

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-529081
(P2005-529081A)

(43) 公表日 平成17年9月29日(2005.9.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/465	C07K 14/465	4C084
A61K 38/00	A61K 39/395	D 4C085
A61K 39/395	A61K 39/395	N 4H045
A61K 49/00	A61K 49/00	A
A61K 51/00	A61P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-574233 (P2003-574233)
 (86) (22) 出願日 平成15年3月6日(2003.3.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年11月8日(2004.11.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/IT2003/000135
 (87) 国際公開番号 W02003/075960
 (87) 国際公開日 平成15年9月18日(2003.9.18)
 (31) 優先権主張番号 RM2002A000128
 (32) 優先日 平成14年3月8日(2002.3.8)
 (33) 優先権主張国 イタリア(IT)

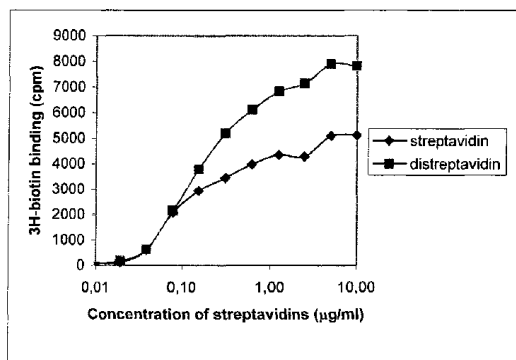
(71) 出願人 591043248
 シグマータウ・インドゥストリエ・ファル
 マチュウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル
 ・アチオニ
 SIGMA-TAU INDUSTRIE
 FARMACEUTICHE RIUN
 ITE SOCIETA PER AZI
 ONI
 イタリア00144ローマ、ピアレ・シャ
 ケスベアレ47番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プレ標的化放射免疫療法における放射性ビオチンの濃度上昇に有効なアビジン二量体

(57) 【要約】

アビジンおよびストレプトアビジンの二量体(ジアビジン)が記載され、ここでリンカーはスベレートであり、それはアビジンの様々な官能基(-NH₂ または -COOH)に結合する。アビジンと比較して、ジアビジンは、支持体上のヒトテネイシン、ビオチン化抗テネイシンモノクローナル抗体(Mab-B)、アビジン/ジアビジン、およびビオチン-³Hを用いたインビトロプレ標的化試験に用いた場合、標的上の標識化ビオチンの量を上昇させる能力を示す。かかるジアビジンの、三段階プレ標的化放射免疫療法に基づく癌の診断および抗癌治療における使用も記載される。



- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
スベレートによって -NH₂ 基を介して 2 分子のアビジンが結合しているアビジン二量体。
- 【請求項 2】
分子量 3400 のポリエチレングリコールによって -COOH 基を介して 2 分子のアビジンが結合しているアビジン二量体。
- 【請求項 3】
アビジンがストレプトアビジンである請求項 1 または 2 の二量体。
- 【請求項 4】 10
請求項 1 - 3 のいずれかの二量体を含む医薬組成物および / または診断組成物。
- 【請求項 5】
非経口投与または局所投与されうる請求項 4 の組成物。
- 【請求項 6】
請求項 1 - 3 のいずれかの二量体の医薬および診断手段の調製のための使用。
- 【請求項 7】
請求項 1 - 3 のいずれかの二量体の病的状態の器官または組織の診断または治療に有用な医薬の調製のための使用。
- 【請求項 8】 20
請求項 1 - 3 のいずれかの二量体の腫瘍の治療または診断に有用な医薬または診断手段の調製のための使用。
- 【請求項 9】
請求項 1 - 3 のいずれかの二量体のインビトロでの抗体を用いたプレ標的化方法における使用。
- 【請求項 10】
請求項 1 - 3 のいずれかの二量体の抗体を用いるプレ標的化方法を使用する疾患の治療に有用な医薬の調製のための使用。
- 【請求項 11】
該疾患が腫瘍である請求項 10 の使用。
- 【請求項 12】 30
該抗体が抗テネイシン抗体である請求項 10 の使用。
- 【請求項 13】
該抗テネイシン抗体がモノクローナル抗体である請求項 12 の使用。
- 【請求項 14】
該医薬が三段階プレ標的化技術による腫瘍の診断および治療に有用なキットの一部である請求項 10 の使用。
- 【請求項 15】
該キットが放射性医薬品を含む請求項 14 の使用。
- 【請求項 16】 40
キットの少なくとも 1 つの成分が請求項 1 または請求項 2 の二量体を含むことを特徴とする腫瘍の放射線治療または診断用キット。
- 【請求項 17】
プレ標的化技術に用いる請求項 16 のキット。
- 【請求項 18】
該プレ標的化技術が三段階プレ標的化技術である請求項 17 のキット。
- 【請求項 19】
ビオチン化抗テネイシン抗体を含む請求項 16、17 または 18 のいずれかのキット。
- 【請求項 20】
該抗体がモノクローナル抗体である請求項 19 のキット。
- 【発明の詳細な説明】 50

【技術分野】

【0001】

本明細書に記載する本発明は、腫瘍の診断および治療、特にいわゆる三段階プレ標的化 (pretargeting) 方法において有用なアビジン誘導体に関する。

【0002】

本明細書に記載する本発明は、ヒトおよび動物の診断および治療における使用、特に、腫瘍などの病的状態の診断および治療に有用な改変アビジンに関する。

【0003】

本明細書に記載する本発明は、医薬および診断手段の調製の技術分野に関し、医薬分野での工業用途に好適な化合物、その調製方法、その使用方法およびそれを含む組成物を提供

10

【0004】

本明細書に記載する本発明は、診断薬および治療薬において、画像取得技術として、そして病的状態の器官および組織の治療に有用な化合物、組成物および方法を提供する。

【0005】

特に、これに限定されるわけではないが、本発明は放射性医薬品による腫瘍治療の分野に関する。

【背景技術】

【0006】

腫瘍治療は主に腫瘍細胞を殺傷するための物質を使用することによって行われている。これは細胞毒性物質を用いることにより達成されるが、細胞毒性物質はその効果を完全に発揮するには腫瘍細胞に侵入する必要がある。あるいは細胞を殺傷するに十分なエネルギーを有する放射による腫瘍細胞の治療によっても達成される。両方の場合において、周囲の健康な細胞に損傷を与えることを避けるために標的細胞にできるだけ選択的に物質を送達しなければならないという問題がある。放射性医薬品、即ち放射性部分を有する物質を用いる場合、活性部分（即ち、放射性部分）を、放射性核種が体内または腫瘍周囲の健康な細胞に拡散しないように選択的に腫瘍標的に送達しなければならないという問題が特に指摘される。

20

【0007】

腫瘍の検出および治療の1つの特に有効な方法が欧州特許第0496074号に記載されている。この特許のプロトコールは脳腫瘍のいわゆるプレ標的化抗体ガイド (Guided) 放射免疫療法 (PAGRIT) に適用されている。この方法において、ビオチン化抗テネイシンモノクローナル抗体 (M a b - B) の後にアビジンがヒト対象に注射され、腫瘍に結合していない遊離の M a b - B と複合体を形成することによって遊離の M a b - B が血流から除去され、かかる複合体は肝臓により効率的に除去される (除去効果)。ストレプトアビジンの注入はアビジンと比べて良好な腫瘍のアビジン化を達成するために行われる。アビジンの血中耐久性はストレプトアビジンと比べて非常に短い。

30

【0008】

該システムは陽性の臨床応答を示したが (Cremonesi, M. et al., 1999; Paganelli, G. et al., 1999; Paganelli, G. et al., 2001)、1つの主な限定要因はストレプトアビジンによる強い免疫応答にある (Paganelli, G. et al., 1997)。かかる2つの障害、即ちストレプトアビジンの高い免疫原性およびアビジンの迅速なクリアランスを克服するために、アビジンにポリオキシエチレングリコール (P E G) 鎖を共有結合させることによって化学的に改変されたアビジンが用いられてきた。その誘導体化のレベルは様々な分子量の直鎖状または分枝状の P E G の使用によって変動する。予備的研究により、P E G によるアビジンの機能化 (以下 P E G 化と称する) の程度が上昇するにつれ、アビジンの血漿半減期が長くなり、免疫原性が低減され、腫瘍に関する物質の特異的体内分布が向上することが示された。

40

【0009】

アビジン - P E G の M a b - B ビオチンへの結合能は P E G 化によって低下する結果、

50

誘導体の強度が低減してしまうことになる(Chinol、M. et al.、1998)。

【0010】

この問題に対する解決が国際特許出願第WO94/23759号(出願人Immunomedics)によって提案されており、好ましくは5,000Da以上の高分子量分子(デキストラン、タンパク質およびポリカルボン酸など)の化学的誘導体化に基づくアビジンマルチポリマーが記載されている。しかし、5つの多量体のいずれについてもその特許においてはプレ標的化またはその他の方法における作用強度の点に関しては十分に特徴づけられていない。

【0011】

本明細書に記載する本発明で示されているように、上記国際特許出願第WO94/237599号により提供される多量体化(二量体化も含む)の一般概念では、三段階プレ標的化方法の適用において必要な要求を満たすことができる一般的なアビジン多量体を当業者が見い出すに完全かつ十分な教示がなされていない。実際、種々の二官能性クロスリンカーを用いて得られる種々のジアビジンは、遊離のビオチンに対する結合能力は同様に有しているものの、三段階プレ標的化にてインビトロでアッセイした場合のその能力が、場合によっては完全に無効であることが判明している。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

上記観察により、アビジンの多量体化によっては自動的に有用な機能的産物を得ることはできず、プレ標的化に好適な能力の高い分子の選択のために生物学的特徴付けが必要であることが示された。

20

【課題を解決するための手段】

【0013】

(発明の概要)

このたび、アビジンのアミノおよび/またはカルボキシ基と結合することができる二官能性リンカーによって2分子のアビジンを結合させることにより、PAGRITとして知られる腫瘍治療方法での使用の要求を満たす2種類のアビジン二量体が見いだした。かかるリンカーはジスクシニミジルスベレート(suberate)(これにより得られる二量体を以下ジアビジン1と称する)および分子量3400のPEGジアミン(これにより得られる二量体を以下ジアビジン2と称する)から選択される。

30

【0014】

したがって、本明細書に記載する本発明の目的は、2分子のアビジンがスベレートによって-NH₂基を介して結合しているアビジン二量体および2分子のアビジンが分子量3400のポリエチレングリコールによって-COOH基を介して結合しているアビジン二量体である。

【0015】

本明細書に記載する本発明のさらなる目的は上記ジアビジンを含む医薬組成物および/または診断組成物である。

【0016】

本発明の別の目的は、病的状態の器官および組織のための医薬または診断薬として、特に腫瘍の治療または診断に有用な医薬の調製のためのジアビジンの使用である。

40

【0017】

これらおよびその他の本発明の目的は実施例によって以下により詳細に説明される。

【0018】

(発明の詳細な説明)

本発明においては、アビジンとはアビジンおよびストレプトアビジンの両方を意味するが、本発明の特定の態様としてストレプトアビジンを用いる場合は、そのことを特に言及する。

【0019】

50

ジアビジン 1 はアビジンと活性エステルとして N - ヒドロキシスクシニミジル (N H S エステル) を有するジスクシニミジルスベレート (D S S) を反応させることにより調製した。D D S は、アビジンの - N H ₂ 基との結合において反応性のホモ二官能性クロスリンカーである。

【 0 0 2 0 】

ジアビジン 2 およびジアビジン 3 (陰性対照) をそれぞれホモ二官能性クロスリンカーとして分子量 3 4 0 0 の P E G ジアミン (P E G (N H ₂) ₂) および分子量 3 4 0 0 のポリエチレングリコール - ジスクシニミジルプロピオン酸 [P E G (S P A) ₂] を用いて作成した。

【 0 0 2 1 】

アビジンと比べてストレプトアビジンは循環系からゆっくりと除かれるため、ジストレプトアビジンが本発明の特に好ましい態様である。半減期がより長いということは、アビジンの効力を最大限に増加させるのに重要である。ストレプトアビジンのクロスリンキングのプロトコールはジアビジン 1 産生に用いたものと同様であった。

【 0 0 2 2 】

本明細書に記載する本発明による医薬組成物または診断組成物は、本明細書に記載するジアビジンの少なくとも 1 つを含む。ジアビジンは好適な媒体および / または賦形剤との混合物とされよう。媒体および / または賦形剤は薬学で通常用いられているものであり、例えば " Remington ' s Pharmaceutical Sciences Handbook " 最新版に記載されているものが挙げられる。本発明による組成物は有効量のジアビジンを含むものである。

【 0 0 2 3 】

医薬組成物の好適な例は、非経口および局所投与可能なものである。この目的に好適な医薬組成物は、溶液、懸濁液、または使用時に再構成される凍結乾燥された形態のものである。

【 0 0 2 4 】

本発明によるジアビジンの使用は、抗体によるプレ標的化として知られる技術による、病的状態の組織 (例えば腫瘍) の診断または治療のための医薬または診断手段の調製として特に好適であり、インビトロプレ標的化技術にも好適である。例示的な 1 つの態様において、プレ標的化技術はビオチン化抗テネイシン抗体、好ましくはモノクローナル抗体を用いて行われる。

【 0 0 2 5 】

本発明の工業用途に好適な形態は、診断または治療用、特に腫瘍の放射線治療用のキットである。かかるキットは例えば、欧州特許第 0 4 9 6 0 7 4 号、Paganelli, Chinol et al. の研究 (European Journal of Nuclear Medicament Vol. 26, No 4; April 1999; 3 48-357)、米国特許第 5 9 6 8 4 0 5 号および関連する文献に記載されている。

【 0 0 2 6 】

本明細書に記載する本発明のさらなる目的は、特に、例えば、プレ標的化方法、好ましくは三段階プレ標的化方法などの、放射能による腫瘍の治療または診断用キットであり、該キットの少なくとも 1 つの成分がジアビジンを含むことを特徴とする。該キットにおいて、1 つの好適なビオチン化抗体は抗テネイシン抗体であり、より好ましくはモノクローナル抗体である。

【 0 0 2 7 】

以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 8 】

ジアビジン 1

1 m l のアビジン溶液 (P B S 中 3 0 0 μ M、p H 7 . 4) を、2 5 μ l の D S S (P i e r c e) (D M S O 中 2 5 m M) と混合した (アビジン : D S S 比 : 1 : 2) 。混合物を 0 で 2 時間インキュベートした後、反応を 5 0 μ l の T r i s (1 M、p H 8 . 0) でブロックした。上記反応比の選択は 1 : 1 から 1 : 1 0 の比を用いた予備的試験に基づいて行

10

20

30

40

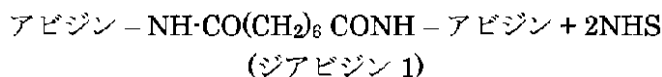
50

った。

【0029】

反応スキームは以下の通りである：

【化1】



10

【実施例2】

【0030】

ジアビジン 2

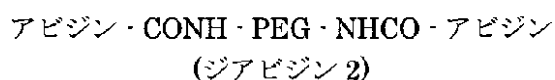
1 ml のアビジン (PBS 中 450 μM、pH 7.4) を、120 μl の PEG (NH₂)₂ (Shearwater Corp.) (H₂O 中 9 mM) および 50 μl の 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド-HCl (EDAC) (DMSO 中 260 mM) (アビジン：PEG 比：およそ 1：2.5) と混合し、2 時間室温で反応させた。この期間の最後に 50 μl の Tris (1 M、pH 8.0) を添加し、混合物をゲルろ過にかけた。反応 pH 4.0 から 8.0 で 1：1 から 1：10 の範囲でアビジン：PEG 比について調べた。Sims et al.、1980 に記載の方法を用いて精製したジアビジン 2 最終産物の PEG：アビジン比の値は 0.9 であった。簡単に説明すると、ジアビジン 2 を水中 300 μM に希釈し、250 μl の HCl (1 N) 中 5% の BaCl₂ を 1 ml の容積に添加し、250 μl の溶液を 1.27 g の I₂ を 100 ml の KI 2% に混合することによって調製した。混合物を 15 分間インキュベートし、吸光度を 535 nm にて測定した。検量線を PEG (NH₂)₂ について得た。

20

【0031】

ジアビジン 2 の反応スキームは以下の通りである：

【化2】



30

【実施例3】

【0032】

ジアビジン 3

1 ml のアビジン (PBS 中 150 μM、pH 7.4) を、20 μl の PEG ジスクシニミジル-プロピオネート (SPA-PEG-SPA) (H₂O 中 20 mM) (アビジン：PEG 比：1：3.5) と混合し、0 で 2 時間反応させた。この反応比は 1：2 から 1：10 の範囲の比について行った予備的試験に基づいて選択した。精製した二量体の PEG：アビジン比の値は上記の Sims et al. によって開発された方法を用いて測定したところ、3：1 であった。

40

【0033】

反応スキームは以下の通りである：

【化 3】

アビジン・NH₂ + NHS・CO・CH₂CH₂OPEGOCH₂CH₂CONHS + H₂N・アビジン



アビジン-NHCOCH₂CH₂OPEGOCH₂CH₂CONH・アビジン
(ジアビジン 3)

【0034】

実施例 1、2 および 3 に記載の 3 つの反応によって得られたジアビジンの収率はおよそ 20 - 30 % であった。反応において 3 種のリンカーの量を増加させると、アビジンオリゴマーの最終収量も高くなり（三量体など、示さず）、その結果クロマトグラフィーによる分離が困難となった。反応混合物を Superdex 200 - 10 / 30 ゲルろ過カラムで分析し、生成物の精製は Superdex 200 - 16 / 60 カラムにて行った。ジアビジン 1、2 および 3 の反応混合物のクロマトグラフィープロファイルをそれぞれ図 1 a、b および c に示す。一連の標準タンパク質の分子量（校正）をそれぞれの溶出時間において示す。カラムの校正は図 1 d に示す：デキストラブルー（Vo）、フェリチン（444 KDa）、アルドラゼ（158 KDa）、アルブミン（67 KDa）、およびリボヌクレアーゼ（14 KDa）を用いた。

10

【0035】

精製したアビジン二量体を図 1 e、f および g に示す。サンプルを Superdex 200 - 10 / 15 で PBS 中で流速 0.5 ml / 分（a - d）および 1 ml / 分（e - g）にて Jasco HPLC システム（280 nm 分光光度計に連結）を用いて分離した。

20

【実施例 4】

【0036】

ジストレプトアビジン

1 ml のストレプトアビジン（PBS 中 300 μM、pH 7.4）を 25 μL の DSS（DMSO 中 25 mM）と、ストレプトアビジン：DSS 比 1：2 で混合し、0 で 2 時間インキュベートした後、反応を 50 μL の TRIS（1 M、pH 8.0）でクエンチした。全部で 4 つの反応条件についてストレプトアビジン：DSS の範囲 1：1 から 1：10 の比にて試験した。本発明者らは上記の比、1：2 を選択した。

30

【0037】

反応スキームは上述の実施例に記載したものと同様とした。

【0038】

反応の最後のクロスリンク混合物のジストレプトアビジンについてのクロマトグラフィープロファイルを図 5 a に示す。精製したジストレプトアビジンを図 5 b に、ストレプトアビジンを 5 c に示す。サンプルは Superdex 200 - 10 / 15 カラムで PBS 中流速 1 ml / 分で Jasco HPLC システム（280 nm の吸光度を測定する分光光度計に連結）で分析した。

40

【0039】

ジアビジンのビオチンへの結合能力の測定

アビジンとジアビジンのビオチンに結合する能力を比較するため、HABA（4 - ヒドロキシ - アゾベンゼン - 2' - カルボン酸）法を用いた。アビジンおよびジアビジンはすべて 0.1 M ホスフェート、0.4 mM HABA、pH 7.0 中 3 μM の 67 KDa アビジン単量体に対応する濃度とした。次ぎにホスフェートに溶解したビオチンを終濃度 0 から 20 μM の範囲で添加し、吸光度を 500 nm にて測定した。

【0040】

ビオチンへの結合能力は、結合している HABA の 50 % を置換するのに必要なビオチン濃度として評価した。

【0041】

50

およそ $5 \mu\text{M}$ のビオチンにより、アビジンおよび3種のジアビジンについて50%のHABAを置換することができた(図2)。このことから、ジアビジンはクロスリンク後も結合部位の総数を維持していることが推測される。ジアビジンのビオチン結合特性はアビジンと匹敵するものであった。

【0042】

インビトロプレ標的化アッセイ

ビオチン化抗テネイシンモノクローナル抗体(Mab-B)を介するテネイシンに対する放射標識化ビオチンの結合量を増加させるジアビジンの能力を調べるため、図3に模式的に示すインビトロプレ標的化アッセイを用いた。

【0043】

簡単に説明すると、96-ウェルプレートに $0.5 \mu\text{g}$ / ウェルのヒトテネイシン(Tn-C)を4で16時間吸着させた。PBSおよび0.1% Tween 20での3回の洗浄後、ウェルに残っている吸着部位をPBS 2%、BSA 2%および0.1% Tween 20で1時間室温でブロッキングした。2種類のビオチン化抗テネイシンモノクローナル抗体(ST2146またはST2077)をウェル中で2時間、飽和濃度である $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ にてインキュベートした。上記のように洗浄した後、アビジンまたはジアビジンをウェル中で二連で様々な濃度にてインキュベートした。最後に、飽和量の 5pmol のビオチン- ^3H ($1.6 \text{TBq}/\text{mmol}$) を各ウェル中で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートの読みを - カウンターで得た。図4に示すように、使用した2種類のMabについて、ジアビジン1およびジアビジン2ではアビジンと比べて結合したビオチン量が多かった；ジアビジン3はMab ST2146については増加を示さず、Mab ST2077との結合能力については減少を示した。

10

20

【0044】

アビジンと比較して、濃度 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のジアビジン2はMab ST2077を介してのビオチン- ^3H 結合量が2.1倍増加していた(3回の実験の平均)。ジアビジン1については増加は1.6倍であった(6回の実験の平均)。一方、ジアビジン3についてはアビジン単量体と比較して結合能力は低かった(90%)。

【0045】

これらの実験から、リンカーの長さやジアビジン二量体に含まれる結合部位の両方が、ビオチン化抗体を介するプレ標的化における二量体の活性に影響を及ぼすことが結論される。

30

【0046】

ジストレプトアビジンは図6に示すように、インビトロでストレプトアビジンより強力であることが判明した。

【0047】

マイクロタイター96ウェルプレートを $0.5 \mu\text{g}$ / ウェルのヒトTnCで4で16時間被覆し、PBS、0.1% Tween-20で3回洗浄し、PBS/2% BSA/0.1% Tween-20によって非特異的結合をブロッキングした。ビオチン化抗-TnC抗体ST2146を濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ にて2時間添加した。ウェルをPBS/Tween-20で3回洗浄し、その後ストレプトアビジンまたはジストレプトアビジンを示された濃度にて添加した。最後に、 5pmol の ^3H -ビオチン($1.6 \text{TBq}/\text{mmol}$) を添加し、ウェルを2時間インキュベートし、洗浄して - カウンターでカウントした。

40

【0048】

図6に示すように、ジストレプトアビジンはストレプトアビジンと比較して放射標識化ビオチンの結合を上昇させる。

【0049】

(参考文献)

Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E.S., Caliceti P., Veronese F.M., Cremonesi M., Chiolerio F., Nardone E., Siccardi A.G., Paganelli G. B

50

biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. *British Journal of Cancer* 78(2): 189-197, 1998.

Cremonesi M., Ferrari M., Chinol M., Stabin M. G., Grana C., Prisco G., Robertson C., Tosi G., Paganelli G. Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin: dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients. *Eur J Nucl Med* 26(2):110-120, 1999.

Paganelli G., Chinol M., Maggiolo M., Sidoli A., Corti A., Baroni S., Siccardi A. G. The three-step pretargeting approach reduces the human anti-mouse antibody response in patients submitted to radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med* 24:350-351, 1997. 10

Paganelli G., Grana C., Chinol M., Cremonesi M., De Cicco C., De Braud F., Robertson C., Zurrada S., Casadio C., Zoboli S., Siccardi A. G., Veronesi U. Antibody-guided three step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur J Nucl Med* 26(4):348-357, 1999.

Paganelli G., Bartolomei M., Ferrari M., Cremonesi M., Broggi G., Maira G., Sturiale C., Grana C., Prisco G., Gatti M., Caliceti P., Chinol M. Pre-targeted local regional radioimmunotherapy with ⁹⁰Y-biotin in glioma patients: Phase I study and preliminary therapeutic results. *Cancer Biother & Radiopharm* 16(3):227-235, 2001. 20

Sims G.E.S. and Snape T.J. A method for estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions. *Anal Biochem* 107:60-63, 1980.

【図面の簡単な説明】

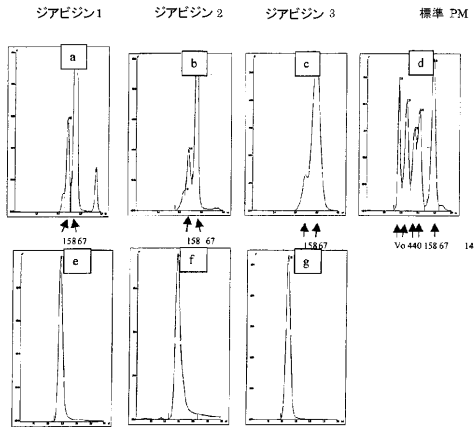
【0050】

(原文に記載無し)

【 図 1 】

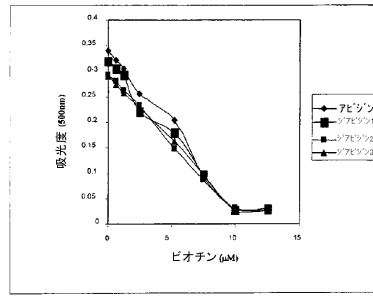
FIGURE 1

ゲルろ過によるジアビジン1, 2および3の分離



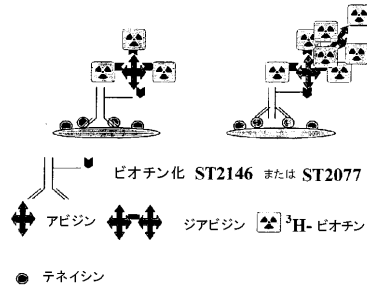
【 図 2 】

FIGURE 2



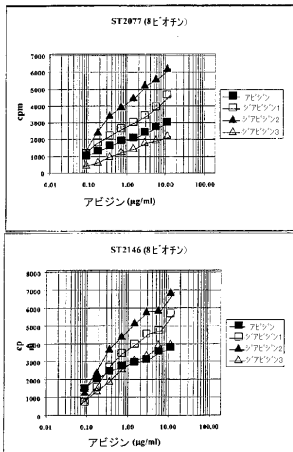
【 図 3 】

FIGURE 3



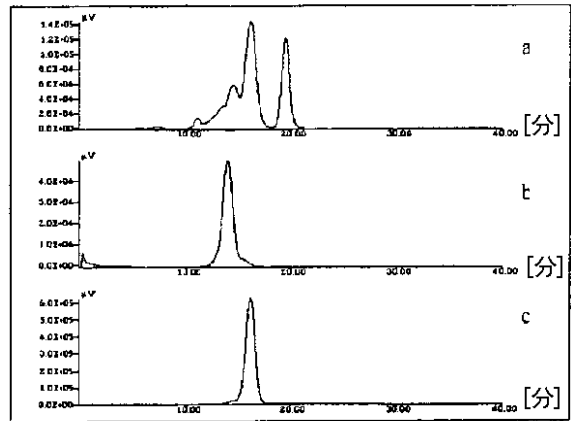
【 図 4 】

FIGURE 4



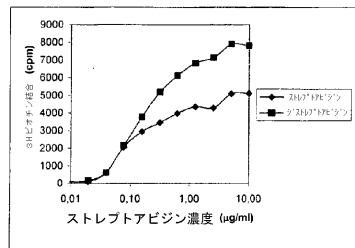
【 図 5 】

FIGURE 5



【 図 6 】

FIGURE 6



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/IT 03/00135
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K47/48 A61K51/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 482 698 A (GRIFFITHS GARY L) 9 January 1996 (1996-01-09) cited in the application examples 5,14,15 ---	1-20
A	CHINOL M ET AL: "Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity." BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 78, no. 2, July 1998 (1998-07), pages 189-197, XP009012930 ISSN: 0007-0920 cited in the application figure 2; table 2 --- -/-	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 June 2003		Date of mailing of the international search report 10/07/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lanzrein, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/IT 03/00135

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	REZNIK G O ET AL: "STREPTAVIDINS WITH INTERSUBUNIT CROSSLINKS HAVE ENHANCED STABILITY" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 14, August 1998 (1998-08), pages 1007-1011, XP002926127 ISSN: 1087-0156 ---	
A	CHINOL M ET AL: "BIODISTRIBUTION IN TUMOUR-BEARING MICE OF TWO 90Y-LABELLED BIOTINS USING THREE-STEP TUMOUR TARGETING" NUCLEAR MEDICINE COMMUNICATIONS, XX, XX, vol. 18, no. 2, February 1997 (1997-02), pages 176-182, XP008008175 ISSN: 0143-3636 ---	
A	CREMONESI M ET AL: "THREE-STEP RADIOIMMUNOTHERAPY WITH YTTRIUM-90 BIOTIN: DOSIMETRY AND PHARMACOKINETICS IN CANCER PATIENTS" EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, BERLIN, DE, vol. 26, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 110-120, XP000984147 ISSN: 0340-6997 cited in the application ---	
A	HART P R ET AL: "HPMA COPOLYMER-MODIFIED AVIDIN: IMMUNE RESPONSE" JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE. POLYMER EDITION, VSP, UTRECHT, NL, vol. 11, no. 1, 2000, pages 1-12, XP008005603 ISSN: 0920-5063 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IT 03/00135

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 6-15 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple Inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/IT 03/00135

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5482698	A	09-01-1996	AU 674580 B2 02-01-1997
			AU 6666694 A 08-11-1994
			CA 2161109 A1 27-10-1994
			EP 0695194 A1 07-02-1996
			JP 8509226 T 01-10-1996
			SG 46472 A1 20-02-1998
			WO 9423759 A1 27-10-1994

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	G 0 1 N 33/53	U
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 K 49/02	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 リタ・デ・サンティス

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ
- タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

(72) 発明者 ラグナー・リンドステット

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ
- タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

(72) 発明者 カルロ・アントニオ・ヌッツォロ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ
- タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA44 NA14 ZB262

4C085 AA13 AA14 BB11 EE01 HH03 KA29 KB82 LL18

4H045 AA10 AA30 BA10 BA50 CA40 DA86 EA20 EA50 FA51

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005529081A5	公开(公告)日	2006-05-11
申请号	JP2003574233	申请日	2003-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	希格马托制药工业公司		
申请(专利权)人(译)	西格玛 - 头Indusutorie医药崔宇智科Riunite , Soshietal佩尔 - Achioni		
[标]发明人	リタデサンティス ラグナー・リンドステット カルロアントニオヌツツォロ		
发明人	リタ・デ・サンティス ラグナー・リンドステット カルロ・アントニオ・ヌツツォロ		
IPC分类号	C07K14/465 A61K39/395 A61K49/00 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/577 A61K38/00 A61K51/00		
CPC分类号	A61K47/665 A61K47/6898 A61K51/0497 A61P25/00 A61P35/00 B82Y5/00 C07K16/30 A61K47/50 A61K51/10 C07K14/435 C07K14/46		
FI分类号	C07K14/465 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K49/00.A A61P35/00 G01N33/53.U G01N33/577.B A61K37/02 A61K49/02.A		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/EE01 4C085/HH03 4C085/KA29 4C085/KB82 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA51		
代理人(译)	田中，三夫		
优先权	102002900999702 2002-03-08 IT		
其他公开文献	JP2005529081A JP4362376B2		

摘要(译)

抗生物素蛋白和链霉 (Jiabijin) 的二聚体中描述，其中所述接头是辛二酸盐，其结合到多种抗生物素蛋白的官能团 (-NH₂ 或 -COOH) 的。相比亲和素，Jiabijin是在载体上，生物素化抗链霉蛋白单克隆抗体 (MAB-B) ，抗生物素蛋白/ Jiabijin人链霉蛋白和生物素 - <SUP>3 </SUP> / SUP> Inbitoropure所述用H目标在试验中使用时，显示出增加对目标标记的生物素的量的能力。还描述了基于三阶段预靶向放射免疫疗法和抗癌治疗中的这种抗生物素蛋白在癌症诊断中的用途。