEC-Y2B8的影响。我们模拟了“星期一”和“星期五”标记以确保评价条件代表整周的极端剂量制备。我们还评价了当所有偏差发生于单一剂量制备时对结合的组合效果，和这些偏差对⁹⁰Y放射性掺入的影响。

“星期一”和“星期五”标记反映了这样一个概念：由于⁹⁰Y氯化物溶液的半衰期短（64小时），所用放射性同位素的体积取决于在周几制备药剂。由于这个原因，星期一制备的药剂的反应体积较小，导致⁹⁰Y浓度较高，可能导致辐射分解较高。因此，我们模拟了星期一和星期五标记操作以确认评价条件代表整周的极端剂量制备。

C. 材料和方法

试剂

1. ⁹⁰YCl₃，溶于0.05M HCl；Pacific Northwest National Laboratory，试剂级；P.O.#08016，08118
2. Ultrex HCl；J.T.Baker，产品#6900，批号#J22539
3. 用于冲洗的无菌水；Baxter，部分#2F7114，批号#G924092
4. 稀释缓冲液；含10mM 磷酸缓冲盐液，pH7.4，1% BSA；Sigma，部分#P-3688，批号#076H8913
5. IDEC供应的放射性标记试剂盒；IDEC 部分#130018，批号#0129，包括
 - a) 2B8-MX-DTPA；IDEC 部分#129017，批号#0165
 - b) 50mM 醋酸钠；IDEC 部分#121017，批号#0209A
 - c) 缓冲液制剂；IDEC 部分#120015，批号#0202

d) 反应瓶; IDEC 部分#122015, 批号#0218

6. 冻干SB细胞; IDEC 部分#127, 批号#127-001F

材料和设备

1. 移液器 (20、200、和1000 μ L)
2. 旋涡振荡器
3. 不含金属的移液器枪头 (Biorad; 不含金属)
4. 伽马计数器 (Isodata, 型号#20-10)
5. 玻璃管 (12 X 75 mm)
6. 聚丙烯管 (Costar; 15mL和50mL, 圆锥形, 无菌)
7. Tec-Control放射性层析试剂盒 (Biodex; 目录#151-770)
8. 微量离心机 (Savant)
9. 不含金属的聚丙烯微量离心管 (Biorad; 目录#223-9480)

方法

1. 制备Y2B8

通常, 使用经下述改变修改的上文所述小量版本的放射性标记试剂盒方案制备⁹⁰Y标记的2B8-MX-DTPA. 使用浓度为84mCi/mL或29.8mCi/mL (用于模拟) 的⁹⁰YCl₃原液, 分别进行星期一或星期五剂量制剂的放射性标记 (基于星期三校准为50mCi/mL). 将⁹⁰YCl₃浓缩液使用50mM HCl (Ultrex, 高纯度) 在不含金属的塑料微量离心管中稀释. Ultrex (高纯度) HCl使用用于照射的无菌水 (SWFI) 稀释至50mM. Y2B8放射性标记试剂盒提供的在不含金属的塑料微量离心管、15mL锥形管、或10mL玻璃隔片反应瓶中进行放射性标记反应.

a. 小量标记以预测全剂量制备

使用模拟星期一剂量制剂的反应条件进行1、3、10、和40mCi的放射性标记反应. 每个反应的试剂体积 (mL) 概述于表5.

表5. 试剂体积 (mL)

⁹⁰ Y的量 (mCi)	⁹⁰ Y氯化物	醋酸钠	2B8-MX-DTPA
1	0.0119	0.0143	0.0333
3	0.0357	0.0429	0.0998
10	0.119	0.143	0.333
40	0.476	0.571	1.33

温育5分钟后, 取20 μL样品, 用缓冲液制剂稀释至0.21mg/mL的抗体终浓度, 并保存于2-8℃直至实验。结合值标准化为1mCi反应, 因为1mCi反应在此报告中所述的所有随后实验中作为对照使用。报告的数值标准化为1mCi对照样品, 方法是每个反应的结合值除以对照的结合值, 以百分比表述。

b. 加入的醋酸钠体积的影响

对于星期一标记, 将10mCi ⁹⁰YCl₃ (0.119ml) 与0.114mL 50mM 醋酸钠混合。这一体积的50mM 醋酸钠代表了用于制备临床剂量的IDEC-Y2B8的缓冲液的常用量减少20%。加入0.333mL缀合抗体 (2B8-MX-DTPA), 混合样品, 然后于环境温度温育。放射性标记溶液的比活性为18.9mCi/mg抗体。于2分钟时, 取0.020mL, 用缓冲液制剂配制成0.24mg/mL, 并保存于2-8℃。8分钟后, 将剩余放射性标记溶液配制成0.24mg/mL, 并保存于2-8℃。重复此方案以模拟星期五标记, 使用0.336mL ⁹⁰YCl₃、0.323mL 醋酸钠、和0.333mL 2B8-MX-DTPA。对于这两项研究, 使用上文所述“标准”条件 (5分钟反应) 进行1mCi对照反应。

c. 加入过量体积的⁹⁰YCl₃的影响

对于星期一标记, 将12mCi ⁹⁰YCl₃ (0.143mL) 与0.143mL 50mM 醋酸钠混合。这一体积的⁹⁰Y代表常用剂量制剂Y2B8中⁹⁰Y的量增加20%。加入缀合抗体, 混合样品溶液, 并于环境温度温育。最终比活性为

22.5mCi/mg 抗体。于2分钟时，取0.020mL，用缓冲液制剂配制成0.24mg/mL，并保存于2-8℃。8分钟后，将剩余放射性标记溶液配制成0.24mg/mL，并保存于2-8℃。类似地进行星期五标记，使用0.403mL $^{90}\text{YCl}_3$ 、0.403mL 50mM 醋酸钠、和0.333mL 2B8-MX-DTPA（比活性22.5mCi/mg抗体）。对于这两项研究，使用上文所述“标准”条件（5分钟反应）进行1mCi对照反应。

d. 加入不足体积的抗体缀合物的影响

对于星期一标记，将10mCi $^{90}\text{YCl}_3$ （0.119mL）与0.143mL 50mM 醋酸钠混合。加入0.267mL 缀合抗体，代表比常用抗体减少20%，混合溶液，并于环境温度温育。于2和8分钟时，取0.020mL，用缓冲液制剂配制成抗体终浓度0.21mg/mL，并保存于2-8℃直至实验。类似地进行星期五标记，使用0.336mL $^{90}\text{YCl}_3$ 、0.403mL 50mM 醋酸钠、和0.27mL 缀合物。对于这两项研究，使用上文所述“标准”条件（5分钟反应）进行1mCi对照反应。

e. 组合试剂偏差的影响

同时评价星期一或星期五标记方案的醋酸钠、 $^{90}\text{YCl}_3$ 、和缀合物体积偏差20%的影响。对于星期一标记，将12mCi $^{90}\text{YCl}_3$ （0.143mL）与0.114mL 50mM 醋酸钠混合，代表 $^{90}\text{YCl}_3$ 增加20%，而醋酸钠比常用量减少20%。加入0.267mL 2B8-MX-DTPA，代表抗体比常用量减少20%，混合反应混合物，并于环境温度温育。于2、4、6、和8分钟时，取0.020mL 反应混合物，用缓冲液制剂配制成抗体终浓度0.21mg/mL，并保存于2-8℃直至实验。类似地进行星期五标记，使用0.403mL $^{90}\text{YCl}_3$ 、0.387mL 醋酸钠、和0.267mL 缀合物；于指定时间取40 μL 样品，并用缓冲液制剂配制。对于这两项研究，使用上文所述“标准”条件（5分钟反应）进行1mCi对照反应。

2. 放射性掺入的测定

根据上文所述实验，使用由Biodex制造的商品化试剂盒（Tec-Control放射性层析试剂盒），测定与缀合物相关的放射性的量。通常，使用微量移液器取0.5 - 1 μ L样品加至双份条带，并根据其中的Biodex指示来展开。使用Isodata伽马计数器（窗口100 - 1000KeV）对玻璃管中放射性计数半部条带。计算放射性标记掺入：将上半部条带的放射性剂量除以上半部和下半部的总放射性。这一数值以百分率表述，并计算平均值。

3. 结合的测定

按照上文所述方案分析样品的结合CD20阳性细胞之百分率。然而，这些实验不包括阴性对照HSB细胞样品，而且在5mL小瓶而非微量离心管中冻干SB细胞。

本质上，所有最终配制的Y2B8细胞用稀释缓冲液1:100稀释（10.0 μ L抗体 + 990 μ L缓冲液）。随后向装有10mL稀释缓冲液的50mL聚丙烯管中加入35 μ L 1:100稀释液，将抗体再次稀释至浓度大约范围在8ng/mL。

将7瓶冻干细胞中的6瓶用SWFI重建，并在50mL锥形管中合并。然后用1.5mL微量离心管分装3份重建细胞（0.5mL），每一样品3管用于测试。向3个空的微量离心管中加入稀释缓冲液（0.5mL）。向每管中加入稀释抗体（0.5mL），盖紧，上下倒置混合，于环境温度温育45分钟。温育后，使用Savant微量离心机，设定“6”（4000xg），离心5分钟沉淀细胞。将样品上清液（0.75mL）转移至12X75mm玻璃管中，使用Isodata伽马计数器（能量窗设定100 - 1000KeV）计数放射性。

计算结合至细胞的放射性（B），方法是由加入的总放射性减去未结合的放射性（上清液）。由不含细胞的管计数的放射性测定总放射性。计算结合百分率，方法是将结合放射性以总放射性的百分数表述。

为了将用于评价结合的冻干细胞之批号之间的变异性最小化，结合值以使用“标准”标记条件制备的1mCi Y2B8对照为标准。如这部分较早所述，为每组实验制备对照样品。

D. 结果

1. 小量标记以预测全剂量制备

为了确保小量放射性标记反应可预测全剂量（40mCi）制备，使用上文所述放射性标记方案制备了1、3、10、和40mCi Y2B8药剂。这些结果显示于表6，并证明将反应混合物的剂量由1mCi增加至40mCi对结合或放射性掺入没有不良影响。

表6

⁹⁰ Y的量 (mCi)	%对照结合	%放射性掺入
1	100	99.2
3	102	99.1
10	98.6	99.0
40	98.2	99.0

2. 加入不足体积的醋酸钠的影响

当使用少了20%的不足体积的50mM 醋酸钠且将温育时间延长60%来制备Y2B8时，相对于遵循“标准”标记条件制备的放射性标记抗体，保留了实质性结合（下文表7）。甚至当使用星期一标记条件进行标记反应时，保留了>89%的对照结合。星期五药剂制备获得了相似结果。无论哪天制备药剂，这些偏差不影响放射性掺入。

3. 加入过量体积的⁹⁰YCl₃的影响

当使用20%过量体积的⁹⁰YCl₃且将温育时间相比于正常所用延长60%来制备Y2B8时，相对于“标准”标记条件，保留了实质性结合（下文表7）。无论是对于星期一还是星期五剂量制备，当标记反应增加至8分钟时，相对于对照，结合仍保持>90%。无论哪天制备药剂，加入20%过量体积的⁹⁰YCl₃不影响放射性掺入。

4. 加入不足体积的抗体缀合物的影响

当使用少了20%的不足体积的缀合物(2B8-MX-DTPA)且将温育时间延长60%来制备Y2B8时,相对于根据“标准”标记条件制备的Y2B8,结合没有受到显著影响(下文表7)。无论哪天制备药剂,加入少了20%的不足体积的缀合物不影响放射性掺入。

表7

标记偏差	星期一剂量制备 ^a		星期五剂量制备 ^b	
	%结合对照 ^b	%放射性掺入	%结合对照 ^b	%放射性掺入
1) 醋酸钠体积少20%	89.4	99.1	92.5	98.7
2) 反应时间增加60% (8min)				
1) ⁹⁰ Y体积过量20%	90.6	99.1	91.8	98.6
2) 反应时间增加60% (8min)				
1) 抗体体积少20%	98.9	99.0	98.7	98.6
2) 反应时间增加60% (8min)				

^a对于星期一剂量制剂,反应液中⁹⁰Y的浓度为17mCi/mL;用于星期五标记的⁹⁰Y的浓度为8mCi/mL。

^b结合值以根据临床药剂方案(RSBR-005)使用“标准”试剂体积和5分钟反应时间制备的标记抗体为标准。

5. 组合试剂偏差的影响

当同时进行所有4项偏差的方案制备Y2B8时,相对于使用“标准”标记条件制备的放射性标记抗体,仍基本维持了结合(下文表8)。甚至当将星期一制备的温育时间比常用最大值6分钟延长30%时,结合仍>83%。无论哪天制备药剂,甚至在温育8分钟后,这些累积性偏差不显著影响放射性掺入。

表8

星期一剂量制备		
标记时间 (min)	% 结合对照	% 放射性掺入
2	97.6	98.7
4	93.7	98.8
6	89.5	98.8
8	83.2	98.6
星期五剂量制备		
标记时间 (min)	% 结合对照	% 放射性掺入
2	98.6	99.0
4	98.5	99.2
6	96.0	99.1
8	92.1	99.1

V. 讨论

为了降低操作者的辐射暴露，评价了较小的标记反应而非全剂量制备。由此，我们证实了在该研究中评价的1mCi和10mCi标记可预测全剂量40mCi制备。结果证明在1 - 40mCi范围内结合和放射性掺入没有显著差异。

我们决定用醋酸钠、 $^{90}\text{YCl}_3$ 、和缀合抗体体积偏差20%代表放射性标记方案中的可能的极端偏差。此外，温育8分钟（比标准长3分钟）作为显著方案偏差。通常，由于 $^{90}\text{YCl}_3$ 的半衰期短，放射性同位素的体积将取决于在周几制备药剂而变化。因此，使用代表星期一和星期五的 $^{90}\text{YCl}_3$ 浓度来进行这份报告中描述的实验，以表达全范围可能的药剂制剂。

使用20%不足体积醋酸钠且温育8分钟制备的Y2B8药剂，相对于标准标记条件，保留了显著结合(>89%)。星期一或星期五制备的药剂获得了相似结果。这项醋酸钠体积偏差不影响放射性掺入。

对于星期一和星期五，加入20%过量体积的 $^{90}\text{YCl}_3$ 且温育长达8分钟，

相对于标准剂量制备条件，结合都降低了。然而，结合仍>90%，高于标准释放规格。星期五药剂制剂的结合略好。增加⁹⁰YCl₃的体积不显著影响放射性掺入。

为了评价同时出现所有体积偏差的影响，制备了星期一和星期五药剂，比较了2、4、6、和8分钟的温育时间。只有当星期一制备Y2B8且使用8分钟温育时间时，相对于86.3%的标准释放规格，83.2%的结合略微低于标准规格。

参考文献

此处引入下列每项引文作为参考文献：

图1A

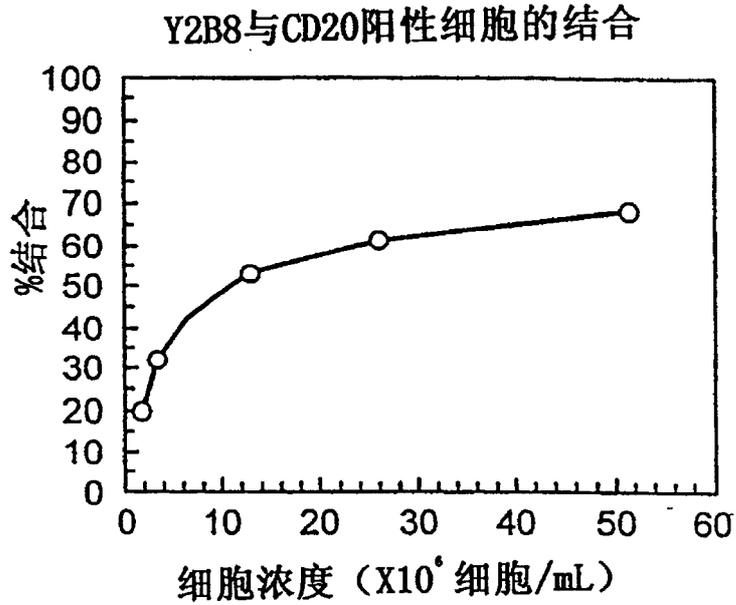
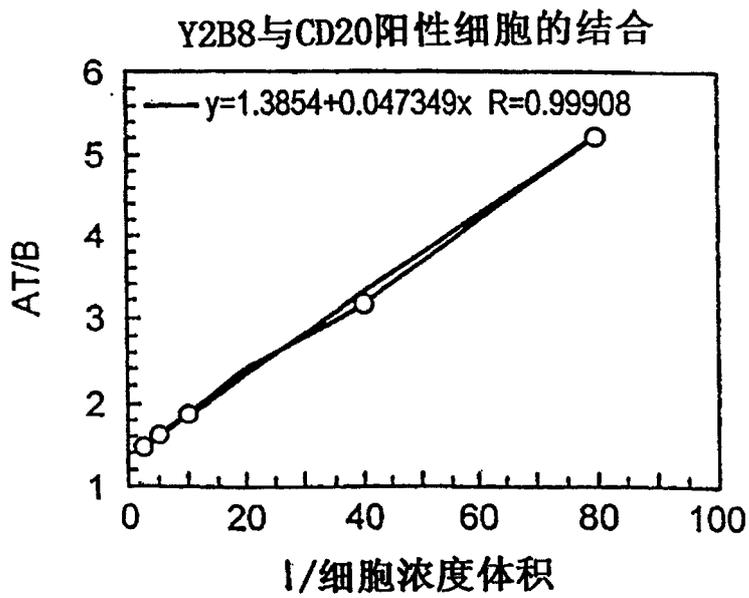


图1B



专利名称(译)	用钇 - 90放射性标记蛋白质的试剂盒		
公开(公告)号	CN1251767C	公开(公告)日	2006-04-19
申请号	CN00805729.X	申请日	2000-02-29
[标]申请(专利权)人(译)	IDEC药物公司		
申请(专利权)人(译)	IDEC药物公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜奥根IDEC公司		
[标]发明人	P·钦		
发明人	P·钦		
IPC分类号	A61K51/08 A61K51/10 A61K103/32 C07K1/13 A61P35/00 C07B59/00 G01N33/534		
CPC分类号	G01N33/534 A61K51/1027 A61K51/1093 A61P35/00		
优先权	09/259338 1999-03-01 US		
其他公开文献	CN1345249A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用辐射分解同位素(特别是钇-90)放射性标记蛋白质和肽, 由此获得足够的纯度、比活性、和结合亲和力的方法和试剂盒, 使得放射性标记的蛋白质可以直接施用于患者而不需要进一步的柱纯化。这些试剂盒和方法在为医院和门诊病人的癌症治疗提供放射免疫疗法方面特别有用。

Y2B8与CD20阳性细胞的结合

