

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 538164

(P2002 - 538164A)

(43)公表日 平成14年11月12日(2002.11.12)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 0 7 K 1/02		C 0 7 K 1/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 51/00		A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00		C 0 7 K 16/00	
C 0 7 K 16/00		A 6 1 K 43/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 49数)

(21)出願番号 特願2000 - 602256(P2000 - 602256)

(86) (22)出願日 平成12年2月29日(2000.2.29)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月3日(2001.9.3)

(86)国際出願番号 PCT/US00/05078

(87)国際公開番号 W000/52031

(87)国際公開日 平成12年9月8日(2000.9.8)

(31)優先権主張番号 09/259,338

(32)優先日 平成11年3月1日(1999.3.1)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アイデック・ファーマシューティカルズ・コーポレーション
 IDEC PHARMACEUTICAL CORPORATION
 アメリカ合衆国92121 - 1104カリフォルニア州サンディエゴ、トレヤナ・ロード11011番

(72)発明者 チン、ポール
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 92084 ピスタ、パークレー・ウェイ 815

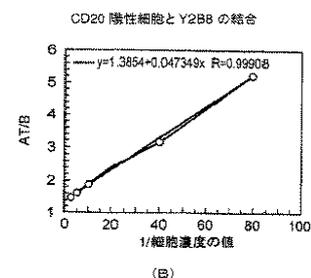
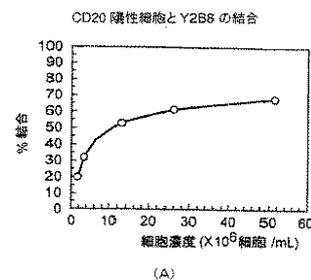
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質をイットリウム - 90 でラベルするためのキット

(57)【要約】

放射ラベルされたタンパク質が、さらなるカラム精製をせずに患者に直接投与されるような十分な重度、特異的活性、および結合親和性が得られるように、タンパク質またはペプチドを放射線分解性アイソトープ、特にイットリウム - 90 でラベルするための方法およびキットが開示される。このようなキットおよび方法は、特に、癌の治療のために病院および外来患者の設備で放射免疫療法をする際に有用であろう。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 患者に投与するための治療用放射性同位元素によってキレーター結合タンパク質またはペプチドを放射ラベルするための方法であって、

(i) キレーター結合タンパク質、またはペプチドを放射性同位体、またはその塩を含む溶液と混合すること、および

(ii) 放射ラベルされた抗体がさらなる精製をせずに患者に直接投与されてもよいような、十分な純度、特異的活性、および結合特異性が得られるようなよい条件下で、混合液を十分な時間インキュベートすること、を含む方法。

【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、前記治療用放射性同位体がアルファおよびベータエミッターから成る群から選択される方法。

【請求項3】 請求項2に記載の方法であって、前記治療用放射性同位体がベータエミッターである方法。

【請求項4】 請求項3に記載の方法であって、前記ベータエミッターが⁹⁰Yである方法。

【請求項5】 請求項1に記載の方法であって、前記タンパク質が抗体、または抗体断片である方法。

【請求項6】 請求項4に記載の方法であって、前記十分なインキュベーション時間が8分より短い方法。

【請求項7】 請求項6に記載の方法であって、前記十分なインキュベーション時間が2～5分の間である方法。

【請求項8】 請求項1に記載の方法であって、前記キレーターがMX-DTPA、フェニル-DTPA、ベンジルDTPA、CHX-DTPA、DOTA、およびその誘導体から成る群から選択される二官能価のキレーターである方法。

【請求項9】 請求項8に記載の方法であって、前記キレーターがMX-DTPAである方法。

【請求項10】 請求項4に記載の方法であって、前記よい条件が、許容可能な温度、PH、およびバッファー条件である方法。

【請求項11】 請求項10に記載の方法であって、前記許容可能な温度が、

約25 ~ 約43 の範囲である方法。

【請求項12】 請求項10に記載の方法であって、前記許容可能なpHが、約3.0~6.0の範囲である方法。

【請求項13】 請求項10に記載の方法であって、前記許容可能なバッファーが、アセテートバッファーである方法。

【請求項14】 請求項13に記載の方法であって、前記バッファーが約10~100mMの間の濃度の酢酸ナトリウムである方法。

【請求項15】 請求項10に記載の方法であって、前記許容可能なバッファーが、穏和な放射線保護材を含む方法。

【請求項16】 請求項15に記載の方法であって、前記穏和な放射線保護材がアスコルビン酸塩である方法。

【請求項17】 請求項1に記載の方法であって、前記少なくとも約95%の放射取り込みである方法。

【請求項18】 請求項1に記載の方法であって、前記結合特異性が少なくとも70%である方法。

【請求項19】 請求項5に記載の方法であって、前記抗体が少なくとも5mCi/mgの特異的活性でラベルされる方法。

【請求項20】 患者に投与するための治療用放射性同位元素によってキレーター結合タンパク質またはペプチドを放射ラベルするためのキットであって、

(i) キレーター結合タンパク質またはペプチドをバッファー中に含むバイアルと、

(ii) 放射ラベルされた抗体を安定化し、かつ患者に投与するための調合バッファーを含むバイアルと、および

(iii) 放射ラベル法を実施するための説明書であって、放射ラベルされたタンパク質またはペプチドが、前記説明書で推薦するようなよい条件下で放射性同位体またはその塩に暴露されたときに、前記放射ラベルされた抗体を調合バッファー中に適切な濃度に希釈して、かつさらなる精製をせずに患者に直接投与されてもよいような、十分な純度、特異的活性、および結合特異性を有する放射ラベルされたタンパク質またはペプチドが得られる説明書、

を含むキット。

【請求項21】 請求項20に記載のキットであって、前記治療用放射性同位体がアルファまたはベータエミット放射性同位体であるキット。

【請求項22】 請求項21に記載のキットであって、前記治療用放射性同位体がベータエミッターであるキット。

【請求項23】 請求項22に記載のキットであって、前記ベータエミッターが ^{90}Y であるキット。

【請求項24】 請求項20に記載のキットであって、前記タンパク質が抗体または抗体断片であるキット。

【請求項25】 請求項23に記載のキットであって、前記十分なインキュベーション時間が8分より短いキット。

【請求項26】 請求項25に記載のキットであって、前記十分なインキュベーション時間が2~5分の間であるキット。

【請求項27】 請求項20に記載のキットであって、前記キレーターがMX-DTPA、フェニル-DTPA、ベンジルDTPA、CHX-DTPA、DOTA、およびその誘導体から成る群から選択される二官能かのキレーターであるキット。

【請求項28】 請求項27に記載のキットであって、前記キレーターがMX-DTPAであるキット。

【請求項29】 請求項20に記載のキットであって、前記よい条件が、許容可能な温度、PH、およびバッファー条件であるキット。

【請求項30】 請求項29に記載のキットであって、前記許容可能な温度が、約25 ~ 約43 の範囲であるキット。

【請求項31】 請求項29に記載のキットであって、前記許容可能なpHが、約3.0~6.0の範囲であるキット。

【請求項32】 請求項29に記載のキットであって、前記許容可能なバッファーが、アセテートバッファーであるキット。

【請求項33】 請求項32に記載のキットであって、前記バッファーが約10~1000mMの間の濃度の酢酸ナトリウムであるキット。

【請求項34】 請求項29に記載のキットであって、前記許容可能なバッフ

ァーが、穏和な放射線保護材を含むキット。

【請求項35】 請求項34に記載のキットであって、前記穏和な放射線保護材がアスコルビン酸塩であるキット。

【請求項36】 請求項20に記載のキットであって、前記少なくとも約95%の放射取り込みであるキット。

【請求項37】 請求項20に記載のキットであって、前記結合特異性が少なくとも70%であるキット。

【請求項38】 請求項23に記載のキットであって、前記抗体が少なくとも5mCi/mgの特異的活性でラベルされるキット。

【請求項39】 さらに、放射性同位体のpHを合わせるための滅菌バッファのバイアルを含む請求項20に記載のキット。

【請求項40】 前記バイアルがアセテートバッファを含む請求項39に記載のキット。

【請求項41】 請求項20に記載のキットであって、前記調合バッファが生理食塩水、放射線保護材、および未結合のキレーターを含むキット。

【請求項42】 請求項41に記載のキットであって、前記放射線保護材が、ヒト血清アルブミン(HAS)、アスコルビン酸塩、アスコルビン酸、フェノール、亜硫酸塩、グルタチオン、システイン、ゲンチシン酸、ニコチン酸、パルミチン酸アスコルビル、HOP(:O)H₂、グリセロール、ホルムアルデヒドスルホキシル酸ナトリウム、Na₂S₂O₅、Na₂S₂O₃、およびSO₂から成る群から選択されるキット。

【請求項43】 請求項42に記載のキットであって、前記放射線保護材がアスコルビン酸塩であるキット。

【請求項44】 請求項43に記載のキットであって、前記アスコルビン酸塩の濃度が約1~100mg/mlであるキット。

【請求項45】 請求項42に記載のキットであって、前記未結合のキレーターがDTPAであるキット。

【請求項46】 請求項45に記載のキットであって、前記DTPAの濃度が約1mMであるキット。

【請求項47】 反応バイアルをさらに含む請求項20に記載のキット。

【請求項48】 放射性同位体バイアルをさらに含む請求項20に記載のキッ

ト。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、治療用放射性同位体でタンパク質およびペプチドを放射ラベルするためのキット、および方法であって、これらの放射ラベルされたタンパク質がさらに精製をする必要なく直接患者に投与してもよいようなキット、および方法に関する。このようなキットおよび方法は、特にイットリウム-90 (^{90}Y) でタンパク質およびペプチドをラベルするために適用可能である。さらに放射ラベルされたタンパク質を精製する必要がないように放射ラベルプロトコルを最適化することによって、本発明は、イットリウムラベルされた薬剤をこれらの薬剤が病院または外来患者の設備において容易に調製されかつ投薬されるように、使用者にわかりやすい形態としてどのように提供するか、という残されていた問題を解決することにより当業者が長い間探索していた要求を満たした。

【0002】**【技術背景】**

本明細書内の全ての刊行物および特許出願は、個々のそれぞれの刊行物または特許出願が本質的におよび個別に参照文献によって援用されることを指示したような同じ範囲で、本明細書によって援用される。

【0003】

放射ラベルされたタンパク質、特に抗体は、診断および治療薬となり得る可能性があるとして長年評価を受けてきた。このような試薬は、癌治療薬として特に有用であると考えられているので、現在研究者は、腫瘍特異的抗体および同族のリガンド、またはこのような抗原と結合する抗体の同定を開始している。飛程が短く、高エネルギーかつ豊富な粒子放射を有する放射性同位体と結合して放射ラベルされた、腫瘍特異的抗原に特異的に結合するリガンドまたは抗体を投与することによって、腫瘍細胞に直接致死量の放射線を送達する能力を有する。

【0004】

特定アイソトープの粒子飛程によって、特定の細胞タイプをターゲティングするために、その安定性に基づいて、ラベルを選択すればよい。たとえば、ガンマ

エミッターは、一般に治療目的（すなわち、腫瘍を可視化するためであり、一般に致死薬としては効果がない）で使用される。逆に、アルファおよびベータエミッションは、細胞殺傷効果を果たすために使用されるであろう。アルファエミッターは、それらがよく透過することができる血液産生疾患または血管腫瘍に対して特に有用である；ある場合では、一粒子エミッターが細胞を殺すには十分な効果があるかもしれないが、一般にアルファエミッターは、細胞表面に正確に配置されなければならない。逆に、ベータエミッター、すなわち ^{90}Y は、一般に、より長いエミッション範囲を有しているため、それらは特により巨大な、より局在化した疾患に適している。

【0005】

イットリウム-90-ラベルされた抗体およびペプチドは、特に臨床治療プロトコルにおいて有望な結果を示した（Thomas et al., 1995. Gamma-interferon administration after ^{90}Y radiolabeled antibody therapy: survival and hematopoietic toxicity studies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31: 529-534; DeNardo et al. 1995. Yttrium-90/Indium-111 DOTA peptide chimeric L6: pharmacokinetics, dosimetry and initial therapeutic studies in patients with breast cancer., *J. Nucl. Med.* 36:97P）。このような結合体は、通常はタンパク質または抗体を二官能価のキレーターと結合することによって作製され、次に二官能価キレーターを介してタンパク質構築物と放射ラベルを結合する。たとえば、本明細書の参照文献に援用された出願中の08/475,813、28/475,815、および08/478,967には、B細胞リンパ腫および腫瘍細胞をターゲティングおよび絶滅するための、放射ラベルされた治療用抗体が記載されている。抗ヒトCD-20マウスモノクローナル抗体、Y2B、二官能価キレーターであるMX-DTPAを介して結合された ^{90}Y を含むY2B8結合体が、特に開示されている。

【0006】

キレーターおよびキレーター結合体に関する特許が、当業者に既知である。たとえば、GansowのU.S.特許番号4,831,175には、多置換されたジエチレントリアミンペンタアセチック酸キレーター、および同じものを含むタンパク質結合体、並びにその調製方法が指示されている。GansowのU.S.特許番号5,099,069、5,2

46,692、5,286,850、および5,124,471も、多置換されたDTPAキレーターに関する。Kozak らが記載したように、MX - DTPAを含むDTPAキレート試薬のいくつかは、イットリウム - モノクローナル抗体による放射免疫治療に適していることが示された(1989. Nature of the bifunctional chelating agent used for radioimmunotherapy with yttrium-90 monoclonal antibodies: Critical factors in determining in vivo survival and organ toxicity. cancer Res. 49:2639-2644)。これらの参考文献は、その全体が本明細書に援用される。

【0007】

イットリウム - 90は、いくつかの理由により、特に放射免疫療法および放射ペプチド療法に適している。 ^{90}Y の半減期である64時間は、腫瘍に抗体を蓄積させるためには充分長く、かつたとえばガンマ線照射を全く持たない高エネルギー($E_{\text{max}}2.27\text{MeV}$)の純粋なベータエミッターである ^{131}I とは異なっている。その粒子エミッションの飛程は100~1000の細胞直径である。これは、外来患者に投与することが可能とされる貫通性放射線量としては十分に小さい量である。さらに、細胞殺傷には、ラベルされた抗体のインターナリゼーションが必要とされず、および電離放射線の局所的なエミッションは、標的抗原を欠失しているであろう隣接する腫瘍細胞にも致命的となるはずである。

【0008】

しかし、イットリウムラベルされた抗体において認知されている利用性、およびいくつかのイットリウムラベルされた治療による有望な臨床結果にも関わらず、放射ラベルすること、および単一部位に投与することは、どちらも本質的に困難であるために、多くの患者はこれらの治療法が提供するであろう恩恵を受けていない。この重大な問題は、アルファおよびベータエミティング放射性同位体によってその場で試薬をラベルすることが可能なキット、および製品がほとんど完全に役に立たないことが明らかである。これらは、他の点においては、このような技術を商業的に適用可能であることを示すであろう。

【0009】

放射ラベル、およびその後破壊性のアイソトープでラベルされた治療薬を投与するためのキットを提供する際の問題は、このような治療薬が患者に投与され

る前に、骨および他の標的でない組織に蓄積するであろうフリーの放射性同位体を患者に暴露しないように、結合しなかったラベルを除去するために多数の精製工程が必要とされる、当業者に長い間存在する確信であることが明らかである。イットリウムで抗体をラベルするために現在利用可能なこれらのキットでさえ、投与するための治療薬を準備する前に複雑な精製工程を必要とすることが明らかである。

【0010】

たとえば、現在Antisomaは、モノクローナル抗体HMFG1 (Theragyn (R)) を⁹⁰Yでラベルして、卵巣癌と診断された患者に投与後にするためのキットを提供している。フェーズI-IIに拡張された研究において、この治療法が従来の外科手術および化学療法を追随するものとして、特に患者に対して有益であろうことが示された (Hird et al., 1993. Adjuvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal antibody. Br. J. Cancer 68: 403-406)。さらに、Antisomaのラベル方法は、未結合のラベルをSephadex G50のゲル濾過によって除去する必要がある。これは、Theragyn (R) ラベルキットが商業的な成功を収める際に重大な妨害となり、並びにこの治療法が、全ての子宮癌患者 (この治療法の恩恵が役に立つ患者) に対して容易に利用可能とするための障害となる。

【0011】

医者が迅速に、効率的に、かつ安全に投与することが可能な簡便化された方法が提供されない限り、現在このような試薬は投与前にカラムによる精製が必要であるという事実は、このような技術から恩恵を受けるであろう全ての患者に対する利用の可能性を主に妨害物であったし、かつあり続けるであろう。たとえば、外来患者設定の医者は、薬剤をその患者に投与する前に、HPLCまたはゲル濾過クロマトグラフィーによって薬剤を精製するための時間または設備を持っていない。これは、薬剤の生産と医者への即時の送達が同時にするための場所として、さらなる設備が入手可能でなければならないことを意味する。これは、治療費を劇的に増大し、かつある場合には、治療を受けるために患者がかなり遠くに旅をする必要があるだろう。あるいは、前記薬剤は、施設外でラベルすることができるであろう。これには治療薬を、事前に調製すること、および少なくとも短期間保

存する必要があるだろう。これは、保存時の放射性の崩壊を介した放射性同位体強度の減少に影響するだけでなく、放射性同位体に過剰に暴露されることによってタンパク質の構造の完全性に重大な損傷を引き起こす。

【0012】

たとえば、 ^{90}Y および同様の放射性同位体の放射線分解性が、多くの報告で議論されている（すなわちSalako et al., 1998. Effects of radiolysis on yttrium-90-labeled Lym-1 antibody preparations. J. Nucl. Med. 39:667-670; Chakrabarti et al. 1996. Prevention of radiolysis of monoclonal antibody during labeling. J. Nucl. Med. 37:1384-1388）。Chakrabartiらが述べているように、 ^{90}Y などの放射性核種は、ラベル工程の際に、並びに保存の際に、抗体に大量の放射線を送達する。話によれば、腫瘍細胞の選択的なターゲティングが無視され、かつ有意な毒性レベルに標的でない組織を暴露することが可能抗体の損傷の原因が、放射線によって引き起こされた。

【0013】

放射線による損傷の機構は、フリーラジカルの発生に起因される（Pizzarello . 1975. Direct and indirect action. In: Pizzarello and Witcofski, eds. Basic Radiation Biology, 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febger, pp. 20-29）。しかし、Salakoらが述べたように、2.2MeVのエネルギーにおいて、 ^{90}Y からエミットされるベータ粒子は、抗体のジスルフィド結合を含むほとんどの化学結合を容易に破壊することができるであろう（Skoog. 1985. Principles of Instrumental Analysis, 3rd edition. San Francisco: Saunders）。従って、ラベルされたタンパク質が、 ^{90}Y などの破壊的放射性同位体にさらされる時間が短いほど、タンパク質が標的抗原と相互作用するために必要な構造の完全性、および結合の特異性を、投与されてから標的部位に到達するときまで維持している確率が高いであろう。

【0014】

^{90}Y の放射線分解性は、長年当業者には既知であり、およびこれらの治療を商業的に使用する際に、 ^{90}Y に存在する問題を解決するために、多くのことが試みられた。たとえば、Salakoら、およびChakrabartiらの両者は、抗体の損傷を減

少させる方法として、 ^{90}Y でラベルされた抗体のプレパレーションにおける放射線保護材の使用を評価した。特に、Salakoらは、ヒト血清アルブミンが、 ^{90}Y でラベルされた抗体の免疫活性を72時間まで維持可能にすることを報告した。しかし、Sadakoのプレパレーションによって示された特異的活性は、むしろ低かった(2mCi/mlより少ない)。さらに、Salako またはChakrabartiは、抗体をラベルした後に必要な多数の精製工程に先立つ、いずれの努力も報告していない。Salakoらは、45分から1時間ラベルして、次に分子ふるいクロマトグラフィーによって前記抗体を精製するが、一方Chakrabartiは、3時間近くラベルして、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製している。これらの方法はいずれも、 ^{90}Y ラベルされた治療薬を外来患者の設備に持ってくるための手段とはならないであろう。

【0015】

ChinolおよびHnatowichは、彼ら自身の発生器で作製した ^{90}Y を使用して、1-3mCi/mgの範囲の特異的活性をもつ ^{90}Y でラベルされたタンパク質において、90%の放射化学純度をラベル後に精製することなく得ることができた(1987. Generator-produced yttrium-90 for radioimmunotherapy. J.Nucl. Med.28(9): 1465-1470)。しかし、前記著者は、95%より低い純度を有するプレパレーションを患者に投与することを特に反対し、HPLCが重要、かつ「おそらく必須」の工程であろうことを示差した。

【0016】

HPLCおよび他のタイプの精製法が、外来患者および病院の設備から削除されているに違いないと認識した者は、高いレベルでラベルの取り込みがなされ、許容可能な抗体安定性のレベルを維持するように、 ^{90}Y を十分にラベルするプロトコルの開発には成功しなかった。高レベルの放射取り込みが一貫して成し遂げられなければ、このラベルが試薬から精製されていなければ、患者は許容できないレベルの、結合していないフリーな放射ラベルに暴露されるであろう。さらにもう一度、抗体構造の完全性が、該抗体が標的に対する特異性を失うように損傷されると、このような試薬は、その同族のリガンドと特異的に結合できないであろう。

【0017】

Matherおよびその同僚たちは、ラベルした後の精製を避けられるような方法によって、腫瘍特異的抗体を ^{90}Y でラベルする目的のために着手した(1989. Labeling monoclonal antibodies with yttrium-90. Eur. J. Nucl. Med. 15: 307-312)。しかし、Matherは、ゆるい特異的活性(1mCi/mg)の場合にのみ、高効率のラベル(95%以上)が得られることを発見した。さらに、Matherらは、それらの抗体プレパレーションが、数時間後に(放射線により)破壊の徴候を示したことを報告している。これは、Matherらが、この分野の他の多くの者が行うように、それらのラベル反応を一時間以上行ったためであろう。

【0018】

たとえば、さらなる精製工程を行わずに、 ^{111}In などの破壊性の低い試薬でタンパク質をラベルするために提案された方法がある。Richardsonらは、診断に使用するためのキットの構成を容易にする目的で、このような ^{111}In で抗体をラベルするための方法を提案する(Richardson et al. 1987. Optimization and batch production of DTPA-labeled antibody kits for routine use in ^{111}In immunoscintigraphy. Nucl. Med. Comm. 8:347-356)。しかし、Richardsonらが提案したラベル法は、一時間以上行われ、放射線分解しない ^{111}In においては実施できるかもしれないが、Matherらが報告した困難性によって証明されたように、 ^{90}Y では受け入れられるとは思われない。

【0019】

これは、我々に驚きと本発明の予想外の利点をもたらす。これは、タンパク質を ^{90}Y で放射ラベルする方法において、他の当業者によって認識されていない貴重な洞察を提供する。驚くべきことに、本発明者らは、他の者が純粋な試薬を得るために必須であると長い間考えていたHPLC、または他の精製工程、およびそれらの試薬の特異的活性を増加するために他の者が採用した長時間のインキュベーションが、 ^{90}Y でラベルされた試薬を調製する方法に対して有害であることを発見した。このような時間包括的な方法は、放射線分解によるタンパク質の損傷を増加するだけであり、低い特異性および放射ラベルされたタンパク質を注入するための準備がなされる時までのタンパク質分解の割合が増加される。驚くべきことに、本発明は ^{90}Y による効率的なラベルは、二分から五分ほどで行うことがで

き、実際に、反応時間が八分越えて増加しただけでさえ、このようなラベルはその効率が損なわれる。

【0020】

今では、本発明の方法によって、 ^{90}Y によるラベルが二分ほどで成し遂げられるかもしれないという事実により、病院および外来患者の設備においてイットリウムを放射ラベルするキットを適用性についての分野における現在の懷疑が完全に解決されるであろう。従って、本発明のキットは、おそらく多くの癌患者および医者によって認知されている長く切実な要求、並びに商業的な適用性、およびタンパク質を基にした、放射ラベルされた癌治療薬の利用可能性に関する長く切実な要求を最終的に満たすであろう。

【0021】

【発明の概要】

本発明は、患者に投与するための治療用放射性同位元素によってキレーター結合タンパク質またはペプチドを放射ラベルするための方法、およびキットに関する。本発明の方法は、本質的に、

(i) キレーター結合タンパク質またはペプチドを放射性同位体またはその塩を含む溶液と混合すること、および

(ii) 放射ラベルされた抗体が、さらなる生成をせずに患者に直接投与してもよいような、十分な純度、すなわち放射取り込みのレベル、特異的活性、および結合特異性を有する放射ラベルされたタンパク質またはペプチドが得られるようなよい条件下で、混合液を十分な時間インキュベートすること、を含む方法である。

【0022】

本発明のキットは、本質的に、

(i) キレーター結合タンパク質またはペプチドをバッファー中に含むバイアルと、

(ii) 放射ラベルされた抗体を安定化し、かつ患者に投与するための調合バッファーを含むバイアルと、および

(iii) 放射ラベル法を実施するための説明書であって、放射ラベルされたタ

ンパク質またはペプチドが、前記説明書で推薦するようなよい条件下で放射性同位体またはその塩に暴露されたときに、前記放射ラベルされた抗体を調合バッファ中に適切な濃度に希釈して、かつさらなる精製をせずに患者に直接投与されてもよいような、十分な純度、特異的活性、および結合特異性を有する放射ラベルされたタンパク質またはペプチドが得られる説明書、を含むキットである。

【0023】

【発明の詳細な記載】

別に定義していなければ、ここで使用された全ての技術的および化学的用語は、本発明が属する分野の当業者によって、通常理解されるものと同じ意味を持つ。本明細書に記載されたものと同様の、または同等の方法および物は、本発明の実行またはテストにおいて使用することができ、好ましい方法および物が記載されている。

【0024】

患者に投与するための治療用放射性同位元素で、キレーター結合タンパク質またはペプチドを放射ラベルするための方法であって、

(i) キレーター結合タンパク質またはペプチドを放射性同位体またはその塩を含む溶液と混合することと、

(ii) 放射ラベルされた抗体が、さらなる生成をせずに患者に直接投与してもよいような、十分な純度、すなわち放射取り込みのレベル、特異的活性、および結合特異性を有する放射ラベルされたタンパク質またはペプチドが得られるようなよい条件下で、十分な時間混合液をインキュベートすること、を含む方法を、本発明は包含する。「さらなる精製」には、HPLC、ゲル濾過、その他のタイプのカラムクロマトグラフィー、およびフリーまたは結合した未結合の放射ラベルを除去する目的で使用されるその他の分離技術を含む。

【0025】

本発明の方法は、一般に放射線分解性であることにより、タンパク質の構造の完全性に対して危険な可能性のある治療用の放射性同位体に対して、特に適用可能である。このような治療用放射性同位体は、一般にアルファおよびベータエミ

ッターから成る群から選択される。好ましい治療用の放射性核種には、 ^{203}Pb 、 ^{12}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{109}Pd 、 ^{64}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{77}Br 、 ^{211}A 、 ^{97}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{195}Au および、 ^{77}Lu を含む。治療上の利用性を有するその他の放射性核種は、本明細書の参照文献に援用されたU.S.特許5,541,287に記載されている。特に好ましい放射性核種は、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、および ^{188}Re などの強力なベータ線エミッターである。これらは分子内崩壊を引き起こすであろう。「治療用」放射性同位体は、一般に細胞毒性作用を有するベータおよびガンマエミッターなどの放射性同位体を指し、このような放射性同位体が診断目的としても使用されるであろう範囲までをいう。これらのアイソトープの放射線分解性が開示された方法およびキットに最適となるので、このような目的により、本発明の範囲からこれらのアイソトープは除かれない。

【0026】

本発明の方法は、タンパク質またはペプチドをラベルするために、特に標的特異性のために、構造の完全性を維持しなければならないものに使用してもよい。好ましいタンパク質は、腫瘍特異的な、または腫瘍に関連した抗原を認識する抗体、またはFab、(Fab)2およびFv断片などの抗体断片である。好ましいペプチドはソマトスタチン、血管作用性小腸ペプチド(VIP)、物質P、および細胞受容体と結合する他のペプチドを含む。このようなペプチド、およびこのようなペプチドのキレーター結合誘導体は、本明細書の参照文献に援用されたU.S.特許番号5,830,431に開示されている。

【0027】

本発明の方法において述べられた「十分なインキュベーション時間」は、前記試薬が、さらなる精製を必要とせずに患者に直接投与されてもいいような十分な放射取り込み、および放射化学純度がなされる際に許容可能な時間の範囲である。十分な放射取り込み、および純度は、一般に少なくとも95%であると当業者に認識されているが、ラベルの毒性によって変更してもよい。十分であると見なされる放射取り込みの範囲が、要求されたレベルの効率における機能であることも、当業者には明らかなはずである。 ^{90}Y 、および特に本発明の ^{90}Y でラベルされた抗体において、このような十分な時間は、一般に約8分より少なく、およびより

好ましくは約2～約5分でよく、キレーター結合タンパク質がラベルされるときにキレーターとタンパク質が敏感に反応するモル比が与えられる。

【0028】

特定のタンパク質をラベルするために必要である最適な時間は、タンパク質、特定の放射ラベル、および使用された特定の複合体によって異なるかもしれないことが、当業者には明らかなはずである。放射ラベルのために当てられる時間を最適化するときの基礎となる因子は、ラベルされる試薬におけるキレーターとタンパク質の比である。たとえば、治療上有用なレベルの取り込みがなされるには、キレーターとタンパク質の比が十分高くなくてはならないが（すなわち95%）、タンパク質の構造の完全性、または免疫反応性が損なわれるほど高すぎてはならない。これには、ある場合には低いレベルの結合キレーターで、かつ長い時間ラベルをする一定のバランスをとる工程が必要である。

【0029】

たとえば、本発明者らは、望ましいレベルの純度に⁹⁰Yでラベルするには、キレーターとしてMX-DTPAを使用して5分の条件で、かつキレーターと抗体のモル比が約1¹/₂～1のときにのみなされるであろうことを発見した。キレーターと抗体の比は、実際に増加させることができるが、望ましいレベルの放射取り込みおよび特異的活性は、短時間のラベル後に得られるので、このような必要はなかった。この発見が与えられると、キレーターとタンパク質の濃度などのパラメータは、他のタンパク質およびペプチドに対する当業者の経験的方法によって、治療用ラベルの選択、キレーターの選択、キレーター結合のために利用可能な部位の数、放射線分解に対するタンパク質の感受性、所望される効率のレベルなどに依存して、容易に測定することができる。

【0030】

対象のタンパク質および放射性同位体の両方と結合することができる限り、本発明の方法においていずれの二官能価キレーターが使用されてもよい。好ましいキレーターは、MX-DTPA、フェニル-DTPA、ベンジル-DTPA、CHX-DTPA、DOTAおよびその誘導体から成る群から選択される。特に好ましいキレーターは、MX-DTPAである。

【0031】

本発明の方法において述べられたように、「よい条件」には、許容可能な温度、pH、およびバッファの条件を含む。阻害的、またはラベル反応に不利益となる反応条件を選択すべきでないことが、当業者には明らかなはずである。Lewisらは、免疫複合体を放射ラベルするときに考慮されるべき反応条件を議論している。これは、本明細書の参照文献に援用される(1994.A facile, water-soluble method for modification of protein with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolabeled immunoconjugate. Bioconjugate Chem. 5: 565-576)。

【0032】

前記反応において、許容可能な温度は、ラベルされるタンパク質によって変更してもよいが、一般的な範囲は約25 ~ 約43 である。Lewisらは、放射ラベル反応の温度を25 ~ 43 に増加すると、放射金属の取り込み効率、および調査したDOTAの放射複合体の安定化速度が、どちらも増加することを発見した。

【0033】

許容可能なpHは、使用される放射ラベルに依存して、相当に変更してもよい。異なった各種でラベルに対して推薦されるpHは、一般に当業者に知られており、放射性同位体によって、それに応じて選択されればよい。たとえば、 ^{90}Y において許容可能なpHは、約3から6であるが、より好ましくは約4.2である。

【0034】

許容可能なバッファも、特定のラベルに依存して変更されるであろう。たとえば、Lewisらおよび他の者は、クエン酸が存在すると ^{90}Y によるラベル反応が阻害されることを発見した。従って、放射ラベルに ^{90}Y が選択された場合、クエン酸バッファは適していないであろう。 ^{90}Y でラベルする場合、好ましいバッファは、酢酸バッファ、およびより好ましくは、約10 ~ 約1000mMの濃度の酢酸ナトリウムバッファである。

【0035】

ラベル反応を阻害しないか、またはさもなくば不利な影響を与えないならば、

反応バッファー中に穏和な（有害でない）放射線防護剤が含まれていてもよい。Chakrabartiによれば、アスコルビン酸は、このような、ラベル反応に影響を与えない放射線防護剤の一つである。しかし、ヒト血清アルブミンをラベル反応に使用する場合、ラベル工程に影響を及ぼす金属が存在するので、注意すべきである。

【0036】

本発明は、特に放射線分解性のアイソローブでタンパク質を放射ラベルすることに関するものである。結合特異性と特異的活性の間には、当業者が本発明を実施する場合に遭遇する一定のバランスがあるかもしれない。たとえば、特異的活性が非常に高い（すなわち、5mCi/mg以上、好ましくは10mCi/mg以上、およびより好ましくは15mCi/mg以上）場合、望まれる結合特異性を有するタンパク質構築物は、腫瘍領域において十分な殺傷能力を有するであろう。しかし、全体としてその免疫反応性を保持する集団のタンパク質では、放射ラベルの放射線分解のために低い特異的活性を有する集団よりも低いかもしれない。当業者は、望まれる特異的活性のレベルに依存して、一定のレベルの免疫反応性が損なわれる選択をしてもよい。

【0037】

たとえば、本発明者は、 ^{90}Y で抗体が約15mCi/mgの特異的活性でラベルされたときに、結合特異性、またはタンパク質の免疫反応性は、一般に少なくとも約70%であることを発見した。この場合、抗体の感受性、および使用した放射性同位体の放射線分解の性質に依存して変更してもよく、および高レベルの免疫反応性、または特異的活性が望まれるならば、熟練した専門家によって操作されてもよい。本発明者らは、 ^{90}Y で約20mCi/mgまでの特異的活性が得られた。治療に適用するためには、少なくとも50%の結合活性が望ましい。

【0038】

所望であれば、ラベルした後のパーセント結合親和性、および複合体の免疫反応性を評価するために使用されてもよい結合アッセイが、これと共に同時に認められ、かつ提出された出願中の09/ および09/ に関示されている。本発明のラベル方法の後に、さらなる精製を必要とされないが、患者の健康を危険にさ

らさないように、放射取り込みのレベルを確認するためのTLCに基づいたアッセイは、常に実施されるべきである。このようなアッセイは、約3-4分で行うことができ、かつ放射線治療薬の安定性、または効率に有意な影響を与えないはずである。

【0039】

また、本発明には、患者に投与するための治療用放射性同位元素で、キレーター結合タンパク質またはペプチドを放射ラベルするためのキットであって、本発明のキットは、本質的に、

(i) バッファー中にキレーター結合タンパク質またはペプチドを含むバイアルと、

(ii) 放射ラベルされた抗体を安定化し、かつ患者に投与するための調合バッファーを含むバイアルと、および

(iii) 放射ラベル法を実施するための説明書であって、放射ラベルされたタンパク質またはペプチドが、前記説明書で推薦するようなよい条件下で放射性同位体またはその塩に暴露されたときに、前記放射ラベルされた抗体を調合バッファー中に適切な濃度に希釈して、かつさらなる精製をせずに患者に直接投与されてもよいような、十分な純度、特異的活性、および結合特異性を有する放射ラベルされたタンパク質またはペプチドが得られる説明書、を含むキットが包含される。前記キレーター結合タンパク質またはペプチドは、凍結乾燥された形態で供給されてもよい。

【0040】

本発明のキットが本明細書に記載の方法を実施するために設計されたことを理解すべきであり、従って、その目的に使用してもよい。従って、本発明を読むときに、キットの説明書が上記方法に基づいているであろうこと、並びに本キットに関して考えたときに、上記の取り組まれた問題が同じ関連性および意味を有することは、関係する者には明らかなはずである。さらに、本開示を読む際に、全体として他のキット態様が、本発明に包含されることは明らかなはずである。これらは、上記のような放射ラベルのpHを合わせるための酢酸バッファーなどの組成物を含むであろう。

【0041】

特に有利な本キットの組成物は、放射線分解の効果に対して安定化するため、および放射ラベルされた抗体を患者に投与するための調合バッファーである。前記調合バッファーは、ラベルされた抗体を希釈するため、および投与バッファーの両方として役に立つ薬学的に許容可能なキャリアである。薬学的に許容可能な希釈剤は、治療用または診断用の抗体を投与するために使用してもよいが、本発明の調合バッファーは、特に放射ラベルされた抗体に適している。

【0042】

たとえば、本発明の調合バッファーは、ヒト血清アルブミン (HAS) またはアスコルビン酸などの、イットリウムおよびその他の強力な放射性核種による放射線分解を最小にする放射線防護剤を含む。その他の放射線防護剤が当業者に既知であり、本発明の調合バッファーとして使用することもできるであろう。すなわち、フリーラジカルスカベンジャー (フェノール、亜硫酸塩、グルタチオン、システイン、ゲンチシン酸、ニコチン酸、パルミチン酸アスコルビル、HOP(:O)H₂、グリセロール、ホルムアルデヒドスルホキシル酸ナトリウム、Na₂S₂O₅、Na₂S₂O₃、およびSO₂など) である。

【0043】

また、本発明の調合バッファーは、過剰量の未結合キレーターを含む。未結合キレーターを含む目的は、このキレーターが患者内で非タンパクが質結合した放射ラベルのいずれにもスカベンジャーとして、かつ放射ラベルを排出することによって「向骨性」アイソトープ、すなわち⁹⁰Yの患者の骨による取り込みを減少するために役に立つことである。たとえば、キットの抗体がDTPAキレーターと結合された場合、過剰のDTPAまたは他のキレーターのいずれかが、調合バッファー中に含まれていてもよい。また、前記調合バッファーは、好ましくは全用量が反応バイアルに移されるような量で提供される。上で論じたように、これは、正確な量を測定して移さなくてもよいので、使用時の容易さおよび再現性を増大させる結果となる。

【0044】

好ましい調合バッファーは、リン酸バッファー、または生理食塩水、ヒト血清

アルブミン、およびDTPAを含む。前記ヒト血清アルブミンは、好ましくは約5~25% (w/v) の間の濃度、およびより好ましくは約7.5% (w/v) の濃度である。前記DTPAの濃度は、このましくは約1mMである。アスコルビン酸塩は、ヒト血清アルブミンの代わりとして使用してもよく、かつ一般的には約1~100mg/mlの濃度で使用される。しかし、患者の安全を損なわないように、より広範囲の濃度で使用されてもよい。

【0045】

前記キットは、購入者の好みによって、他の代わりの態様として供給されてもよい。たとえば、前記キットは、さらにラベル反応および調合バッファの希釈の両方が行われるであろう滅菌反応バイアルを含む。廃棄物を減らすために、放射ラベルのpHを合わせるためのバッファが、実際の反応バイアル内に供給されるといった、さらなる態様が想像される。前もってラベルキットを注文して、その後で別に、投与直前に放射性同位体を注文することもあり得るであろうが、さらに放射性同位体のバイアルを含むキットも考えられる。第二のタンパク質もしくはペプチドのバイアルを含むキットも考えられ、放射ラベル産物の結合親和性を評価する際のコントロールとして、またはある場合には、放射ラベルされたタンパク質もしくはペプチドと治療法を組み合わせるために、いずれかとして貢献する。

【0046】

【好ましい態様の詳細な記載】

再発したB細胞リンパ腫を治療するための臨床試験において、⁹⁰Yでラベルされた抗CD20マウスモノクローナル抗体 (Y2B8) が、現在評価されている。前記2B8抗体は、ヒトCD20を認識するマウス抗体である。最近、この抗体のキメラバージョン (RITUXAN (R)) が、非ホジキンリンパ腫の治療のためのFDAの認可を受けた。本明細書によって参照文献に援用されたU.S.特許出願番号08/475,813には、治療的療法と組み合わせることでイットリウムラベルされたマウスモノクローナル抗体と共にRITUXAN (R) を経時的に投与した開示がある。RITUXAN (R) を投与した後の、イットリウムラベルされた抗CD20抗体の投与は、(A) 抗CD20キメラ抗体によって除去されずに残っている全ての末梢血B細胞を除去するため；(b) リンパ

節からB細胞の除去を開始するため；または(c)その他の組織からB細胞の除去を開始するためには十分であった。

【0047】

従って、非ホジキンリンパ腫の治療に対する抗CD20抗体の効果が改良され、かつ放射活性に対するリンパ球の感受性が既知となったので、このような治療抗体が、キット形態として商業的に利用可能になることは非常に有用となるであろう。これにより、臨床の設備内で、放射ラベルによる修飾が容易になされ、および患者に直接投与されるであろう。

【0048】

2B8抗体を放射ラベルするキットは、好ましくは4つの構成要素を含む：

- 1.) 2mg/mlの2B8 - MX - DTPAの低金属の通常の生理食塩水、
- 2.) 放射性同位体溶液をラベルに最適なpHに合わせるために使用される50mM酢酸ナトリウム、
- 3.) 調合バッファー(7.5% (w/v) ヒト血清アルブミン、および1mMDTPAを含む、1×PBS、pH7.4)、および随意に
- 4.) 空の10mLガラスバイアル(反応バイアル)(「10mL」の反応バイアルは実際に不自由なく保持され、かつ技術的には、やや「10mL」より大きい)。全ての構成要素は、滅菌されおよびピロゲンフリーであることがテストされている。

【0049】

この節では、この放射性同位体ラベルキットのバリデーション(使用が単純かつ容易で、並びに95%の放射取り込みの放射ラベルされ、および抗原陽性細胞との結合が許容可能に保持された抗体を産生する)を要約する。結合および放射線取り込みに影響を及ぼす実験パラメーターの評価も行なった。

【0050】

【実施例】

実施例1. 2B8を⁹⁰Yでラベルするための放射ラベルキットおよび方法

A. 放射ラベルキットの試薬。

【0051】

1. 2B8-MX-DTPA、IDEC ; Lot # 082395RM2、

2. 50mM 酢酸ナトリウム、低金属、IDEL ; Lot # 082395RM3、
 3. 調合バッファー (7.5% (w/v) ヒト血清アルブミン、および1mMDTPA、を含む、1×PBS、pH7.4)、IDEC。 Lot # 082395RM1、
 4. 反応バイアル、10mL、IDEC、
- B. 材料および装置。

【0052】

1. Biotex Tec-Control Radioincorporation Kit, Cat.#151-770、
 2. 手袋：パウダーフリー、
 3. 滅菌ポリプロピレン注射器、
 4. 滅菌注射針、
 5. ふた付きの小さなチューブ ; 1.5ml、
- C. 方法。

【0053】

1. 放射ラベルキットを使用したY2B8の調製

キットの試薬を調製し、かつ中隔ガラスバイアルを満たした。タイプIのホウケイ酸バイアル (2または10ml) を注入用滅菌水 (WFI) でリンスして、使用前にオートクレーブした。試薬を手作業で満たして、Class 100の部屋において圧着し、かつUSP法を使用して発熱性および無菌性をテストした。

【0054】

補助試薬：

1. イットリウム-[90]：塩化物塩、キャリアフリー、HCl溶液。

【0055】

予防措置

1. 全ての工程は無菌的技術を使用して行うべきである。
2. 放射ラベルキットの構成物は、使用前に室温にしておくべきである。

【0056】

放射ラベルプロトコル

1. 反応バイアルに添加する⁹⁰YCL₃の量は、以下のように見積もった
 - a. 放射ラベル時の放射活性濃度：

C_0 = キャリブレーション時の放射活性濃度 (製造者の証明書の分析法を参照)

、

t = 変化時間 (正の数はキャリブレーション後、負の数はキャリブレーション前)、

ラベル時の放射活性濃度 = $C_0 / e^{0.0108(-t)}$ 。

【0057】

b. 反応バイアルに添加する $^{90}\text{YCL}_3$ の量

45mCi / ラベル時の放射活性濃度 = 反応バイアルに添加した量。

【0058】

2. 反応バイアルに添加する50mM酢酸ナトリウムの量は、以下のように見積もった:

a. 0.040M HCl (Amersham) 中の $^{90}\text{YCL}_3$ には:

$^{90}\text{YCL}_3$ (工程1b) の量 \times (0.8) = 添加する酢酸ナトリウムの量、

b. 0.050M HCl (Nordion) 中の $^{90}\text{YCL}_3$ には:

$^{90}\text{YCL}_3$ (工程1b) の量 \times (1.0) = 添加する酢酸ナトリウムの量、

3. 中隔のある反応バイアルおよび酢酸ナトリウムのバイアルは、アルコールで拭いた。1ccのシリンジを使用して、見積もった量 (工程1aまたは1b) の50mM酢酸ナトリウム (工程2) を、反応バイアルに移した。前記バイアルを数回反転して混合した。

【0059】

4. $^{90}\text{YCL}_3$ 源のバイアルの中隔をアルコールで拭いた。前記針とバイアルを滅菌した0.2 μm フィルターに装着した。1ccのシリンジを反転して使用し、必要量 (工程1b) の $^{90}\text{YCL}_3$ を、反応バイアルに移した。前記バイアルを数回反転して混合した。

【0060】

5. 2B8 - MX - DTPAのバイアルの中隔をアルコールで拭いた。3ccのシリンジを使用して、1.5mlの2B8 - MX - DTPAを反応バイアルに移した。前記バイアルを数回反転して混合した。

【0061】

6. 前記反応混合液の全量は、添加したY-90塩化物の量（工程4）と、添加した50mM酢酸ナトリウムの量（工程3）と、添加した2B8 - MX - DTPAの量（工程5）を加えて見積もった。

【0062】

7. 最終的に10mLの量にするために、反応バイアルに添加する調合バッファの量は、10から工程6で見積もった全反応液の量を引いて見積もった。

【0063】

8. 調合バッファのバイアルをアルコールで拭いて、前記バイアルをベントした。調合バッファの粘性による針を使用して、反応バイアルを0.2 μmの注射器フィルターに装着した。適切なゲージの針を装着した10ccの滅菌シリンジを使用して、工程7で見積もった量の調合バッファを反応バイアルに移した。ベント針を反応バイアルから除去して、前記バイアルを数回反転して混合した（最終産物）。前記バイアルは、「放射活性アッセイ」を行う前に少なくとも5分インキュベートした。溶液の色は琥珀色であり、前記反応バイアルが満たされていることによって調合バッファが添加されたことを確認する。

【0064】

9. 最終産物のバイアルの全放射活性を、⁹⁰Yを測定するための適切な装置セットを使用して測定した。

【0065】

10. 最終産物は、直ちに2 から8 にし、患者への投与が必要になるまで保存した。

【0066】

2. 放射取り込みアッセイ

%放射取り込みは、以下のプロトコルに従ってBiodex Tec-Control Radiochromatographic Kitを使用して、瞬間薄層クロマトグラフィー（ITLC）によって測定した。

【0067】

補助材料および装置：

1. ⁹⁰Yで放射ラベルされた2B8 - MX - DTPA、

2. 放射活性なTLCストリップを計測するチューブ、
3. はさみ、
4. 滅菌シリンジ ; 1cc、
5. 滅菌針 ; 26G、
6. ガンマカウンターまたはシンチレーションカウンター、
7. ピペッター。、

手順

1. Biodex 操作マニュアルの全体を最初に読むべきである。
2. それぞれの放射ラベルされたサンプルを三つずつ、キットの説明書に従ってテストした ; バイアルあたりストリップを展開した。
3. クロマトグラフィーストリップに放射ラベルされたサンプルをスポットするために、ピペッターで開始線に1 μ l をスポットした。あるいは、1ccの滅菌シリンジに装着した26Gの針から分取した小さい一滴をスポットしてもよい。前記抗体は開始点に残ったままであり、かつ取り込まれていない⁹⁰Y-DTPAは、溶媒の先端に移動する。
4. 適切なカウンター、すなわち⁹⁰Yにはシンチレーションカウンターを使用して、バックグラウンドを修正し、それぞれの画分の活性を測定した。
5. 放射ラベルされた抗体の割合の見積もりは、Biodex装置に従った。

3. 結合アッセイ

補助試薬

1. ⁹⁰Y2B8 - MX - DTPA
2. 凍結乾燥した細胞

ヒト細胞株sb (CD20陽性) およびHSP (CD20陰性) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから得て、2%グルタミンを補った10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640を使用して、T-フラスコ内で培養した。培養液は、37 °C および5%CO₂で維持した。細胞は、一般に1 : 2にわけて、0.5-2.5 × 10⁶細胞/ml および生存率が > 80%で収集した。細胞濃度は、血球計算版を使用して測定し、および生存率はトリパンブルー排除法によって測定した。

0.5-2 × 10⁶細胞/mlの細胞濃度の細胞は、周囲温度で遠心することによって回

収し、かつ1×HBSSで二回洗浄した。ペレット細胞を1% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA) をおよび10% (w/v) マンニトール (凍結乾燥バッファー) を含む1×HBSSに、 150×10^6 細胞/mlとして再懸濁し、Oリングガasketの1.5mlのポリプロピレンマイクロフージチューブに0.5mlを分配して、-70度に保存し、および30-60ミリトールで一晩凍結乾燥した。凍結乾燥した細胞のチューブは、乾燥させて2-8 で保存し、かつアッセイには滅菌水で元に戻した；マイクロフージチューブ内の凍結乾燥した細胞のチューブは乾燥して保存した。

【0068】

3. 洗浄のための滅菌水、または注入のための滅菌水。
4. 希釈バッファー (1%ウシ血清アルブミン (BSA) および0.02%アジ化ナトリウムを含む1×PBS、pH7.2-7.4)。

【0069】

方法

放射ラベルされた抗体サンプルの調製

1. 2 ~ 8 に保存された放射ラベルされた抗体を得た。
2. 10 µl量をP20で取り除き、990 µlの希釈バッファー (1:100希釈) を含む、1.5mlのマクロフージチューブに添加した。チップをリンスして、チューブを軽くボルテックスした。
3. 50mlのふた付きの滅菌ポリプロピレンチューブを手に入れて、10mlの希釈バッファーを10mlの血清ピペットを使用してチューブに入れた。
4. 1:100希釈チューブから35 µl量をp200で取り除き、10mlの希釈バッファーを含むコニカルチューブに添加した。よく混合した。

凍結乾燥細胞の調製

1. 凍結乾燥されたSB細胞のチューブを三つ用意した。
2. 0.5ml量のSWFIをそれぞれのチューブに添加して、単一の細胞懸濁液が得られるまでチューブをボルテックスした。
3. 空のマイクロフージチューブを三つ用意した；0.5mlの希釈バッファーを三つのチューブに添加して、細胞を含まないコントロールを提示した。

【0070】

アッセイプロトコル

1. 0.5ml量の希釈した⁹⁰Y2B8 - MX - DTPAをそれぞれのチューブに添加した。
2. ふたが確かに閉められたことを確認した後、前記チューブをミキサー上に45分間立てておいた。
3. 周囲温度で45分間培養した後、前記細胞を5分間遠心してペレットにした。
4. 0.8ml量の上清をシンチレーションバイアルに移した。
5. シンチレーションカクテルをそれぞれのバイアルに添加した。
6. 隔バイアルの放射活性の量を、バックグラウンドを修正したシンチレーションカウンターを使用して測定した。

【0071】

D. 結果

それぞれの放射性同位体について異なったロットを使用して、確認実験を数回行うことによって、Y2B8の放射ラベルプロトコルの再現性および困難さを評価した。5人の操作者によって、6個の確認ロットをそれぞれのY2B8で調製した。これらのロットを以下のように命名し、以下の設備で行った：

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

これらの隔確認ロットに対してテストした結果を表1に要約した。

【0072】

【表1】

表1. Y2B8 確認のための放射アッセイの結果

ロット番号	%放射取り込み	%結合
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 = 98.8	平均 = 82.3	
標準偏差 = 1.24	標準偏差 = 3.4	
% CV = 1.25%	CV = 4.2%	

調製した6個の確認ロットについて、結合が得られた割合は、78.6%～87.0%の範囲であり、平均が82.3%ある。Y2B8の放射線取り込み値の平均は、98.8%（96.3%～99.5%の範囲）である。全体として、これらの結果からは、放射性同位体ラベルキット法によるY2B8の調製の再現性、および困難性が確認され、全体として、この放射ラベルキットを使用して調製されたY2B8は、臨床設定における使用に適していることを示している。

【0073】

例2. 反応パラメーターの初期評価～pHおよび反応時間

様々なpHおよび反応時間の条件下でラベル反応を行った後、初期段階の速度実験を行って、⁹⁰Yラベルされた抗体の放射取り込み、および結合を評価した。pH3.9から4.7の範囲で、5分間インキュベートして放射ラベル反応をした場合、>80%がCD20陽性細胞との結合を維持したままで、>96%の放射取り込みであった（表2）。pH2.9から4.6の範囲で、3、5、および10分間インキュベートした場合にも同様の結果が得られた（表3）。

【0074】

【表2】

表2. Y2B8 の放射ラベル速度:CD20 陽性細胞の
放射取り込み及び結合に対する pH の効果¹

反応pH	放射取り込み(%)	結合(%)
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

【0075】

【表3】

表3. Y2B8 の放射ラベル速度:CD20 陽性細胞の
放射取り込み及び結合に対するインキュベート時間の効果¹

インキュベート時間	放射取り込み(%)	結合(%)
pH 3.9: 3	97.0	82.0
5	98.9	82.1
10	99.2	82.3
pH 4.7: 3	97.2	82.5
5	96.7	81.8
10	97.6	81.5

¹ 表2および表3に報告されたラベル反応の結果及びパラメータの評価研究は、CHO 細胞発現系に由来する 2B8 で実施した;MX-DTPA 結合体は以前に特徴化した 2B8-49 に使用したものと同一プロトコルを使用して行った。同時に提出され本明細書の参照文献に含まれた、所有権者を同じくする同時係属中の出願番号 09/____ に援用されたように、反応は約 3mg の抗体、及び4:1のモル比のキレーターと抗体を使用して行った。

Y2B8プレパレーションの免疫反応性は、Lindmo et alの方法を使用して測定した。新たに回収したCD20陽性SB細胞の量を増やして、抗原過剰の条件下で、固定した量のY2B8とインキュベートした。逆数プロットによる結合データの解析では、一回の調製の後に、Y2B8の免疫反応性は72.2%を示した(図1)。

【0076】

例3. さらなる反応パラメーターの評価

I 導入

この節において記載された実験は、Y2B8放射ラベルキットを使用して調製したY2B8の結合について、プロトコルのずれに対する影響を調査した。放射ラベルされた抗体の結合は、放射ラベルの工程におけるいくつかのパラメータの影響を受けるであろう(表4)。

【0077】

【表4】

表 4

放射ラベルキットのずれ	ラベルした条件で予測される効果	結合に対して予想される効果
1.)過剰量の ⁹⁰ Yの添加	pHの減少; 放射分解の増加	減少
2.)少量の ⁹⁰ Yの添加	pHに変化無し; 放射分解の減少	増加または無し
3.)過剰量のNaAcの添加	pHに変化無し; 放射分解の減少	増加または無し
4.)少量のNaAcの添加	pHの減少; 放射分解の増加	減少
5.)過剰量の2B8-MX-DTPAの添加	pHに変化無し; 放射分解の減少 (低い特異的活性)	増加
6.)少量の2B8-MX-DTPAの添加	pHに変化無し; 放射分解の増加 (高い特異的活性)	減少
7.)インキュベート>5分	放射分解の増加	減少
8.)インキュベート<5分	放射分解の減少	増加または無し

放射ラベルプロトコルに由来する以下のずれは、結合に対して最も負の影響を有するであろうものとして同定され、かつ含んでいた：

- 1.) より少ない量の酢酸ナトリウムの添加、
- 2.) 過剰量の塩化物溶液の添加、
- 3.) より少ない量の2B8 - MX - DTPAの添加、および、

4.) 最大反応時間を上回るインキュベーション、
である。これらのずれの影響は、別々に、または同時に評価した。

【0078】

別々に評価した場合、8分間インキュベートしたときでさえ、上記項目の1-3
における20%量のずれでは、IDEC - Y2B8が、臨床試験において結合のために確立
された放出規格に合格する結果となった。

【0079】

三つの量全てのずれを同時に起こした研究において、月曜日ラベルプロトコル
(放射線分解が最大の可能性がある)を使用して調製され、および8分間(通常
より60%長い)培養した用量の場合にのみ、臨床放出規格よりわずかに下であっ
た(<3%)。逆に、金曜日ラベルプロトコルを使用して調整された用量では、4
種のパラメーターの全てにおいて(上記1-4)ずれの累積的效果にも関わらず、
許容可能な結合結果を維持した。全てのずれにおいて別々および同時起こる場合
、放射取り込みが、臨床放出規格の95%より上であった。

【0080】

II. パラメータの選択

我々は、必要とされる試薬量の20%のずれ、または通常使用される最大6分の
反応時間の30%過剰までの許容が、放射薬学で使用されるプロトコルからの最大
限可能なずれを示すと判断した。本研究において、我々は、IDEC - Y2B8の結合に
対するこれらのずれの影響を評価した。我々は評価した条件が、週の全体にわた
る用量調製の極限值を示すことを立証するために、「月曜日」および「金曜日」
ラベルをシミュレートした。全てのずれが単一の用量調製に生じた場合の結合に
対する組み合わせの効果、および ^{90}Y の放射取り込みに対する、これらのずれの影
響を評価した。

【0081】

「月曜日」および「金曜日」ラベルは、次の考えを反映している。 ^{90}Y 塩化物
溶液が短い半減期(64h)を有するので、使用した放射性同位体の量は、用量を
調製した週のうちの日にちに依存する。このような理由により、月曜日に用量調
製した反応量はより少なく、その結果 ^{90}Y の濃度がより高くなり、おそらくより

強い放射線分解を生じる。従って、我々は、月曜日および金曜日ラベル法をシミュレートして、週の全体において用量調製の極限值を示すことを立証した。

【0082】

III. 材料および方法

A. 試薬

1. 0.05M HCl中の⁹⁰YCl₃; Pacific Northwest National Laboratory, reagent grade; P.O.#08016,08118、
 2. Ultrex HAL; J.T. Baker, Product#6900, Lot#J22539、
 3. 洗浄用の滅菌水; Baxter, Part#2F7114, Lot#G926092、
 4. 希釈バッファー; 10mM PBSを含むpH7.4、1%BSA; Sigma, Part#P-3688, Lot#076H8913、
 5. IDEC Supplied Radiolabeling kit; IDEC Part#130018, Lot#0129、以下のものを含む:
 - a.) 2B8 - MX - DTPA; IDEC Part#129017, Lot#0165、
 - b.) 50mM 酢酸ナトリウム; IDEL Part#121017, Lot # 0209A、
 - c.) 調合バッファー; IDEC Part#120015, Lot#0202、
 - d.) 反応バイアル; IDEC Part#122015, Lot#0218、
 6. 凍結乾燥SB細胞、IDEC Part#127, Lot#127-001F、
- B. 材料および装置。

【0083】

1. ピペッター (20, 200、および1000 μ L)、
2. ボルテックス、
3. 金属フリーピペットチップ (Biorad; metal-free)、
4. ガンマカウンター (Isodata, Model#20-10)、
5. ガラスチューブ (12 \times 75mm)、
6. ポリプロピレンチューブ (Costar; 15mL および50mL conical, 滅菌)、
7. Tec-Control Radiochromatographic Kit (BioDex; Cat # 151-770)、
8. マイクロ遠心機 (Savant)、
9. ポリプロピレンマイクロフージチューブ、金属フリー (Biorad; Cat#223-97

80)。

【0084】

C. 方法

1. Y2B8の調製

一般的に、 ^{90}Y ラベルされた2B8 - MX - DTPAは、以下に記載した変更により修飾された、上記の小スケールバージョンの放射ラベルキットプロトコルを使用して調製した。放射ラベルは、保存濃度が84mCi/mLまたは29.8mCi/mLの濃度の ^{90}Y 塩化物を使用して行い、それぞれ月曜日または金曜日用量のプレパレーションをシミュレートした(水曜日キャリブレーションである50mCi/mLを基にして)。濃縮された ^{90}Y 塩化物溶液は、50mM HCl(Ultrex, high-purity)を使用して、「金属フリー」のプラスチックマイクロフージチューブ内で希釈した。Ultrex(high-purity)HClを洗浄用の滅菌水(SWFI)で50mMに希釈した。放射ラベル反応は、「金属フリー」のプラスチックマイクロフージチューブ、15mlのコニカルチューブ、またはY2B8放射ラベルキットにより提供された10mLのガラス中隔反応バイアル内で行った。

【0085】

a. 小スケールラベルから全スケール用量の調整

0、3、10、および40mCiの放射ラベル反応は、月曜日用量プレパレーションをシミュレートする反応条件を使用して行った。各反応の試薬量をmLsとして表5に抄録した。

【0086】

【表5】

表5. 試薬の量(mL)

^{90}Y の量(mCi)	^{90}Y 塩化物	酢酸ナトリウム	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

5分間インキュベートした後、20 μ lサンプルを除去して、調合バッファーで最終抗体濃度を0.21mg/mLに希釈して、アッセイするまで2-8 に保存した。このレポートに記載された以下の全ての実験において、コントロールとして1mCi反応液を使用したので、結合値を1mCi反応液に標準化した。報告された値は、コントロールの結合値により各反応の結合値を割ることによって1mCiコントロールサンプルとして標準化し、割合として表示した。

【0087】

b. 添加した酢酸ナトリウムの量に対する影響

月曜日ラベルにおいて、10mCiの ^{90}Y 塩化物(0.119mL)と0.114mLの50mM酢酸ナトリウムを混合した。この50mM酢酸ナトリウムの量は、IDEC-Y2B8の臨床において用量を調整するために通常使用されるバッファーの量よりも20%少ない。結合した抗体(2B8-MX-DTPA)を添加して(0.333ml)、前記サンプルを混合して、次に周囲温度でインキュベートした。放射ラベル溶液の特異的活性は18.9mCi/mg抗体であった。2分の時点で、0.020mLを除去して、調合バッファーで0.24mg/mLに調合して、2-8 に保存した。8分後、放射ラベル溶液の残りを0.24mg/mLに調合して、2-8 に保存した。金曜日ラベルをシミュレートするために、0.336mlの ^{90}Y 塩化物、0.323mLの酢酸ナトリウム、および0.333mlの2B8-MX-DTPAを使用して、前記プロトコルを繰り返した。両研究において、上記の「標準」条件を使用して、1mCiコントロール反応を行った(5分反応)。

【0088】

c. 添加した ^{90}Y 塩化物の量に対する影響

月曜日ラベルにおいて、12mCiの ^{90}Y 塩化物(0.143mL)を0.143mLの50mM酢酸ナトリウムと混合した。この ^{90}Y の量は、一般的にY2B8を用量調整するために通常使用される ^{90}Y の量よりも20%多い。結合した抗体を添加して、前記サンプル溶液を混合して、次に周囲温度でインキュベートした。最終的な放射ラベル溶液の特異的活性は22.5mCi/mg抗体であった。2分の時点で、0.020mLを除去して、調合バッファーで0.24mg/mLに調合して、2-8 に保存した。8分後、放射ラベル溶液の残りを0.24mg/mLに調合して、2-8 に保存した。金曜日ラベルも同様に、0.403mlの ^{90}Y 塩化物、0.403mLの酢酸ナトリウム、および0.333mlの2B8-MX-DTPAを使

用して実施した（特異的活性は22.5mCi/mg抗体であった）。両研究において、上記の「標準」条件を使用して、1mCiコントロール反応を行った（5分反応）。

【0089】

d. 抗体結合体の量を少なく添加したときの影響

月曜日ラベルにおいて、10mCiの ^{90}Y 塩化物（0.119mL）と0.143mLの50mM酢酸ナトリウムを混合した。通常使用される抗体の量よりも20%少ない結合した抗体を添加して（0.267ml）、前記サンプルを混合して、次に周囲温度でインキュベートした。2および8分の時点で、0.020mLを除去して、調合バッファーで最終抗体濃度を0.24mg/mLに調合して、アッセイまで2-8 に保存した。金曜日ラベルも同様に、0.336mlの ^{90}Y 塩化物、0.403mLの酢酸ナトリウム、および0.27mlの結合体を使用して、実施した。両研究において、上記の「標準」条件を使用して、1mCiコントロール反応を行った（5分反応）。

【0090】

e. 試薬のずれを組み合わせたときの影響

月曜日または金曜日ラベルプロトコルにおいて、酢酸ナトリウム、 ^{90}Y 塩化物、および結合体の量を20%すらしめたときの影響を同時に評価した。月曜日ラベルにおいて、12mCiの ^{90}Y 塩化物（0.143mL）を0.113mLの50mM酢酸ナトリウム、20%多い量を示す ^{90}Y 塩化物、通常使用される酢酸ナトリウムの20%少ない量と混合した。通常使用される抗体よりも20%少ない量を示す2B8 - MX - DTPAを添加して、前記サンプル溶液を混合して、その後周囲温度でインキュベートした。2、4、6および8分の時点で、0.020mLを除去して、調合バッファーで最終抗体濃度を0.24mg/mLに調合して、アッセイまで2-8 に保存した。金曜日ラベルも同様に、0.403mlの ^{90}Y 塩化物、0.387mLの酢酸ナトリウム、および0.267mlの結合体を使用して実施した；40 μL のサンプルを示した時間に除去して、調合バッファーで調合した。両研究において、上記の「標準」条件を使用して、1mCiコントロール反応を行った（5分反応）。

【0091】

2. 放射取り込みの測定

上記アッセイに従って、Biodex (Tec-Control Radiochromatographic Kit) に

よって製造された商業的に利用可能なキットを使用して、結合体と結合した放射活性の量を測定した。一般的なマイクロピペッターを使用して、0.5-1 μ lのサンプルを複製ストリップに注ぎ、かつBiotex instruction incertによって展開した。Isodataガンマカウンターを100-1000KeVのウィンドーで使用して、ガラスチューブ内でストリップの半分の放射活性を計測した。放射ラベルの取り込みは、上部および底部の半分の両方から求めた全活性から前記ストリップの上部半分の放射活性の量をわけることによって評価した。この値は、パーセントとして、かつ測定した平均値を示した。

【0092】

3. 結合の測定

上記プロトコルに従って、サンプルのCD20陽性細胞に対する結合%を解析した。しかし、ネガティブコントロールであるHSB細胞のサンプルは、これらの実験には含まれておらず、およびSB細胞はマイクロフージチューブの代わりに5mlバイアル内で凍結乾燥した。

【0093】

本質的に、最終的に調合した全てのY2B8サンプルは、希釈バッファー（10.0 μ lの抗体+990 μ lバッファー）で1：100に希釈した。次に前記抗体は、50mlポリプロピレンチューブ内の10mlの希釈バッファーに、30 μ lの1：100希釈液を添加することによって8ng/mlの範囲の濃度に再び希釈した。

【0094】

6から7個の凍結乾燥細胞のバイアルをSWFIで元に戻して、50mlコニカルチューブにプールした。再構成された細胞（0.5ml）を三本の1.5mlマイクロフージチューブ内に三等分して、サンプルあたり三本をテストした。希釈バッファー（0.5ml）を三本の空のマイクロフージチューブに添加した。希釈した抗体（0.5ml）をそれぞれのチューブに添加して、しっかりとふたをして、周囲温度で45分間、エンドオーバーエンドで混合してインキュベートした。インキュベーションした後、「6」（4000 \times g）にセットしたSavant マイクロ遠心機を使用して、5分間遠心することによって細胞をペレットとした。エネルギーウィンドーを100-1000KeVにセットしたIsodata ガンマカウンターを使用して放射活性を測定するために

、前記サンプルの上清(0.75mL)を12×75mmのガラスチューブに移した。

【0095】

細胞に結合した放射活性(B)は、添加した全放射活性から未結合(上清)の放射活性を引くことによって見積もった。全放射活性は、細胞のないチューブの放射活性を計測することによって測定した。結合%は、結合した放射活性を全パーセントとして示すことによって見積もった。

【0096】

結合を評価するために使用する凍結乾燥された細胞間のロットのばらつき効果を最小にするために、「標準的」ラベル条件を使用して調製された1mCiのY2B8コントロールによって結合値を標準化した。この節の始めの方に述べたように、各セットの実験に対してコントロールサンプルを調製した。

【0097】

D. 結果

1. 全スケールでの用量のプレパレーションを予測するための小スケールラベル
小スケール放射ラベル反応から、全スケール(40mCi)用量のプレパレーションが予測されることを確認するために、上述の放射ラベルプロトコルを使用して、1、3、10、および40mCiのY2B8用量を調製した。これらの結果を表6に示し、および反応混合液のスケールを1mCi~40mCiに増加しても、結合、または放射取り込みに対して不利な影響がないことが示される。

【0098】

【表6】

表 6

⁹⁰ Y mCiの量	結合コントロール%	%放射取り込み
1	100	99.2
3	102	99.1
10	98.6	99.0
40	98.2	99.0

2. 酢酸ナトリウムの量を少なく添加した場合の影響

20%少ない量の酢酸ナトリウムを使用して、かつインキュベーション時間を60%のばしてY2B8を調製した場合、以下の「標準的」ラベル条件で調製された放射ラベルと比較して、実質的な結合が保持された（以下の表7）。ラベル反応が月曜日ラベル条件を使用して実施された場合でさえ、コントロール結合の>89%が保持された。同様の結果が、金曜日用量のプレパレーションからも得られた。このようなずれは、用量を調製した日にちにかかわらず、放射取り込みに影響を与えなかった。

【0099】

3. ^{90}Y 塩化物の量を過剰に添加した場合の影響

20%過剰量の ^{90}Y 塩化物を使用して、インキュベーション時間を通常使用されるものよりも60%長くすることと組み合わせて、Y2B8を調製した場合、以下の「標準的」ラベル条件によって調製された放射ラベルと比較した場合の、実質的な結合が保持された（以下の表7）。ラベル反応を8分間増加した場合、月曜日または金曜日用量プレパレーションのいずれにおいても、コントロールと比較して、結合は>90%のままであった。20%多い量の ^{90}Y 塩化物を添加しても、用量を調製した日にちにかかわらず、放射取り込みに影響を与えなかった。

【0100】

4. 抗体結合体の量を少なく添加した場合の影響

20%少ない量の結合体（2B8 - MX - DTPA）を使用して、かつインキュベーション時間を60%のばしてY2B8を調製した場合、以下の「標準的」ラベル条件で調製された放射ラベルと比較して、結合は有意な影響を受けなかった（以下の表7）。20%少ない量の結合体を添加しても、用量を調製した日にちにかかわらず、放射取り込みに影響を与えなかった。

【0101】

【表7】

表 7

ラベルの片寄り	月曜日用量の プレパレーション ^a		金曜日用量の プレパレーション ^a	
	結合コントロール ^b	%放射 取り込み	結合コントロール ^b	%放射 取り込み
1.)20%少ない量の酢酸ナトリウム 2.)反応時間を60%増加(8分)	89.4	99.1	92.5	98.7
1.)20%過剰量の ⁹⁰ Y 2.)反応時間を60%増加(8分)	90.6	99.1	91.8	98.6
1.)20%少ない量の抗体 2.)反応時間を60%増加(8分)	98.9	99.0	98.7	98.6

a 月曜日投与のプレパレーションには、反応溶液中の⁹⁰Yの濃度は17mCi/mLである;金曜日ラベルのための⁹⁰Yの濃度は8mCi/mLである。

b 「標準的な」試薬量及び5分の反応時間を使用して臨床プロトコル(RSBR-005)に従って調製したラベルされた抗体の正規化した結合値。

5. 試薬のずれと組み合わせた場合の影響

四種のずれの全てを同時に起こしたプロトコルを使用してY2B8を調製した場合、「標準的」ラベル条件で調製された放射ラベル抗体と比較して、結合ははまだ実質的に維持された(以下の表8)。月曜日プレパレーションを通常使用される最大の6分よりも30%長くインキュベートした場合でさえ、まだ結合が>83%であった。用量を調製した日にちにかかわらず、8分間インキュベートした後でさえ、放射取り込みは、これらの累積したずれによる影響を受けなかった。

【0102】

【表8】

月曜日用量のプレパレーション		
ラベル時間(分)	結合コントロール%	%放射取り込み
2	97.6	98.7
4	93.7	98.8
6	89.5	98.8
8	83.2	98.6
金曜日用量のプレパレーション		
ラベル時間(分)	結合コントロール%	%放射取り込み
2	98.6	99.0
4	98.5	99.2
6	96.0	99.1
8	92.1	99.1

V. 考察

オペレーターに暴露される放射線を減らすために、全スケール用量の調製の代わりに、より少ないラベル反応を評価した。従って、我々は、本研究において評価された1mCiおよび10mCiラベルにより、全スケールの40mCiのプレパレーションを予測されることを立証した。この結果は、1mCi~40mCiの範囲以上において、結合および放射線取り込みに有意差がないことを示した。

【0103】

我々は、酢酸ナトリウム、 ^{90}Y 塩化物、および結合した抗体の20%量の誤差が、放射ラベルプロトコルにおけるずれの極限值である可能性を示していると判断した。さらに、8分間(通常より3分長い)の培養が有意なプロトコルのずれであると見なされる。一般に、 ^{90}Y 塩化物の半減期が短いために、放射性同位体の量は用量調製する日に依存して変更されるであろう。従って、本研究において記載された実験は、用量調製をし得る全範囲を提示するために、 ^{90}Y 塩化物を月曜日および金曜日それぞれの両方の濃度において使用して行った。

【0104】

20%少ない量の酢酸ナトリウム、かつ8分間のインキュベーションを使用して調製されたY2B8の用量は、標準的ラベル条件と比較して、有意な結合が保持された(>89%)。同様の結果が、月曜日または金曜日用量プレパレーションから得られた。月曜日または金曜日のいずれにおいても、20%多い量の⁹⁰Y塩化物を添加して、かつ8分までインキュベーションすることにより、標準的ラベル条件と比較して結合が減少された。しかし、結合は、上記の標準化された放射規格の>90%のままであった。結合は金曜日用量プレパレーションの方がわずかによかった。放射取り込みは、⁹⁰Y塩化物の量の増加によって有意な影響を受けなかった。

【0105】

全ての量のずれを同時に起こした場合の影響を評価するために、月曜日または金曜日用量で調製して、2、4、6、および8分のインキュベーション時間を比較した。8分のインキュベーション時間を使用してY2B8が月曜日に調製された場合のみ、標準化された規格にわずかに結合が合わなかった(標準化された放射規格である86.3%と比較して83.2%)。

【0106】

それぞれの引例は、本明細書の参照文献によって援用される。

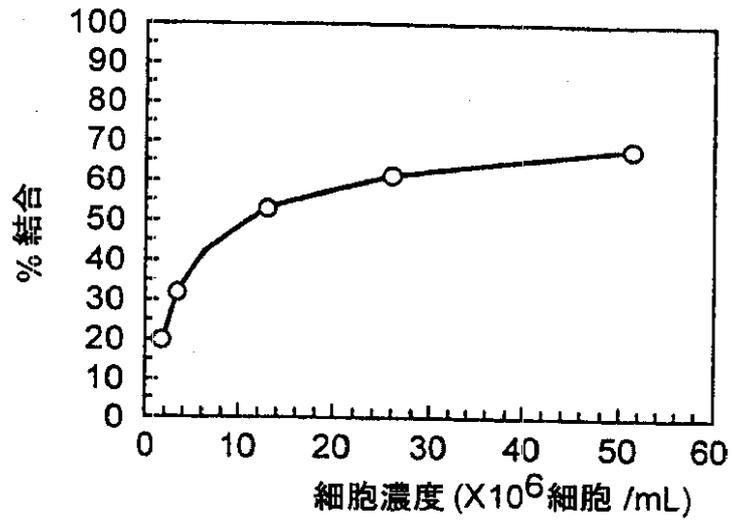
【図面の簡単な説明】

【図1】

A) SB細胞を洗浄して、希釈バッファー(1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む1×PBS、pH7.2-7.4。2B8 - MX - DTPA lot#0165A.を使用して調製した2ng/mlのY2B8で3時間インキュベートして、細胞の濃度を増加した)で 90×10^6 細胞/mlに懸濁した場合の図。B) 細胞濃度対結合した放射活性/総放射活性(B/AT)の二重逆数プロットを示す図。免疫応答性を $1/y$ -intercept $\times 100$ として推定した。免疫反応性、および相関関数(R)値は、それぞれ77.2%、および0.999であった。

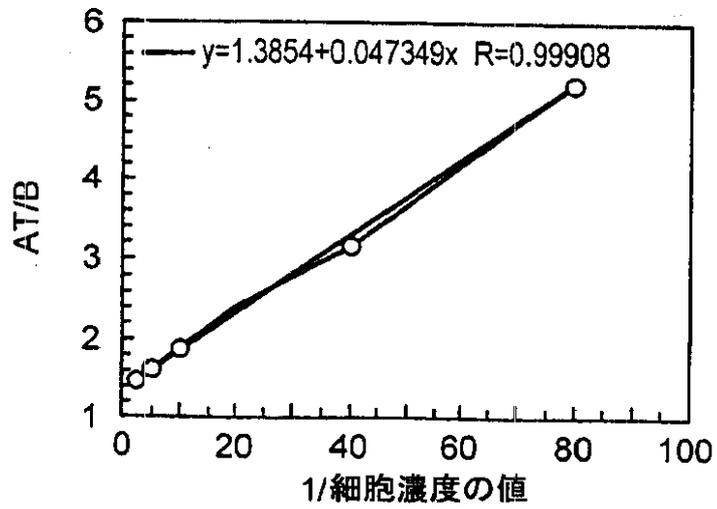
【図1】

CD20 陽性細胞と Y2B8 の結合



(A)

CD20 陽性細胞と Y2B8 の結合



(B)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/05078
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K51/08 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 G01N		
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, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 11026 A (IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION) 26 May 1994 (1994-05-26) examples	1-48
X	M. W. BRECHBIEL ET AL.: "Synthesis of 1-(p-Isothiocyanatobenzyl) derivatives of DTPA and EDTA. Antibody labelling and tumor-imaging studies." INORGANIC CHEMISTRY., vol. 25, no. 16, 1986, pages 2772-2781, XP000911112 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON., US ISSN: 0020-1669 the whole document	1-48

	-/--	
<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 18 December 2000		Date of mailing of the international search report 28/12/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Griffith, G

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/US 00/05078

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. CHINOL ET AL.: "Generator-produced Yttrium-90 for radioimmunotherapy" JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE., vol. 28, no. 9, September 1987 (1987-09), pages 1465-1470, XP002153746 SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE. NEW YORK., US ISSN: 0161-5505 cited in the application the whole document	1-48
A	US 5 595 721 A (M. S. KAMINSKI ET AL.) 21 January 1997 (1997-01-21) the whole document	1-48
A	US 5 124 471 A (O. A. GANSOW ET AL.) 23 June 1992 (1992-06-23) cited in the application the whole document	1-48
A	EP 0 529 645 A (O. A. GANSOW ET AL.) 3 March 1993 (1993-03-03) the whole document	1-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/05078

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9411026 A	26-05-1994	US 5736137 A	07-04-1998
		AT 139900 T	15-07-1996
		AT 196606 T	15-10-2000
		AU 688743 B	19-03-1998
		BG 62386 B	29-10-1999
		BG 99701 A	29-02-1996
		CA 2149329 A	26-05-1994
		DE 69303494 D	08-08-1996
		DE 69303494 T	16-01-1997
		DE 69329503 D	02-11-2000
		DK 669836 T	14-10-1996
		EP 0669836 A	06-09-1995
		EP 0752248 A	08-01-1997
		EP 1005870 A	07-06-2000
		ES 2091684 T	01-11-1996
		FI 952327 A	10-07-1995
		GR 3020731 T	30-11-1996
		JP 8503468 T	16-04-1996
		JP 3095175 B	03-10-2000
		LV 11732 A	20-04-1997
		LV 11732 B	20-10-1997
		MD 1367 B	31-12-1999
		NO 951903 A	13-07-1995
		NZ 258392 A	22-09-1997
		PL 309002 A	18-09-1995
		PL 174721 B	30-09-1998
		RU 2139731 C	20-10-1999
		US 5776456 A	07-07-1998
		US 5843439 A	01-12-1998
		AU 5603294 A	08-06-1994
		BR 1100622 A	18-04-2000
		CN 1094965 A	16-11-1994
		HU 72914 A	28-06-1996
		PL 175557 B	29-01-1999
		SG 45294 A	16-01-1998
ZA 9308466 A	20-06-1994		
US 5595721 A	21-01-1997	US 5843398 A	01-12-1998
		US 6015542 A	18-01-2000
		US 6090365 A	18-07-2000
US 5124471 A	23-06-1992	AT 167063 T	15-06-1998
		AU 638127 B	17-06-1993
		AU 7656591 A	21-10-1991
		CA 2078996 A,C	27-09-1991
		DE 69129594 D	16-07-1998
		DE 69129594 T	05-11-1998
		DK 587555 T	22-03-1999
		EP 0587555 A	23-03-1994
		ES 2117009 T	01-08-1998
		JP 7005527 B	25-01-1995
		JP 5504973 T	29-07-1993
		WO 9114459 A	03-10-1991
		US 5434287 A	18-07-1995
		US 5286850 A	15-02-1994
		EP 529645 A	03-03-1993
US 4831175 A	16-05-1989		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/05078

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 529645 A		AT 137214 T	15-05-1996
		AT 144496 T	15-11-1996
		AU 611105 B	06-06-1991
		AU 8074387 A	24-03-1988
		DE 3751788 D	30-05-1996
		DE 3751788 T	28-11-1996
		DE 3751936 D	28-11-1996
		DE 3751936 T	03-04-1997
		DE 3788961 D	10-03-1994
		DE 3788961 T	14-07-1994
		EP 0328529 A	23-08-1989
		EP 0484989 A	13-05-1992
		JP 2659351 B	30-09-1997
		JP 8231474 A	10-09-1996
		JP 2555391 B	20-11-1996
		JP 2501385 T	17-05-1990
		WO 8801618 A	10-03-1988
		US 5099069 A	24-03-1992
		US 5246692 A	21-09-1993
		AT 100794 T	15-02-1994
		KR 9203590 B	04-05-1992
		KR 9205495 B	06-07-1992

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

专利名称(译)	用钇-90标记蛋白质的试剂盒		
公开(公告)号	JP2002538164A	公开(公告)日	2002-11-12
申请号	JP2000602256	申请日	2000-02-29
[标]申请(专利权)人(译)	拜奥根有限公司 IDEC药物公司		
申请(专利权)人(译)	IDEC制药公司		
[标]发明人	チンポール		
发明人	チン、ポール		
IPC分类号	C07K1/13 A61K51/08 A61K51/10 A61P35/00 C07B59/00 G01N33/534 C07K1/02 A61K51/00 C07K16/00		
CPC分类号	A61K51/1027 A61K51/1093 G01N33/534		
FI分类号	C07K1/02 A61P35/00 C07K16/00 A61K43/00		
F-TERM分类号	4C084/AA12 4C084/MA05 4C084/MA66 4C084/NA04 4C084/ZB262 4H045/AA20 4H045/BA71 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	09/259338 1999-03-01 US		
其他公开文献	JP2002538164A5 JP4558947B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

蛋白质或肽与放射性同位素，特别是放射性标记的蛋白质缀合，使得放射性标记的蛋白质具有足够的严重性，比活性和结合亲和力，无需进一步纯化柱子即可直接施用于患者。公开了用钇90标记的方法和试剂盒。这样的试剂盒和方法在医院和门诊场所的放射免疫疗法中特别有用，以治疗癌症。

