

(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2004-505932
(P2004-505932A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 14/79
A61K 9/08
A61K 9/14
A61K 9/19
A61K 47/02

F 1

C07K 14/79
A61K 9/08
A61K 9/14
A61K 9/19
A61K 47/02

テーマコード(参考)

4 C076
4 C084
4 C085
4 H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-517105 (P2002-517105)
(86) (22) 出願日 平成13年8月7日 (2001.8.7)
(85) 翻訳文提出日 平成15年2月7日 (2003.2.7)
(86) 国際出願番号 PCT/GB2001/003531
(87) 国際公開番号 WO2002/011772
(87) 国際公開日 平成14年2月14日 (2002.2.14)
(31) 優先権主張番号 0019412.6
(32) 優先日 平成12年8月8日 (2000.8.8)
(33) 優先権主張国 イギリス(GB)

(71) 出願人 503053147
ザ・ユニヴァーシティ・オブ・ヨーク
イギリス国、ワイオーランド・ディーディ
ー・ヨーク、ヘスリントン・ホール
(74) 代理人 100099623
弁理士 奥山 尚一
(74) 代理人 100096769
弁理士 有原 幸一
(74) 代理人 100107319
弁理士 松島 鉄男
(72) 発明者 ウォルトン、ポール
イギリス国、ワイオーランド・ワイダブリ
ュー・ヨーク、ヘスリントン、ザ・ユニヴ
アーシティ・オブ・ヨーク、デパートメン
ト・オブ・ケミストリー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】造影剤としての放射性標識金属輸送タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、⁹⁹^mTcで標識された金属輸送タンパク質と、哺乳類の生体内における腫瘍などの高エネルギー／鉄取り込み組織の存在を造影および特に検出する際のその製品および使用とに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

^{99m}Tcで標識された金属輸送タンパク質複合体。

【請求項 2】

前記金属輸送タンパク質が鉄輸送タンパク質である請求項1に記載の複合体。

【請求項 3】

前記鉄輸送タンパク質がトランスフェリンである請求項2に記載の複合体。

【請求項 4】

前記トランスフェリンがラクトフェリンである請求項3に記載の複合体。

【請求項 5】

前記トランスフェリンが、オボトランスフェリンおよび血清トランスフェリンまたはそれらの一方である請求項3に記載の複合体。10

【請求項 6】

前記金属輸送タンパク質が哺乳類の組織または血液由来である請求項1～5のいずれかに記載の複合体。

【請求項 7】

前記金属輸送タンパク質が組み換えタンパク質である請求項1～6のいずれかに記載の複合体。

【請求項 8】

哺乳類の生体内における腫瘍の存在の検出および造影をする、またはそれらの一方をするための医薬を製造するための^{99m}Tcで標識された金属輸送タンパク質の使用。20

【請求項 9】

請求項2～7に記載の特徴のいずれか1つ以上をさらに含む請求項8に記載の使用。

【請求項 10】

金属輸送タンパク質と、過テクネチウム酸塩(TcO_4^-)を Tc^{3+} に変換するように Tc を変換するための還元剤とを含む製品または組成物。

【請求項 11】

請求項2～7に記載の特徴のいずれか1つ以上をさらに含む請求項10に記載の製品。

【請求項 12】

ユニット状(unิตform)で存在し、ユニットあたりの金属輸送タンパク質の量が2～60mgの範囲内である請求項10または請求項11に記載の製品。30

【請求項 13】

^{99m}Tc源をさらに含む請求項10～12のいずれか1項に記載の製品。

【請求項 14】

前記^{99m}Tc源が過テクネチウム酸塩 TcO_4^- である請求項13に記載の製品。

【請求項 15】

前記過テクネチウム酸塩源が前記製品と共に提供される請求項13または請求項14に記載の製品。

【請求項 16】

前記過テクネチウム酸塩源が、前記金属輸送タンパク質および前記還元剤とは別個に提供される請求項13または請求項14に記載の製品。40

【請求項 17】

^{99m}Tc源が水溶液として提供される請求項13～16のいずれか1項に記載の製品。

【請求項 18】

ユニット状で存在し、ユニットあたりの^{99m}Tcの量が6～8GBqの範囲内である請求項10～17のいずれか1項に記載の製品。

【請求項 19】

前記^{99m}Tcの量が約7.4GBq(200mCi)である請求項18に記載の製品。

【請求項 20】

前記還元剤が、スズ(II)化合物およびアスコルビン酸を含む群から選択される請求項50

10～19のいずれか1項に記載の製品。

【請求項21】

ユニット状で存在し、ユニットあたりの前記還元剤の量が0.2～0.3mgの範囲内である請求項10～20のいずれか1項に記載の製品。

【請求項22】

可溶化剤および等張剤またはそれらの一方をさらに含む請求項10～21のいずれか1項に記載の製品。

【請求項23】

前記可溶化剤がゲンチジン酸である請求項22に記載の製品。

【請求項24】

ユニット状で存在し、ユニットあたりの前記可溶化剤の量が0.7～0.9mgの範囲内である請求項22または請求項23に記載の製品。

【請求項25】

前記等張剤が塩化ナトリウムである請求項22に記載の製品。

【請求項26】

ユニット状で存在し、ユニットあたりの前記等張剤の量が20～40mgの範囲内である請求項22または25に記載の製品。

【請求項27】

凍結乾燥されている請求項10～26のいずれか1項に記載の製品。

【請求項28】

粉末形態で提供される請求項10～27のいずれか1項に記載の製品。

【請求項29】

還元剤の存在下において金属輸送タンパク質と^{99m}TcO₄⁻源を混合するステップを含む^{99m}Tcで標識された金属輸送タンパク質複合体を製造する方法。

【請求項30】

請求項2～28の特徴のいずれか1つ以上をさらに含む請求項29に記載の方法。

【請求項31】

哺乳類の生体内における腫瘍部位の存在の造影および診断をする、またはそれらの一方をするための^{99m}Tc標識造影剤を製造するための金属輸送タンパク質の使用。

【請求項32】

哺乳類の生体内における腫瘍部位の存在の造影および診断をする、またはそれらの一方をするための造影剤を製造するための金属輸送タンパク質および還元剤の使用。

【請求項33】

哺乳類の生体内における腫瘍部位の存在の造影および診断をする、またはそれらの一方をするための^{99m}Tcで標識された金属輸送タンパク質複合体造影剤を製造するための過テクネチウム酸塩の使用。

【請求項34】

哺乳類の生体内における腫瘍の存在を検出する方法であって、

(i) ^{99m}Tcで標識された金属輸送タンパク質複合体を製造するために、還元剤および水溶液の存在下において金属輸送タンパク質と有効量の過テクネチウム酸塩とを混合するステップと、

(ii) 検討中のレシピエントに得られた水性溶剤を導入するステップと、

(iii) 所定の期間にわたってレシピエントの生体内の^{99m}Tcの画像を観察するステップと

を含む方法。

【請求項35】

請求項2～28の特徴のいずれか1つ以上をさらに含む請求項34に記載の方法。

【請求項36】

脳腫瘍を検出するための請求項34または請求項35に記載の方法。

【請求項37】

10

20

30

40

50

標識金属輸送タンパク質複合体として患者内に導入された^{99m}Tcの画像を観察するステップを含む腫瘍を検出する方法。

【請求項 38】

(i) 金属輸送タンパク質を放射性核種で標識するステップと、
 (ii) 前記放射性核種標識金属輸送タンパク質の水性製剤を製造するステップと、
 (iii) 治療中のレシピエントに前記水性製剤を導入するステップと
 を含む、請求項29、請求項30、請求項34、請求項35または請求項36のいずれか1項に記載の方法および請求項10~28のいずれか1項に記載の製品、またはそれらの一方を使用して検出される腫瘍を治療する方法。

【請求項 39】

前記腫瘍が脳腫瘍である請求項38に記載の方法。

【請求項 40】

前記放射性核種が、⁵⁷Co、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁹⁰Y、⁹⁷Ru、¹⁶⁹Yb、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²⁰³Pb、¹⁵³Smおよび²¹²Biまたはこれらのいずれかを含む群から選択される請求項38または請求項39に記載の方法。

【請求項 41】

好適に密封されたバイアルまたは容器に入れた請求項10~28のいずれか1項に記載の製品と、必要に応じて、取り扱い説明書セットとを含むキット。

【請求項 42】

好適に密封されたバイアルまたは容器に入れた請求項10~28のいずれか1項に記載の製品と、好適に密封されたバイアルまたは容器に入れた放射性核種標識金属輸送タンパク質複合体を含むさらに別の製品または組成物と、必要に応じて、取り扱い説明書セットとを含むキット。

【請求項 43】

脳腫瘍および鉄の取り込みが高い異常組織またはそれらの一方を検出するための請求項8、請求項9、請求項31、請求項32または請求項33のいずれか1項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、特に哺乳類の生体内の腫瘍部位を造影する際に使用するためであるが、このためだけではない、放射性標識金属輸送タンパク質とその使用とに関する。

【0002】

[背景技術]

核医学では、生体内の腫瘍の存在を可視化するために種々の技法が使用されている。定量的には、テクネチウム(Tc)化合物は、今日使用されている最も重要な放射性医薬品であり、推定市場占有率は80%を超える。

【0003】

放射性医学的な目的では、同位体⁹⁹Tcは、-崩壊が遅い基底状態においてではなく、準安定状態の核励起状態において、すなわち、主に-放射^{99m}Tcとして重要であり、診断的に有用な半減期は6時間である。放射性診断学においてこの放射性同位体がよく使用される主な理由の1つは、通常の臨床環境において適用可能な溶液を都合よく製造できる、操作が容易なテクネチウム「反応炉」または「発生炉」を入手しやすいことである。

【0004】

過テクネチウム酸陰イオンはヨウ素と同様に挙動し、甲状腺によって取り込まれるという原則に基づいて、甲状腺疾患の画像医学のために過テクネチウム酸陰イオン[^{99m}TcO₄]⁻を使用することが従来技術から知られている。過テクネチウム酸陰イオンは、心臓、脳、腎臓および肝臓を造影するためにも使用されている。しかし、より特異的な造影剤の需要が増すにつれ、小型ペプチドまたは生物的に活性な分子(BAM: biological active molecule)に適当なテクネチウム複合体を共有結合させたものが開発された。従来技術から知られている例には、脳の脳内血流を造影する際

10

20

30

40

50

に使用するエチレンシスティンジエステルなどのビスマミドジチオール (bisamidedithiol) プロリガンドに 99m Tc^V 複合体が結合したもの、心疾患を造影するための 99m Tc - テボロキシムおよび 99m TcN - NOET、肝胆系を造影するための 99m Tc - HID A、 99m Tc - Lido fenein、 99m Tc - Mebrofenein、腎疾患を造影するための 99m Tc - ジエチレントリアミン五酢酸、骨疾患を造影するためのホスホン酸塩リガンドの 99m Tc 複合体が挙げられる。

【0005】

画像医学における 99m Tc の使用のさらなる開発は、受容体結合に必要な基を含有するように、テクネチウム複合体の外側面を適合させることに基づいている。例えば、乳癌を同定するためにプロゲステロン受容体を 99m Tc で標識し、精神医学的状態、てんかんおよびアルツハイマー病を同定するために中枢神経系の受容体を 99m Tc で標識し、種々の抗体を 99m Tc で標識する。

10

【0006】

この群の従来技術の化合物に関する問題は、それらは組織特異的でありうるが、 99m Tc 標識プロゲステロン受容体および 99m Tc 標識腫瘍抗体だけしか腫瘍特異的造影剤として考えられないということである。さらに、これらの化合物は高価であり、製造が面倒で困難であり、取り扱いが極めて困難であることが多い。

20

【0007】

細胞選択性で、高価でなく、製造が簡単である 99m Tc 標識造影剤は、従来技術を上回る即座の利点を提供すると思われる。

20

【0008】

本発明において、本発明者らは、細胞運動の特徴を利用し、本発明者らが 99m Tc で標識した天然型タンパク質を開発した。

【0009】

他の特徴または要因の中でも、腫瘍細胞は、迅速な増殖速度によって正常細胞から識別されうる。細胞増殖速度が速いと、金属輸送タンパク質による細胞内への金属輸送の需要増加を含む、ほとんどの細胞過程のための高いエネルギー必要性が腫瘍細胞内に生じる。

【0010】

このような群の金属輸送タンパク質として、ラクトフェリン (lactoferrin) を含むトランスフェリン (transferrin) があり、トランスフェリンは、生体内で輸送機能を有する天然型タンパク質であり、本質的に、血液 - 脳関門 (blood-brain barrier) を含む全ての膜を通過して輸送する。トランスフェリンが細胞内に流入し、細胞内に鉄を放出する機序は以下のようである。循環液中のトランスフェリンは細胞表面の特異的な受容体に結合し、その後、エンドソームによって受容体 / トランスフェリン複合体として細胞質ゾル内に取り込まれる。受容体 / トランスフェリン複合体が細胞質ゾル内に存在すると、受容体 / トランスフェリン複合体は Fe³⁺ を放出またはデメタレート (demetalates) し、アポトランスフェリンおよび受容体は細胞質ゾルを介して細胞表面に放出され、そこで分解または再利用されうる。

30

【0011】

本発明者らは、本発明の造影剤を開発するために、金属輸送タンパク質が細胞を標的化する本質的な能力を組み合わせて使用した。

40

【0012】

従って、本発明は、一態様において、観血的な診査的調査を行う必要なく、臨床医が早期臨床診断を下す助けとなる腫瘍特異的造影剤を提供すると本発明者らは考えている。

【0013】

[発明の陳述]

広義的な態様において、本発明は、 99m Tc で標識された金属輸送タンパク質と、哺乳類の生体内における腫瘍の存在を造影、特に検出する際のその使用とに関する。

【0014】

本発明の第一の態様によると、 99m Tc で標識された金属輸送タンパク質複合体が提供

50

される。

【0015】

好ましくは、金属輸送タンパク質は鉄輸送であり、さらに好ましくはラクトフェリン、オボトランスフェリン(*ovotransferrin*)および/または血清トランスフェリン(*serum transferrin*)を含む群から好ましくは選択されるトランスフェリンである。金属輸送タンパク質がトランスフェリンである場合には、高いエネルギー需要および増殖速度のために腫瘍細胞によって優先的に取り込まれる。

本明細書におけるトランスフェリンへの言及は、アポタンパク質(*apo protein*)または金属負荷状態(*metal-loaded state*)の、ラクトフェリン、オボトランスフェリンおよび/または血清トランスフェリンを含むことが意図されている。

10

【0016】

本発明の標識金属輸送タンパク質複合体は、通常では金属イオンが占めている部位に⁹⁹mTcを保有すると考えられる。金属輸送タンパク質がトランスフェリンである実施態様では、タンパク質はFe³⁺イオンの代わりに⁹⁹mTc³⁺を保有し、通常の状態においてトランスフェリン糖タンパク質がFe³⁺イオンを収容するのと同様の方法で、⁹⁹mTc³⁺が占める2つの結合部位を封入し(*encapsulate*)、またはその周囲に折り重なる(*fold*)。従って、Tc-トランスフェリンの形状および構造は、天然型Fe-トランスフェリン複合体の形状および構造から大きく変形しておらず、実質的に変わっていない。⁹⁹mTc標識トランスフェリン複合体が細胞によって認識され、内因性トランスフェリンとして取り込まれ、処理されるのは、⁹⁹mTc-標識トランスフェリン複合体が内因性Fe³⁺保有トランスフェリンと構造が類似しているからである。

20

【0017】

腫瘍細胞などの迅速に分裂する細胞はエネルギーおよび栄養要求が高く、多数の通常の細胞代謝過程または活動の需要が増加している。これらのうち、要求が増加しているのは鉄の需要である。鉄金属輸送タンパク質を⁹⁹mTcの担体として使用することによって、本発明の一実施態様は、鉄需要が高い生体内の領域に自然に結合する腫瘍造影剤を提供する。同様に、他の金属輸送タンパク質を、生体内の組織または部位を選択的に標的化するために使用することができる。

30

【0018】

好ましくは、金属輸送タンパク質は哺乳類の組織または血液由来であり、さらに好ましくは組み換えタンパク質である。

【0019】

組み換えタンパク質は、肝炎ウィルスまたはHIVなどの全血中に存在する他の要因または因子による交差血液感染のリスクが回避されるという点において特に有用である。さらに、購入可能な組み換えラクトフェリンは現在豊富であるので、本発明のさらに別の利点は、従来技術の他の化合物または複合体と比較して複合体の価格が低いというところにある。組み換えタンパク質は、機能的金属輸送および受容体結合特性を保持する限り、天然のタンパク質と比較して改変されてもよい。

40

【0020】

本発明の別の態様によると、特に哺乳類の生体内における腫瘍の存在を検出する際であるが、これに限定されず、造影剤としての⁹⁹mTcで標識された金属輸送タンパク質の使用が提供される。

【0021】

好ましくは、⁹⁹mTcで標識された金属輸送タンパク質は、本明細書に記載する好ましい特徴のいずれか1つ以上をさらに含む。

【0022】

従って、本発明は、従来技術とは別の造影剤を提供する。

【0023】

本発明のさらに別の態様によると、金属輸送タンパク質と還元剤とを含む製品または組成

50

物であって、前記還元剤の機能が、タンパク質に結合することができるように、過テクネチウム酸塩 (TcO_4^-) を Tc^{3+} に変換するように Tc を変換することである、製品または組成物が提供される。これに関しては、還元剤は、還元ステップを実施することができる任意の薬剤を含んでもよい。

【0024】

好ましくは、金属輸送タンパク質は本明細書に先に記載するとおりである。

【0025】

好ましくは、本発明の製品は、2~60mgの範囲の量の金属輸送タンパク質を含む。

【0026】

好ましくは、本発明の製品または組成物は¹⁰^{99m}Tc源をさらに含み、さらに好ましくは^{99m}Tc源は過テクネチウム酸塩、すなわち、 TcO_4^- である。過テクネチウム酸塩源は本発明の製品もしくは組成物と共に好適なバイアルもしくは容器に入れて提供されても、または過テクネチウム酸塩源は別個に提供されて、使用直前に金属輸送タンパク質および還元剤に添加されてもよい。典型的には、過テクネチウム酸塩源は溶液として提供され、典型的には、過テクネチウム酸塩源は調査または治療を実施する予定の部位において生成される。

【0027】

好ましくは、本発明の製品中の^{99m}Tc量は、^{99m}Tcで標識した場合、6~8GBqの範囲内であり、さらに好ましくは約7.4GBq(200mCi)である。

【0028】

好ましくは、還元剤は、スズ(I I)塩、例えば、塩化物、亜硝酸塩および/または亜硫酸塩を含む群から選択される。調製された別の還元剤はアスコルビン酸またはアスコルビン酸塩である。²⁰

【0029】

好ましくは、本発明の製品は、0.2~0.3mgの範囲内の量の還元剤を含む。

【0030】

好ましくは、本発明の製品または組成物は、可溶化剤および/または等張剤をさらに含む。³⁰

【0031】

本明細書における等張剤への言及は、本発明の製品または組成物を生体内に導入する結果、レシピエントはショック状態に陥らず、また溶液状態の本発明の組成物のpHおよびイオン強度に対するいかなる有害作用も受けないように、本発明の組成物を、血液のpHおよびイオン強度に対して等張状態の溶液にすることができる任意の薬剤を意味することが意図されている。

【0032】

好ましくは、可溶化剤はゲンチジン酸(gentisic acid)である。可溶化剤の目的は、金属/タンパク質複合体の形成を容易にするために Tc^{3+} の可溶化を可能にすることであり、従って、提供されている例は単に1つの好適な化合物を例示しているにすぎず、本発明の適用範囲を限定する意図のものではない。⁴⁰

【0033】

好ましくは、本発明の製品は、0.7~0.9mgの範囲の量の可溶化剤を含む。

【0034】

好ましくは、等張剤は塩を含み、さらに好ましくは塩化ナトリウムである。

【0035】

好ましくは、本発明の製品は、20~40mgの範囲の量の等張剤を含む。

【0036】

好ましくは、本発明の製品または組成物は凍結乾燥される(lyophilized)、すなわち、凍結乾燥される(freeze dried)。

【0037】

好ましくは、本発明の製品または組成物は発熱物質を含有しない。

10

20

30

40

50

【0038】

好ましくは、本発明の製品または組成物は粉末形態で提供される。

【0039】

本発明のさらに別の態様によると、還元剤の存在下において、金属輸送タンパク質と⁹⁹mTcO₄⁻源を混合するステップを含む、⁹⁹mTcで標識された金属輸送タンパク質を製造する方法が提供される。

【0040】

好ましくは、本明細書に先に記載する金属輸送タンパク質および還元剤は、必要に応じて、本明細書に先に記載する添加剤のいずれか1つ以上をさらに含む密封バイアルまたは容器に入れて提供される。

10

【0041】

投与前に、好適な容量の適当な水溶液を、金属輸送タンパク質および還元剤を含有するバイアルに添加する。実際には、その後バイアルを攪拌し、短い時間放置し、成分を水性溶剤(aqueous medium)に確実に溶解させる。

【0042】

好ましくは、⁹⁹mTcO₄⁻源を適当な分量として得られた水性溶剤に導入する。または、⁹⁹mTc源を金属輸送タンパク質および/または還元剤および水性溶剤並びに添加することができる任意の必要な追加の成分と共に提供することができる。還元剤は、過テクネチウム酸塩を、金属輸送タンパク質によって取り込まれる⁹⁹mTcの形態に変換し、その結果、得られた複合体が標識されると考えられている。

20

【0043】

本発明のさらに別の態様によると、哺乳類の生体内における腫瘍部位の存在を造影、特に診断するための⁹⁹mTc標識造影剤を製造するための金属輸送タンパク質の使用が提供される。

【0044】

本発明のさらに別の態様によると、哺乳類の生体内における腫瘍部位の存在を造影、特に診断するための造影剤を製造するための金属輸送タンパク質および還元剤の使用が提供される。

【0045】

本発明のさらに別の態様によると、哺乳類の生体内における腫瘍部位の存在を造影、特に診断するための⁹⁹mTcで標識された金属輸送タンパク質複合体造影剤を製造するための過テクネチウム酸塩の使用が提供される。

30

【0046】

本発明のよりさらに別の態様によると、哺乳類の生体内における腫瘍の存在を検出する方法であって、

(i) ⁹⁹mTcで標識された金属輸送タンパク質複合体を製造するために、還元剤および水性溶剤の存在下において、金属輸送タンパク質と有効量の過テクネチウム酸塩とを混合するステップと、

(ii) 検討中のレシピエントに得られた水性溶剤を導入するステップと、

(iii) 所定の期間にわたって、レシピエントの生体内の⁹⁹mTcの画像を観察するステップと

を含む方法が提供される。

40

【0047】

好ましくは、混合物は、本明細書に先に記載する添加剤および/または特徴のいずれか1つ以上を含有する。

【0048】

好ましくは、溶液状態の本発明の組成物がレシピエントの生体に注射され、さらに好ましくは、それは静脈内経路で注射される。または、本発明の組成物を経口摂取することができる。

【0049】

50

本発明のよりさらに別の態様によると、標識金属輸送タンパク質複合体として患者に導入された^{99m}Tcの画像を観察するステップを含む、腫瘍を検出する方法が提供される。

【0050】

本発明のよりさらに別の態様によると、脳腫瘍の存在を検出または診断するために本明細書に先に記載する方法の使用が提供される。

【0051】

本明細書における脳腫瘍への言及は、血液・脳関門内に生じる任意の種類の腫瘍または増殖を含むことが意図されている。

【0052】

トランスフェリン複合体が自然に取り込まれ、認識されること、および血液・脳関門を通過するトランスフェリンの本質的な能力のために、トランスフェリンを使用する本発明の製品または組成物および方法は、患者個人の脳腫瘍の存在を検出するのに特に好適である。これに関しては、本発明は、脳組織の全ての領域に接近することができる特異的な腫瘍選択性な造影剤を提供することによって、従来技術を上回る大きな利点を提供する。

10

【0053】

^{99m}Tcで標識された金属輸送タンパク質複合体は、哺乳類の生体内の腫瘍の存在を提供する便利で、価格効率の良い手段を提供することが、本発明の上記の陳述から理解される。放射性核種を搬送するために金属輸送タンパク質を使用して腫瘍が位置づけ(locate)または同定(identify)されると、本発明はまた腫瘍を治療する方法を提供する。

20

【0054】

本発明のよりさらに別の態様によると、本発明の方法または製品を使用して検出される腫瘍を治療する方法であって、

(i) 金属輸送タンパク質を放射性核種で標識するステップと、

(ii) 前記放射性核種標識金属輸送タンパク質の水性製剤を製造するステップと、

(iii) 治療中のレシピエントに前記水性製剤を導入するステップと

を含む、方法が提供される。好ましくは、本発明の方法は、ステップ(i)の前に、本発明の^{99m}Tcで標識された金属輸送タンパク質複合体で腫瘍の存在を検出するステップをさらに含む。

30

【0055】

好ましくは、放射性核種標識金属輸送タンパク質複合体は、本明細書に先に記載する特徴のいずれか1つ以上をさらに含む。

【0056】

好ましくは、放射性核種標識金属輸送タンパク質の水性製剤(aqueous formulation)は、本明細書に先に記載する添加剤のいずれか1つ以上をさらに含む。

【0057】

従って、本発明は、最初に腫瘍を位置づけし、次に、放射性核種を標識した金属輸送タンパク質のさらなる投与が確実に同じ位置に向けられる手段を提供する。従って、放射性核種標識金属輸送タンパク質は腫瘍細胞を特異的に攻撃または標的化(target)することができる。この方法では、併用療法は、腫瘍細胞の局在化因子および破壊治療因子として作用することができる。先に記載したように、トランスフェリンが血液・脳関門を通過することができることにより、この併用療法は脳腫瘍の診断および治療に特に重要であると考えられる。

40

【0058】

好ましくは、放射性核種は、⁵⁷Co、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁹⁰Y、⁹⁷Ru、¹⁶⁹Yb、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²⁰³Pb、¹⁵³Smおよび/または²¹²Biを含む群から選択される。

【0059】

本発明のよりさらに別の態様によると、好適に密封されたバイアルまたは容器に入れた本発明の製品または組成物と、必要に応じて、取り扱い説明書セットとを含むキットが提供

50

される。

【0060】

本発明のよりさらに別の態様によると、好適に密封されたバイアルまたは容器に入れた製品と、好適に密封されたバイアルまたは容器に入れた放射性核種標識金属輸送タンパク質複合体を含むさらに別の製品または組成物と、必要に応じて、取り扱い説明書セットとを含むキットが提供される。

【0061】

本発明は、以下の図面を参照にして単に例として本明細書に記載される。

【0062】

[実施例]

鉄含有タンパク質はアミノ酸残基約700の1本鎖ポリペプチド鎖からなることが知られている。ラクトフェリンおよびトランスフェリンは共に、両者間の内部配列相同性が約40%であり、非常に類似した3次構造を有する2つのロープ、N-ロープおよびC-ロープからなる。折りたたみは2つのロープにおいて同一であるが、C末端ロープはジスルフィド架橋を3つ過剰に含有し、過剰の安定性を与えている。各ロープは、鉄原子が位置する裂け目を有し、結合は立体配座の変化を誘導し、ロープに金属を閉じ込めさせる。金属への配位は、2つのチロシン残基、ヒスチジンおよびアスパラギンによる。2座炭酸塩リガンド(bidentate carbonate ligand)の協働結合も存在し、全6配位のねじれた八面体構造を生じる。炭酸塩の存在は強力な金属結合に必要である。リガンドはタンパク質骨格の異なる部分に結合し、鉄を放出するために、ロープはさらに開いた構造を取る。

【0063】

金属のトランスフェリンへの結合は、2つのチロシン残基への結合のために、UV/vvisスペクトルの新たな吸収バンドを生じる。従って、UV/vvis分光学は、白金結合などの他の部位と比較して、鉄結合部位を識別する方法を提供する。UV/vvis分光学はまた、結合の動態を検討し、種々の金属トランスフェリン複合体の結合定数を得るために、滴定実験と併用して使用されている。本明細書において、本発明者らは、トランスフェリンおよびラクトフェリンへのレニウムおよびテクニチウムの結合を測定するために同じ方法を使用している。

【0064】

腫瘍細胞は、健康な細胞より速い速度でトランスフェリンを取り込むことが知られているので、トランスフェリンおよびラクトフェリンへのTcの取り込みは、有利なことに、癌を造影する新規方法を提供する。その化学的性質がテクニチウムに類似しているレニウムを用いた本発明者らの初期の実験が本発明者らを本発明に導いた。

【0065】

[実施例1：金属／タンパク質結合]

<実験手法>

Centrificon 30限外ろ過膜を使用して、ウシアポトランスフェリンを0.1MのKClで3回洗浄して、低分子量不純物を除去した。それを10mMのHepes緩衝液(pH7.4)10cm³に溶解し、冷蔵庫で保存した。アポラクトフェリンは、標準的な手法を使用して、Fe-ラクトフェリンから調製した。ガラス容器は全て、全ての重金属を除去するために使用前に数時間酸に浸漬し、全ての実験には超高純度の水を使用した。吸湿性のために、Re₂O₇はグローブボックス中で保存し、秤量して、測定精度を確実にした。

【0066】

バックグラウンド補正として10mMのHepes緩衝液を用い、Perkin-Elmer Lambda 15分光計をUV/vvis実験に使用した。

【0067】

<Re(NTA)_nの調製>

NTAはニトロトリアセテートをいい、nはレニウムに対して溶液中に存在するNTAの

10

20

30

40

50

量である。nが1に等しいRe(NTA)は、Re原子吸光標準溶液(1010 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の1%NH₃溶液)2.30cm³に4.17cm³のNTA溶液を添加することによって調製した。マイクロリッター量の1MのNaOHを徐々に添加して、pHを5~6とした。次いで、この溶液を10mMのHepes緩衝液(pH7.4)で25cm³にし、総レニウム濃度を0.5mMとした。Re(NTA)₈およびRe(NTA)₂₀は、同じ方法であるが、それぞれ、8.34cm³および20.85cm³のNTA(0.024M)を使用して作製した。

【0068】

<Fe(NTA)₂の調製>

硝酸Fe(III)の0.01M溶液を調製し、2.50cm³を16.66cm³(2モル当量)NTA溶液(0.006M)に添加した。これを、Re(NTA)と同じ方法で作製し、0.5mMのFe(NTA)₂溶液とし、10mMのHepes緩衝液でpH7.4にした。

【0069】

<UV分光法>

最初に、280~28093,000M⁻¹cm⁻¹のバンドを使用して、UV分光法により洗浄後のアポトランスフェリンの濃度を測定した。10mMのHepes緩衝液で容量を3000 μl に增量することによって、トランスフェリンまたはラクトフェリンを約10⁻⁵Mに希釈することによって、UV試料を調製した。金属を添加する直前に、NaHCO₃(0.25M)60 μl を添加して、濃度5mMの炭酸水素塩を得た。

【0070】

<滴定実験>

滴定実験は、文献において以前に実施されているものから採用した。少量(通常、5~20 μl)のFe(NTA)₂溶液をトランスフェリンに添加し、添加ごとにスペクトルを記録した。少量のRe(NTA)₂溶液を使用するが、添加ごとに1.5時間(または適宜それ以上の時間)放置して、310Kに平衡させて、これを反復した。

【0071】

<時間依存的分光法>

2モル当量のRe(NTA)溶液をトランスフェリンまたはラクトフェリンに添加し、種々の時間間隔でスペクトルを記録した。平衡に達したら、2モル当量のFe(NTA)₂を添加し、さらにスペクトルを取った。

【0072】

<ReO₄⁻の還元>

0.149gのRe₂O₇を水100cm³に溶解して、ReO₄⁻の0.006Mのストック溶液を作製した。この溶液の0.5cm³を1cm³のSnCl₂(0.006M)および1cm³のHCl(1M)に添加した。次いで、種々の量のNTAの存在下において、UV分光法によって金属の還元をモニターした。SnCl₂の代わりに還元剤としてアスコルビン酸を使用して、この手法を反復した。

【0073】

次いで、マイクロリッター量の1MのNaOHでpHを上昇させ、10mMのHepes緩衝液を添加して、レニウム原子吸光標準と同じ方法にこの溶液を使用した。UV分光法を使用して、トランスフェリンへの添加の影響をモニターした。

【0074】

<トランスフェリンへの鉄の結合>

鉄が結合すると、280nmのアポトランスフェリンピークはサイズが減少するが、金属結合の有用な診断試験となる2つの新たなピークが240nmおよび295nmに出現する。図1は、滴定実験中にFe(NTA)₂添加ごとに得られたUV/viss差スペクトルを示す。UV差スペクトル全てのベースラインは、金属添加前のアポトランスフェリンに相当する。240nmおよび295nmの吸光度の増加は、トランスフェリン結合部位の飽和度に直接関連する。240nmの吸光度の増加をモニターし、モル吸光係数の変化

10

20

30

40

50

を求めた。トランスフェリンに対する鉄の比、 r を算出し（表1）、吸光係数の変化に対してプロットした（図2）。これは、低鉄濃度（ r が1未満である場合）における r と
の関係を示す。グラフの直線部分の傾斜は $15800 \pm 210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であると
算出され、1つの部位がFeで飽和されているトランスフェリンのモル吸光度に等しい。
2つの部位が等価であると本発明者らが考える場合には、本発明者らは、両方の部位が鉄
で飽和されているトランスフェリンのモル吸光度は、約 $31600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ で大きさが2倍であると予測できた。これらの実験は、鉄はトランスフェリンに強力に結合すること、および鉄がトランスフェリンに置換されている間でもトランスフェリンタンパク質
は無傷であり続けることを証明していると本発明者らは考える。

【0075】

10

表1：Fe(NTA)₂のrおよびAの値の算出

【表1】

容量 Fe/ μL	$10^{-3} [\text{M}] \text{ mol dm}^{-3}$	$r ([\text{Fe}]/[\text{Fe}])$	$\Delta A (240 \text{ nm})$	$\Delta \epsilon / \text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
0	1.00	0.00	0.0000	0
5	9.98	0.08	0.0108	1083
10	9.97	0.17	0.0277	2778
15	9.95	0.25	0.0378	3803
20	9.93	0.33	0.0533	5369
25	9.92	0.42	0.0624	6293
30	9.9	0.50	0.0792	7997
40	9.87	0.67	0.1098	10514
50	9.84	0.83	0.1308	13272
60	9.8	1.00	0.1537	15686
70	9.77	1.17	0.1617	16661
80	9.74	1.33	0.1718	17654
90	9.71	1.50	0.1812	18659
100	9.68	1.67	0.1852	19128
120	9.62	2.00	0.1874	19478
130	9.58	2.17	0.1903	19865

【0076】

20

<トランスフェリンへのレニウムの結合>

30

トランスフェリンへのレニウムの添加も、235 nm および 292 nm に、チロシン

* 遷移によるピークを示したが、これらのうち第2のピークは、鉄より大きさが有意に
小さい。スペクトルの可視領域にはピークは見られない。これは、トランスフェリンが結
合している、ガリウム、ネオジム、アルミニウムおよびインジウムなどのいくつかの他の
金属に見られるスペクトルに一致している。

【0077】

40

鉄によって示される瞬時の結合とは異なり、トランスフェリンへのレニウムの結合は平衡
に達するのにさらに時間がかかる。これを評価するために、2モル当量のRe(NTA)
をトランスフェリン溶液に添加し、定期的にスペクトルを取った（図3）。図4は、23
5 nm における吸光度の経時的な増加を示し、結合が完了するのに少なくとも1時間必要
であることを示している。

【0078】

310 K より低い温度またはニトロトリニアセテートがさらに多量に存在する場合などの他の
条件下では、平衡は数時間かかることがある。平衡に達したら、2モル当量のFe(NTA)
を溶液に添加し、得られたスペクトルを図3に青線で示す。鉄は結合速度がかなり
速く、スペクトルにかなり大きな影響を与えることがわかる。しかし、この遅い結合は異
常であるとは思われず、いくつかの金属は結合の完了にさらに長くかかることが報告され
ている。例えば、Sc(NTA)₂ は平衡に達するのに少なくとも2時間かかり、In(NTA)₂ は約6時間かかる。

【0079】

50

$\text{Fe}(\text{NTA})_2$ をレニウムトランスフェリンに添加する場合には(図3)、スペクトルの変化は大きく、即時的である。トランスフェリンは、レニウムに対してより鉄に対してかなり大きな親和性を有するので、レニウムは即座に置換される。これはまた、ガリウムおよびスカンジウムを含む多数の他の金属トランスフェリンに鉄を添加するとき生じる。

【0080】

<レニウム滴定実験>

アポトランスフェリンを $\text{Re}(\text{NTA})$ 、 $\text{Re}(\text{NTA})_8$ および $\text{Re}(\text{NTA})_{20}$ で滴定し、溶液が平衡に達する時間放置した後、UV差スペクトルを記録した(図5)。235 nmにおける吸光度をモル吸光係数に変換し、トランスフェリンに対するレニウムの比、 r を鉄と同じ方法で算出した(表2)。

【0081】

表2： $\text{Re}(\text{NTA})_n$ の r および $\Delta\epsilon$ の算出

【表2】

容量 $\text{Re}/\mu\text{L}$	$10^{-6}[\text{TF}]$ mol dm^{-3}	r	$\Delta A (235 \text{ nm})$			$\Delta\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$		
			$\text{Re}(\text{NTA})$	$\text{Re}(\text{NTA})_8$	$\text{Re}(\text{NTA})_{20}$	$\text{Re}(\text{NTA})$	$\text{Re}(\text{NTA})_8$	$\text{Re}(\text{NTA})_{20}$
0	7.35	0.00	0.0000	0.0000	0.0000	0	0	0
5	7.34	0.11	0.0074	0.0073	0.0069	1012	1000	936
10	7.33	0.22	0.0138	0.0143	0.0140	1876	1950	1911
15	7.31	0.33	0.0213	0.0209	0.0211	2920	2858	2889
20	7.30	0.44	0.0278	0.0270	0.0251	3820	3700	3432
25	7.29	0.56	0.0350	0.0339	0.0292	4800	4650	4004
30	7.27	0.67	0.0423	0.0414	0.0336	5814	5700	4622
35	7.27	0.78	0.0491	0.0469	0.0362	6760	6450	4979
40	7.25	0.89	0.0551	0.0506	0.0383	7598	6980	5278
45	7.24	1.00	0.0625	0.0540	0.0392	8637	7456	5417
50	7.23	1.11	0.0666	0.0578	0.0403	9218	7999	5577
60	7.21	1.33	0.0729	0.0602	0.0417	10109	8349	5777
70	7.18	1.56	0.0767	0.0615	0.0430	10678	8563	5993
80	7.16	1.78	0.0795	0.0631	0.0437	11100	8807	6110
90	7.14	2.00	0.0816	0.0643	0.0454	11435	9000	6356
100	7.11	2.22	0.0832	0.0664	0.0453	11702	9340	6370
110	7.09	2.44	0.0842	0.0683	0.0454	11875	9629	6409
120	7.07	2.67	0.0849	0.0701	0.0464	12004	9922	6565
140	7.02	3.11	0.0887	0.0708	0.0467	12639	10085	6656

【0082】

<ラクトフェリンへのレニウムの結合>

ラクトフェリンおよびレニウムを用いて同様の実験を実施した。以下にデータを記載する。次いで、 Re/NTA をアポ - タンパク質に添加し、吸光スペクトルを経時的に記録し、 Re にラクトフェリンが結合したかどうかを調べた(図6(A)、(B)および(C))並びに図7)。図6(A)、(B)、(C)および7は、レニウム結合の結果 231 nm バンドが増加することにより、レニウムがラクトフェリンに結合することを示す。

【0083】

図6(A)、(B)および(C)はアポ - ラクトフェリンと Re/NTA の反応を示す。 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ アポ - ラクトフェリンを 5 mM の炭酸水素ナトリウム(黒)に添加し、次いで 5 倍過剰量の Re/NTA を 0 分、15分、30分、90分、180分、240分、300分および420分後に添加した。図6(B)は、231 nm の吸収ピークを示すが、図6(C)は 500 nm の吸収ピークをさらに詳細に示す。図6(C)の X は、0 分および 15 分経過時の吸収ピークを示す。図6(C)の Y は、時間経過の終了時の最大吸収波長のシフトを示す。

10

20

30

40

50

【0084】

図7は、アボ-ラクトフェリンおよび炭酸水素ナトリウムと過剰量のRe/NTAの反応を示す。231nmの吸光度を経時に測定することによって、この反応をモニターした。図6(A)、6(B)、6(C)および7は、レニウムが結合する結果231nmが増加することにより、レニウムがラクトフェリンに結合することを示している。

【0085】

これらの実験は、レニウムがトランスフェリンの結合部位に挿入されて、添加約1時間以内に安定な複合体を生じることを示していると本発明者らは考える。この化学は、トランスフェリンおよびラクトフェリンとのテクニチウムの化学に直接適用可能であり、類推すると、テクニチウムおよびレニウムの化学はこのように同様であるので、トランスフェリンおよびラクトフェリンへのレニウム結合の同じ化学プロトコールを同タンパク質に対するテクニチウムの結合に使用することができる。テクニチウムの放射性のために、テクニチウムの実験は同じ方法では分析できない。トランスフェリンおよびラクトフェリンへのテクニチウム結合を用いる実験は、これらの分子種の腫瘍細胞への取り込みを直接示す。これらの実験を以下に示す。

【0086】

[実施例2：テクニチウム^{99m}によるトランスフェリンの標識および癌細胞によるTf-Tc複合体の取り込み]

<実験手法>

ストック溶液

以下の溶液を作製した。

過テクネチウム酸塩溶液(^{99m}Tc)[TcO₄⁻]：

270MBqを1mlの水溶液に入れた。

(過テクネチウム酸塩濃度： 5×10^{-12} g / MBq (3.06×10^{-14} mol / MBq))

50MBqの0.2ml溶液(1.53×10^{-12} M)

アボトランスフェリン溶液(Tf)：

0.1MのKClで3回洗浄した。最終容量 = 1.2ml、吸光度 = 0.65 (280nmにおける吸光係数 = 93,000 M⁻¹ cm⁻¹)。総Tf = 8.4×10^{-9} mol。5mlに希釈した。0.025mlを25mlに希釈した(1.68×10^{-12} mol / ml)。

スズ(還元)溶液：

SnCl₂ · 2H₂O 3.4×10^{-3} g + NaHCO₃ 4.4×10^{-3} g + Fe(NO₃)₃ 1.25×10^{-3} gの25ml溶液：

作用イオン混合物：0.25mlを25mlに希釈し、この0.025mlを25mlに希釈した。

【0087】

<溶液の組み合わせ>

先に記載したReの化学的性質に準じ、以下の溶液の組み合わせを室温において1時間混合し、その後10mlのPBSを添加し、溶液を混合した。次いで、9mlを捨て、残り1mlをPBSで20mlに希釈した。

溶液：

1) 0.2mlの^{99m}Tc[TcO₄⁻]溶液 + 0.025mlのスズ溶液。

2) 0.2mlの^{99m}Tc[TcO₄⁻]溶液 + 0.025mlのスズ溶液 + 0.2mlのTf。

【0088】

[実施例3：癌細胞による溶液の取り込み]

以下のように、実施例2の各溶液を細胞と共にインキュベーションした。細胞培養：25cm²のフラスコ4つにRT112細胞を接種し、ダルベッコの最小必須培地+5%ウシ胎仔血清中で集密化するまで増殖した。取り込み検討の2時間前に、細胞をハンクス平衡

塩類溶液（H B S S）で1回洗浄し、4m1のH B S Sと共に室温において2時間インキュベーションした。次いで、細胞をP B Sで洗浄し、対応する（1～4）標識インキュベーション溶液4m1と共に室温において1.5時間インキュベーションした。次いで、インキュベーション溶液を捨て、細胞をP B Sで5回洗浄し、2m1のトリプシンで処理し、P a c k a r d社製のガンマカウンターで1m1を計測した。細胞数を概算するためにさらに別のフラスコをトリプシン処理した。各溶液を個別に計測し、結果を平均して、取り込み値を得た。

【0089】

<結果>

各場合において、Tcは腫瘍細胞に取り込まれる。細胞は貪食挙動を示すので、一部非特異的な取り込みが予想される。しかし、図8が示すように、Tfと錯体形成すると、Tc取り込みは明らかに増加する（ほぼ50%）。 10

【0090】

[実施例4：製品の作製]

以下の成分を含む製品を凍結乾燥し、発熱物質を含有しない粉末として作製した：

【表3】

化合物	量 mg
ラクトフェリン	40.0
塩化スズ(II)	0.24
ゲンチジン酸	0.84
塩化ナトリウム	30

【0091】

次いで、混合物をバイアルに入れ、密封する。次いで、混合物を使用時まで室温において保存することができる。

【0092】

[実施例5：ラクトフェリンの標識]

過テクネチウム酸塩源は過テクネチウム酸ナトリウム（^{99m}Tc）注射液（F i s s i o n社製）または過テクネチウム酸ナトリウム（^{99m}Tc）（非-F i s s i o n社製）、最大7.4G B q 200mCiである。一定量の過テクネチウム酸塩をバイアル中の3～6容量の水溶液に無菌的に添加し、数分間放置する（2～5分）。

【0093】

1人の患者の用量を調製するために、ラクトフェリンおよび他の添加剤を含有するバイアルを3～6m1の生理食塩液に溶解し、凍結乾燥した材料を溶液にするために2～5分間振とうする。約1m1以外の全ての溶液を取り、必要な量の過テクネチウム酸ナトリウム（^{99m}Tc）注射液（F i s s i o n社製）または過テクネチウム酸ナトリウム（^{99m}Tc）（非-F i s s i o n社製）に添加する。次いで、混合物を振とうし、ラクトフェリンの高標識収率を確実にする。

【0094】

[実施例6：腫瘍部位の検出]

^{99m}Tc標識ラクトフェリン複合体の単回投与を静脈内経路によって実施し、所定の時間にわたって従来の手段によって放射線を観察する。^{99m}Tcは生体内の特異的な領域に濃縮することが見出され、その領域は腫瘍部位に対応することが見出されている。

【図面の簡単な説明】

【図1】

F e (N T A)₂によるアボトランスフェリンの滴定のU V差スペクトルを例示する。

10

20

30

40

50

【図2】

アポトランスフェリンに $\text{Fe}(\text{NTA})_2$ を添加するための滴定曲線を示すグラフを例示する。

【図3】

アポトランスフェリンおよび2モル当量の $\text{Re}(\text{NTA})$ を含有する溶液の吸光度の時間依存を例示する。

【図4】

2モル当量の $\text{Re}(\text{NTA})$ を含有するアポトランスフェリンの A_{235} の時間依存を示すグラフを例示する。

【図5】

$\text{Re}(\text{NTA})$ によるアポトランスフェリンの滴定のUV差スペクトルを例示する。

【図6】

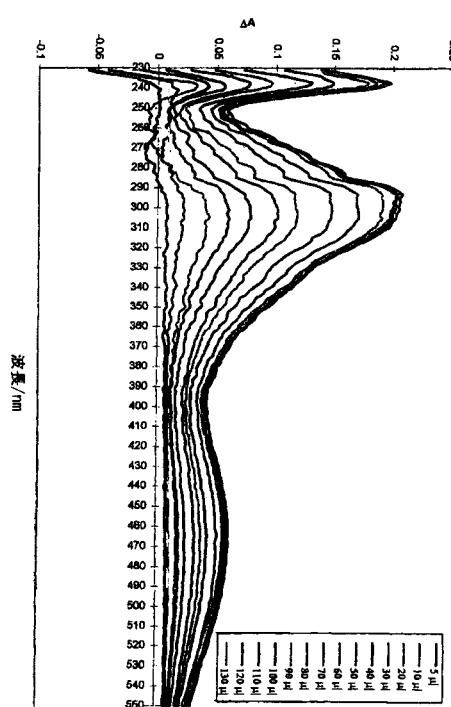
Re/NTA によるアポ - ラクトフェリンの反応を例示するグラフを例示し、図6Aは $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ のアポ - ラクトフェリンおよび5mMの炭酸水素ナトリウム（黒）、次いで0分、15分、30分、90分、180分、240分、300分、420分後に添加した5倍過剰量の Re/NTA を例示し、図6Bは、231nmの吸収ピークを例示し、図6Cは500nm領域をさらに詳細に例示し、Xは0分および15分経過時の吸収ピークを例示し、Yは時間経過曲線の終盤の最大吸収波長を例示する。

【図7】

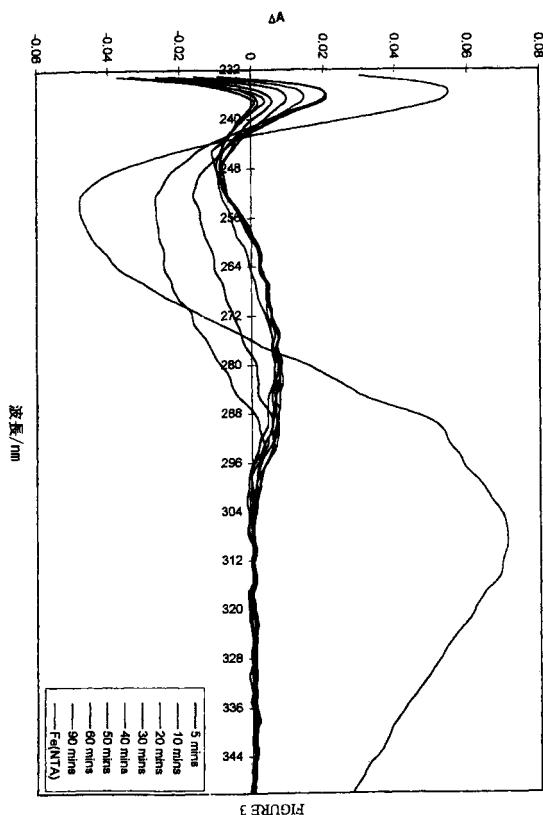
231nmの吸光度を経時的に測定することによってモニターした、アポラクトフェリンおよび炭酸水素ナトリウムの反応を例示するグラフを例示する。

【図8】

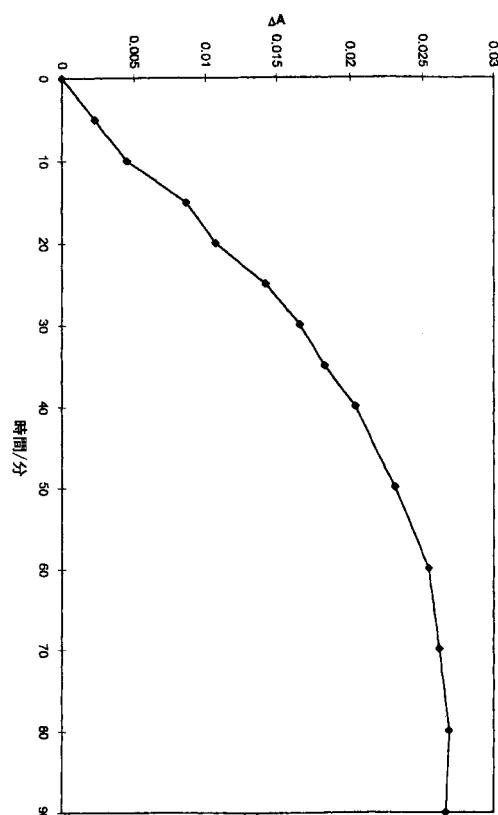
対照溶液1 (TcO_4^- および還元溶液) および溶液2 (TcO_4^- および還元溶液および Tf) の取り込みを示すグラフを例示する。

【図1】

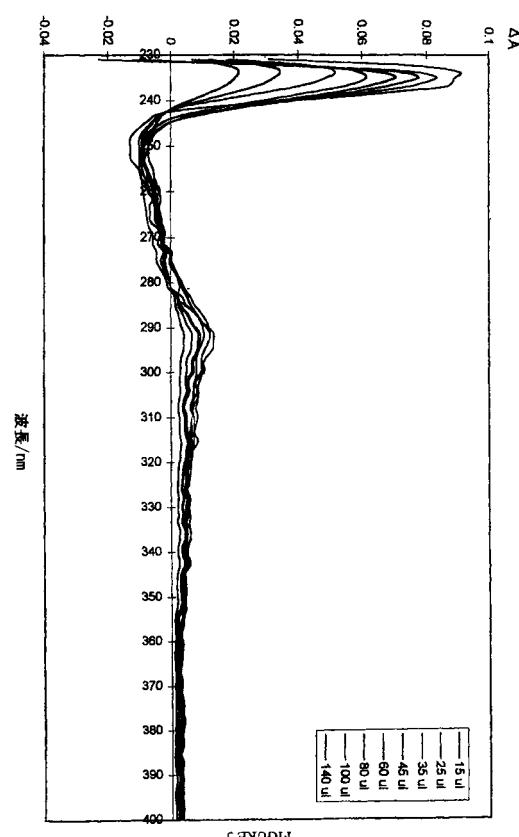
【 図 3 】



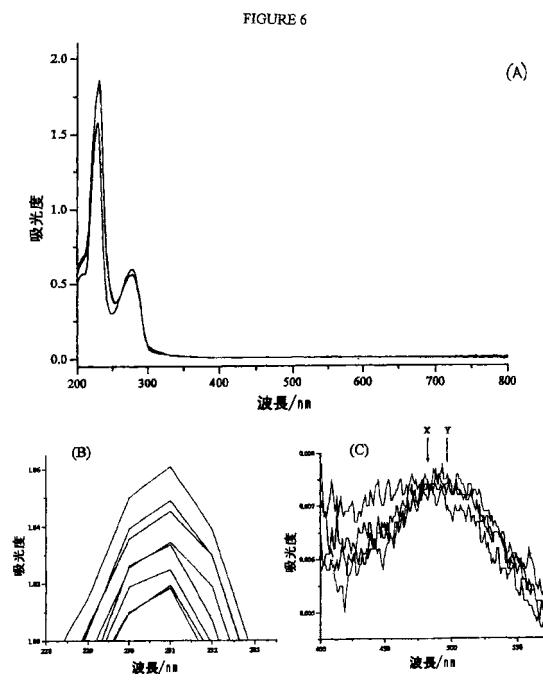
【 図 4 】



【 図 5 】

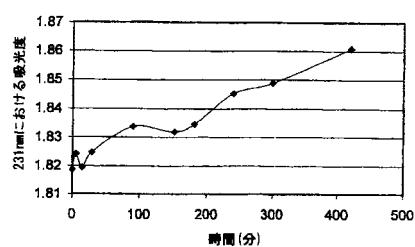


【 図 6 】



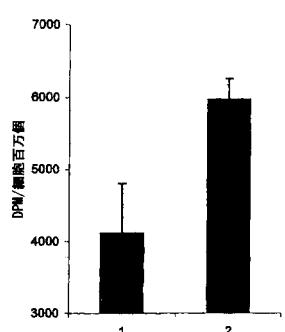
【図7】

FIGURE 7



【図8】

FIGURE 8

 99m Tc取り込み

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/11772 A2

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 51/00 (81) Designated States (national): 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/GB01/03531
- (22) International Filing Date: 7 August 2001 (07.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0019412.6 8 August 2000 (08.08.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE UNIVERSITY OF YORK [GB/GB]; Heslington Hall, York YO10 5DD (GB).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): WALTON, Paul [GB/GB]; The University of York, Department of Chemistry, Heslington, York YO1 5DD (GB).
- (74) Agent: HARRISON GODDARD FOOTE; Belgrave Hall, Belgrave Street, Leeds LS2 8DD (GB).

Published:
 — without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/11772 A2

(54) Title: RADIOLABELLED METAL TRANSPORT PROTEINS AS IMAGING AGENTS

(57) Abstract: The invention relates to a 99m Tc labelled metal transport protein, products and uses thereof in imaging and especially detecting the presence of high energy/iron uptake tissues such as a tumour within a mammalian body.

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

Radiolabelled Metal Transport Protein as Imaging Agent

The present invention relates to a radiolabelled metal-transport protein and use thereof, the radiolabelled metal transport protein being for use particularly, but not exclusively, in imaging tumour sites within a mammalian body.

Background to the Invention

In nuclear medicine, various techniques have been used to visualise the presence of a tumour within a body. In quantitative terms, technetium (Tc) compounds are by far the most important radiopharmaceuticals used today with an estimated market share of more than 80%.

For radiomedical purposes, the isotope ^{99}Tc is important not in its slowly β -decaying ground state but in a metastable, nuclear excited state, i.e. as exclusively γ -emitting $^{99\text{m}}\text{Tc}$ with a diagnostically useful half-life of six hours. One of the major reasons for the popularity of this radioisotope in radiodiagnostics is the availability of an easily operable technetium 'reactor' or 'generator', which allows the convenient preparation of applicable solutions in a normal clinical environment.

It is known from the prior art to use the pertechnetate anion [$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$] for medical imaging of thyroid disease, based on the principle that the pertechnetate anion would behave similarly to iodine and be taken up by the thyroid. The pertechnetate anion has also been used to image heart, brain, kidney and liver. However, a growing demand for more specific imaging agents has led to the development of covalently linking an appropriate technetium complex to a small peptide or biologically active molecule (BAM). Examples known from the prior art include: Tc^v complexes linked to bisamidedithiol ligands such as ethylenecysteine diester for use in imaging cerebral blood flow in the brain; $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -teboroxime and $^{99\text{m}}\text{TcN-NOET}$ for imaging the heart disease; $^{99\text{m}}\text{Tc-HIDA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-Iodofenein}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-Mebrofenin}$ for imaging the hepatobiliary system; $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -diethylenetriaminepentaacetic acid for imaging kidney

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

disease; 99m Tc complexes of phosphonate ligands for imaging bone disease. However whilst these compounds are tissue specific none of them is specific for tumour detection.

- 5 Further developments in the use of 99m Tc in medical imaging are based on adapting the outer surface of a technetium complex so as to contain groups necessary for receptor binding. For example, labelling progesterone receptors with 99m Tc to identify breast tumours, labelling central nervous system receptors with 99m Tc to identify psychiatric conditions, epilepsy and Alzheimer's disease and labelling a
10 variety of antibodies with 99m Tc.

The problem associated with this group of prior art compounds is that, whilst they may be tissue specific, only 99m Tc labelled progesterone receptors and 99m Tc labelled tumour antibodies can be considered as tumour specific imaging agents. Moreover,
15 these compounds are expensive, laborious and difficult to make and often are quite difficult to handle.

A 99m Tc labelled imaging agent that is cell selective, inexpensive and simple to make would offer immediate advantage over the prior art.

20 In the present invention we have exploited the characteristics of cell behaviour and developed a naturally occurring protein which we have labelled with 99m Tc.

Amongst other characteristics/factors, tumour cells can be distinguished from normal
25 cells by their rapid rate of proliferation. A rapid rate of cellular proliferation creates a high energy requirement in tumour cells for most cellular processes, including a high demand on metal transportation into the cell by metal transport proteins.

Once such group of metal transport proteins are transferrins which includes
30 lactoferrin and, being naturally occurring proteins within the body with a transport function, transferrins inherently transport across all membranes, including the blood-

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

brain barrier. The mechanism by which transferrins enter the cells and release iron into the cells is as follows. Circulating transferrin is bound to a specific receptor on the cell surface and is subsequently taken up as a receptor/transferrin complex by endosomes into the cytosol. Once the receptor/transferrin complex is in the cytosol 5 the receptor/transferrin complex releases the Fe³⁺ or "demetallates" and the apotransferrin and receptor are released back out through the cytosol to the cell surface where they may be degraded, or recycled.

We have used the inherent ability of metal transport proteins to target cells combined 10 to develop the imaging agents of the present invention.

Accordingly we believe that the present invention, in one aspect, provides tumour-specific imaging agents which will assist the clinician to make an early clinical diagnosis without the need for invasive exploratory investigation.

15

Statement of the Invention

In its broadest aspect the present invention relates to a ^{99m}Tc labelled metal transport protein and uses thereof in imaging and especially detecting the presence of a tumour 20 within a mammalian body.

According to a first aspect of the invention there is provided a ^{99m}Tc labelled metal transport protein complex.

25 Preferably, the metal transport protein is an iron transport protein and more preferably is a transferrin preferably selected from the group comprising lactoferrin, ovotransferrin and/or serum transferrin. When the metal transport protein is a transferrin it is preferentially taken up by tumour cells because of their high energy demand and rate of proliferation.

30

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

Reference herein to transferrin is intended to include lactoferrin, ovotransferrin and/or serum transferrin in their apoprotein or metal-loaded states.

It will be appreciated that the labelled metal transport protein complex of the present invention carries ^{99m}Tc in the sites normally occupied by the metal ions. In the embodiment where the metal transport protein is a transferrin, the protein carries $^{99m}\text{Tc}^{3+}$ in place of Fe^{3+} ions and encapsulates or folds around the two binding sites occupied by $^{99m}\text{Tc}^{3+}$ in a similar way as the transferrin glycoprotein would accommodate Fe^{3+} ions in the natural state. Accordingly, the shape/configuration of the Tc-transferrin is not dramatically distorted or substantially altered from that of the naturally occurring Fe-transferrin complex. It is because the ^{99m}Tc -labelled transferrin complex is similar in structure to endogenous Fe^{3+} carrying transferrins that the ^{99m}Tc labelled transferrin complex is likely to be recognised by cells and taken up and processed as an endogenous transferrin.

15

Rapidly dividing cells such as tumour cells have a high energy and nutrient requirements and have increased demands on a number of normal cellular metabolic processes/activities. Amongst these increased requirements is a demand for iron. By utilising the iron metal transport proteins as carriers for ^{99m}Tc , one embodiment of the present invention offers a tumour imaging agent that will naturally be attracted to areas within the body that have high iron demand. Similarly, other metal transport proteins can be used for selectively targeting tissues/sites within the body.

Preferably, the metal transport protein is derived from mammalian tissue or blood and more preferably is a recombinant protein.

Recombinant protein is of particular advantage in that the risk of cross haematological infection from other factors/agents present in whole blood, such as by hepatitis virus or HIV, is obviated. Moreover, there is a current abundance of recombinant lactoferrin that is commercially available so that a further advantage of the invention resides in the reduced cost of the complex compared to other prior art

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

compounds/complexes. The recombinant protein may be modified as compared with the natural protein, provided that it retains functional metal transport and receptor binding properties.

- 5 According to another aspect of the invention there is provided use of a ^{99m}Tc labelled metal transport protein as an imaging agent especially but not exclusively, in detecting the presence of a tumour within a mammalian body.

Preferably, the ^{99m}Tc labelled metal transport protein further includes any one or more
10 of the preferred features hereinbefore described.

The present invention therefore provides an alternative imaging agent from the prior art.

- 15 According to a yet further aspect of the invention there is provided a product or composition comprising a metal transport protein and a reducing agent, the function of the reducing agent being to convert Tc as the pertechnetate (TcO_4^-) to Tc^{3+} so that it may bind to the protein. In this respect the reducing agent may comprise any agent that is capable of performing the reduction step.

20 Preferably, the metal transport protein is as hereinbefore described.

Preferably, the product comprises an amount of metal transport protein in the range of 2-60 mg.

25 Preferably, the product or composition further includes a ^{99m}Tc source, more preferably the source is pertechnetate i.e. TcO_4^- . The pertechnetate source can be provided with the product or composition in a suitable vial or vessel or it may be provided separately therefrom and added to the metal transport protein and reducing
30 agent shortly before use. Typically, the pertechnetate source is provided as a

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

solution; typically it is generated at the site where the investigation/treatment is to take place.

Preferably, the amount of ^{99m}Tc in the product, when labelled with ^{99m}Tc , is in the 5 range of 6-8 GBq and more preferably is about 7.4 GBq (200 mCi).

Preferably, the reducing agent is selected from the group comprising a tin(II) salt for example chloride, nitrite and/or sulphite. Another prepared reducing agent is ascorbic acid/ascorbate.

10

Preferably, the product comprises an amount of reducing agent in the range of 0.2-0.3 mg.

15

Preferably, the product or composition further includes a solubilising agent and/or an isotonic agent.

20

Reference herein to an isotonic agent is intended to mean any agent which is capable of rendering the composition to an isotonic state in solution with respect to the pH and ionic strength of blood, so that upon introduction of the product or composition into a body the recipient does not enter a state of shock or suffer any adverse effect to the pH and ionic strength of the composition in solution.

25

Preferably, the solubilising agent is gentisic acid. The purpose of the solubilising agent is to enable solubilisation of the Tc^{3+} so as to facilitate formation of the metal/protein complex, and therefore the example provided merely illustrates one suitable compound and is not intended to limit the scope of the application.

Preferably, the product comprises an amount of solubilising agent in the range of 0.7-0.9 mg.

30

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

Preferably, the isotonic agent comprises a salt and more preferably is sodium chloride.

Preferably, the product comprises an amount of the isotonic agent in the range of 20-
5 40 mg.

Preferably the product or composition is lyophilised, that is to say it is freeze dried.

Preferably, the product or composition is pyrogen-free.

10 Preferably, the product or composition is provided in powder form.

According to a further aspect of the invention there is provided a method of making a
99mTc labelled metal transport protein complex comprising mixing a metal transport
15 protein with a 99mTcO₄⁻ source in the presence of a reducing agent.

Preferably, the metal transport protein and reducing agent as hereinbefore described
are provided in a sealed vial or vessel which optionally further includes any one or
more of the additives hereinbefore described.

20 Prior to administration, a suitable volume of an appropriate aqueous solution is added
to vial containing the metal transport protein and reducing agent. In practice, the vial
is subsequently agitated and allowed to stand for a short period, to ensure that the
components have dissolved into the aqueous medium.

25 Preferably, the 99mTcO₄⁻ source is introduced into the resultant aqueous medium as an
appropriate aliquot. Alternatively, the 99mTc source may be provided with the metal
transport protein and/or reducing agent and the aqueous medium as well as any
necessary additional components which can be added thereto. It will be appreciated
30 that the reducing agent converts the pertechnetate into a form of 99mTc that is taken
up by the metal transport protein so that the resultant complex is labelled.

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

According to a further aspect of the invention there is provided use of a metal transport protein for the manufacture of a 99m Tc labelled imaging agent for imaging and especially for diagnosing the presence of a tumour site within a mammalian body.

According to a further aspect of the invention there is provided use of a metal transport protein and a reducing agent for the manufacture of an imaging agent for imaging and especially for diagnosing the presence of a tumour site within a mammalian body.

According to a further aspect of the invention there is provided use of pertechnetate for the manufacture of a 99m Tc labelled metal transport protein complex imaging agent for imaging and especially for diagnosing the presence of a tumour site within a mammalian body.

According to a yet further aspect of the invention there is provided a method of detecting the presence of a tumour within a mammalian body comprising the steps of:

- 20 (i) mixing a metal transport protein with an effective amount of pertechnetate in the presence of a reducing agent and an aqueous medium so as to produce a 99m Tc labelled metal transport protein complex,
- (ii) introducing the resultant aqueous medium into a recipient under investigation, and
- 25 (iii) observing images of 99m Tc within the recipient's body over a selected period.

Preferably, the mixture contains any one or more of the additives and/or features hereinbefore described.

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

Preferably, the composition in solution is injected into the recipient's body, more preferably it is injected by the intravenous route. Alternatively the composition can be taken orally.

- 5 According to a yet further aspect of the invention there is provided a method for detecting a tumour comprising observing images of ^{99m}Tc introduced into a patient as a labelled metal transport protein complex.

According to a yet further aspect of the invention there is provided use of the method
10 as hereinbefore described for detecting/diagnosing the presence of a brain tumour.

Reference herein to brain tumour is intended to include any type of tumour or growth which occurs within the blood-brain barrier.

- 15 The product or composition and methods of the present invention which use transferrins are particularly well suited to the detection of the presence of a brain tumour in an individual because of the natural uptake and recognition of the transferrin complex and the inherent ability of transferrins to cross the blood-brain barrier. In this respect the present invention provides significant advantages over the
20 prior art by provision of a specific tumour-selective imaging agent that is able to access all areas of brain tissue.

It will be understood from the foregoing statements of invention that ^{99m}Tc labelled metal transport protein complexes provide a convenient and cost effective means of
25 detecting the presence of tumours within a mammalian body. The present invention in addition provides a method of treating the tumours once they have been located/identified by using the metal transport protein to carry a radionuclide.

- According to a yet further aspect of the invention there is provided a method of
30 treating a tumour detected using a method or product of the invention comprising the steps of:

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

- (i) labelling a metal transport protein with a radionuclide,
 - (ii) producing an aqueous formulation of the radionuclide labelled metal transport protein, and
 - (iii) introducing the aqueous formulation into a recipient under treatment.
- 5 Preferably, the method further includes the step of, prior to step (i), detecting the presence of a tumour with the 99m Tc labelled metal transport protein complex of the present invention.

Preferably, the radionuclide labelled metal transport protein complex further includes
10 any one or more of the features hereinbefore described.

Preferably, the aqueous formulation of the radionuclide labelled metal transport protein further includes any one or more of the additives hereinbefore described.

15 The method thus provides a means of firstly locating a tumour and subsequently ensuring that a further dose of a metal transport protein labelled with a radionuclide is directed to the same location. The radionuclide labelled metal transport protein is thus able to attack/target tumour cells specifically. In this way the combined therapy can act as a locator and destroyer treatment for tumour cells. As previously
20 mentioned, this combined therapy is envisaged to be of particular importance in the diagnosis and treatment of brain tumours because transferrins are able to cross the blood-brain barrier.

25 Preferably the radionuclide is selected from the group comprising 57 Co, 67 Cu, 67 Ga, 90 Y, 97 Ru, 169 Yb, 186 Re, 188 Re, 203 Pb, 153 Sm and/or 212 Bi.

According to a yet further aspect of the invention there is provided a kit comprising the product or composition of the invention in a suitably sealed vial or vessel and, optionally, a set of written instructions.

30

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

According to a yet further aspect of the invention there is provided a kit comprising the product or composition of the invention in a suitably sealed vial or vessel and a further product or composition comprising a radionuclide labelled metal transport protein complex in a suitably sealed vial or vessel and optionally, a set of written
5 instructions.

The invention will now be described by way of example only with reference to the following Figures wherein :

- 10 Figure 1 illustrates the UV difference spectra for the titration of apotransferrin with Fe(NTA)₂.
- Figure 2 illustrates a graph representing a titration curve for the addition of Fe(NTA)₂ to apotransferrin.
- Figure 3 illustrates the dependence of absorbance on time for a solution containing
15 apotransferrin and 2 Molar equivalents Re(NTA).
- Figure 4 illustrates a graph representing the dependence of A₂₃₅ on time for apotransferrin containing 2 Molar equivalents Re(NTA).
- Figure 5 illustrates the UV difference spectra for titration of apotransferrin with Re(NTA).
- 20 Figure 6 illustrates a graph representing the reaction of apo-lactoferrin with Re/NTA, Fig. 6A showing 1x10⁻⁵ M apo-lactoferrin and 5mM sodium bicarbonate (black) then with 5-fold excess Re/NTA added after 0 mins, 15, 30, 90, 180, 240, 300, 420 min.
Fig. 6B illustrates the absorption peak at 231 nm
- Fig. 6C illustrates the 500nm region in more detail, X representing absorption peak at
25 0 and 15 minutes, Y representing maximum absorption wavelength at the end of the time course.
- Figure 7 illustrates a graph representing the reaction of apolactoferrin and sodium bicarbonate with excess Re/NTA, monitored by measuring absorbance at 231nm with time.
- 30 Figure 8 illustrates a graph representing the uptake of the control Solution 1 (TcO₄⁻ and reducing solution) and Solution 2 (TcO₄⁻ and reducing solution and Tf).

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

EXAMPLES

Iron containing proteins are known to consist of a single polypeptide chain of around 5 700 amino acid residues. Both lactoferrin and transferrin consist of two lobes, the N-lobe and the C-lobe which have about 40% internal sequence homology¹ between them and very similar tertiary structure. The folding is identical in the two lobes but the C terminus lobe contains three extra disulfide bridges, giving it extra stability. 10 Each lobe has a cleft in which the iron atom sits, and binding induces a conformational change causing the lobe to close over the metal. Coordination to the metal is by two tyrosine residues, a histidine and an asparagine. There is also synergistic binding of a bidentate carbonate ligand giving an overall six coordinate, distorted octahedral geometry. The presence of the carbonate is necessary for strong metal binding. The ligands are attached to different parts of the protein backbone 15 which allows the lobes to adopt a more open structure in order to release the iron.

Metal binding to transferrin produces new absorption bands in the UV/vis spectra, due to the binding to the two tyrosinate residues. UV/vis spectroscopy therefore provides a method to distinguish between binding at the iron site compared to other 20 sites such as platinum binding. UV/vis spectroscopy has also been used in conjunction with titration experiments to study the kinetics of binding and to obtain binding constants for a variety of metal transferrin complexes. Herein we have used the same method to determine the binding of rhenium and technetium to transferrin and lactoferrin.

25 Tumour cells are known to uptake transferrin at a higher rate than healthy cells, and so incorporation of Tc into transferrin and lactoferrin advantageously provides a new method for imaging cancers. Our initial experiments with rhenium whose chemistry is similar to technetium have led us to the present invention.

30

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

Example 1**Metal/Protein Binding****Experimental procedure**

Bovine apotransferrin was washed three times with 0.1 M KCl using Centricon 30 ultra-filters to remove low molecular mass impurities. It was dissolved in 10 cm³ of 10 mM Hepes buffer (pH 7.4) and stored in a refrigerator. Apolactoferrin was prepared from Fe-lactoferrin using standard procedures. All glassware was acid soaked for several hours before use to remove any traces of heavy metals and ultrapure water was used in all experiments. Due to its hygroscopic nature, Re₂O₇ was stored and weighed in a glove box, to ensure accuracy in measurements.

A Perkin-Elmer Lambda 15 spectrophotometer was used for UV/vis experiments, with 10 mM Hepes buffer solution as background correction.

15 Preparation of Re(NTA)_n

NTA refers to nitrilotriacetate, and n is amount of NTA present in solution relative to rhenium. Re(NTA), where n is equal to 1, was prepared by adding 4.17 cm³ of NTA solution (0.006 M) to 2.30 cm³ of Re atomic absorption standard solution (1010 µg/ml in 1% HNO₃). Slow addition of microlitre amounts of 1 M NaOH was carried out to give a pH of between 5 and 6. This solution was then made up to 25 cm³ with 10 mM Hepes buffer (pH 7.4), to give an overall rhenium concentration of 0.5 mM. Re(NTA)₈ and Re(NTA)₂₀ were made in the same way but using 8.34 cm³ and 20.85 cm³ of NTA (0.024 M) respectively.

25 Preparation of Fe(NTA)₂

A 0.01 M solution of Fe(III) nitrate was prepared and 2.50 cm³ were added to 16.66 cm³ (2 molar equivalents) NTA solution (0.006 M). This was made up in the same way as Re(NTA) to give a 0.5 mM Fe(NTA)₂ solution buffered at pH 7.4 with 10 mM Hepes

30

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

UV spectroscopy

Initially the band at ϵ_{280} 280 93,000 M⁻¹ cm⁻¹ was used to determine the concentration of washed apotransferrin by UV spectrometry. UV samples were then prepared by diluting transferrin or lactoferrin to approximately 10⁻⁵ M by making the volume up 5 to 3000 µl with 10 mM Hepes buffer. Immediately before addition of the metal, 60 µl of NaHCO₃ (0.25 M) were added to give a 5 mM concentration of bicarbonate.

Titration experiments

Titration experiments were adapted from those previously carried out in the literature. Aliquots (usually between 5 and 20 µl) of the Fe(NTA)₂ solution were added to the transferrin and the spectrum recorded after each addition. This was repeated using aliquots of the Re(NTA)_n solutions, but allowing 1.5 hours (or more when appropriate) between each addition to allow equilibration at 310 K.

15 Time dependent spectroscopy

Two molar equivalents of Re(NTA) solution were added to a transferrin or lactoferrin solution and the spectrum recorded at various time intervals. After equilibrium had been reached two molar equivalents of Fe(NTA)₂ were added, and a further spectrum taken.

20

Reduction of ReO₄⁻

0.149 g of Re₂O₇ in 100 cm³ water made a 0.006 M stock solution of ReO₄⁻. 0.5 cm³ of this solution were added to 1 cm³ of SnCl₂ (0.006 M) along with 1 cm³ of HCl (1 M). The reduction of the metal was then monitored by UV spectroscopy, in the presence of varying amounts of NTA. This process was also repeated using ascorbic acid as the reducing agent in place of SnCl₂.

These solutions were then used in the same manner as the rhenium atomic absorption standard, by raising the pH with microlitre amounts of 1 M NaOH and buffering in 30 10 mM Hepes. UV spectroscopy was used to monitor the effect of addition to transferrin.

Iron binding to transferrin

Upon iron binding the apotransferrin peak at 280 nm decreases in size, while two new peaks appear at 240 and 295 nm which provide a useful diagnostic test for metal binding. Figure 1 shows the UV/vis difference spectra obtained after each addition 5 of Fe(NTA)₂ during the titration experiment. The base line of all the UV difference spectra corresponds to apotransferrin before addition of any metal. The increase in absorbance at 240 and 295 nm is directly related to the percentage saturation of transferrin binding sites. The increase in absorbance at 240 nm was monitored and the change in molar extinction coefficient. The ratio, r, of iron to transferrin was. 10 calculated (Table 1) and plotted against the change in extinction coefficient (Figure 2). This shows a relationship between r and $\Delta\epsilon$ at low iron concentrations (when r is less than one). The slope of the linear portion of the graph was calculated to be 15800 ± 210 M⁻¹ cm⁻¹ which equates to the molar absorptivity of transferrin with one site saturated with Fe. If we assume that the two sites are equivalent, we could expect the 15 molar absorptivity for transferrin with both sites saturated with iron to be twice the magnitude at approximately 31600 M⁻¹ cm⁻¹. We believe these experiments demonstrate that iron binds strongly to the transferrin and that the transferrin protein remains intact during the substitution of iron into the transferrin.

Table I: Calculation of r and As values for Fe(NTA)2

20

Volume Fe/ μ L	10^{-4} [Fe]/mol dm ⁻³	r ([Fe]/[Tf])	ΔA (240 nm)	$\Delta\epsilon$ /M ⁻¹ cm ⁻¹
0	1.00	0.00	0.0000	0
5	9.98	0.08	0.0108	1083
10	9.97	0.17	0.0277	2778
15	9.95	0.25	0.0378	3803
20	9.93	0.33	0.0533	5369
25	9.92	0.42	0.0624	6293
30	9.9	0.50	0.0792	7997
40	9.87	0.67	0.1038	10514
50	9.84	0.83	0.1366	13272
60	9.8	1.00	0.1537	15886
70	9.77	1.17	0.1617	16551
80	9.74	1.33	0.1719	17654
90	9.71	1.50	0.1812	18659
100	9.68	1.67	0.1852	19128
120	9.62	2.00	0.1874	19478
130	9.58	2.17	0.1903	19865

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

Rhenium binding to transferrin

Addition of rhenium to transferrin also showed peaks due to tyrosine $\pi-\pi^*$ transitions, at 235 and 292 nm, although the second of these is significantly smaller in magnitude than for iron. No peak is seen visible region of the spectrum. This is consistent with the spectra seen for some other metals such as gallium, neodymium, aluminium and indium with transferrin.

10 In contrast to the instantaneous binding shown by iron, the binding of rhenium to transferrin takes longer to reach an equilibrium. To assess this, two molar equivalents of Re(NTA) were added to the transferrin solution, and a spectrum taken at regular time intervals (Figure 3). Figure 4 shows the increase in absorbance at 235 nm with time and shows that at least an hour is required for the binding to reach completion.

15 Under other conditions, such as at temperatures lower than 310 K, or with more nitrilotriacetate present, the equilibration may take several hours. Once equilibrium was reached, two molar equivalents of Fe(NTA) were added to the solution and the spectrum obtained is shown by the blue line in Figure 3. It can be seen that iron has
20 a much faster rate of binding and much greater influence on the spectrum. However this slow binding does not appear to be unusual, and several metals are reported require even longer for completion of binding. For example Sc(NTA)₂ needs at least 2 h to reach equilibrium and In(NTA)₂ requires approximately 6 hours'.

25 When Fe(NTA)₂ is added to rhenium transferrin (Figure 3) the change in the spectrum is large and instantaneous. The transferrin has a much greater affinity for iron than for rhenium and so the rhenium is instantly displaced. This also occurs on the addition of iron to many other metal-transferrins including gallium⁺ and scandium

30

Rhenium titration experiments

Apotransferrin was titrated with Re(NTA), Re(NTA)₃ and Re(NTA)₂₀, and the UV difference spectra recorded after allowing time for solutions to reach equilibrium (Figures 5). The absorbance at 235 nm was converted to molar extinction coefficients, and the ratio, r, of rhenium to transferrin was calculated in the same way as for iron (Table 2).

Table 2: Calculation of r and Δε values for Re(NTA)_n

Volume 10 ⁻⁴ [Tf] Re/μL mol dm ⁻³	r [(Re/NTA)] ₀	ΔA (235 nm)			Δε/M ⁻¹ cm ⁻¹		
		Re(NTA)	Re(NTA) ₃	Re(NTA) ₂₀	Re(NTA)	Re(NTA) ₃	Re(NTA) ₂₀
0	7.35	0.00	0.0000	0.0000	0	0	0
5	7.34	0.11	0.0074	0.0073	0.0069	1012	1000
10	7.33	0.22	0.0138	0.0143	0.0140	1876	1950
15	7.31	0.33	0.0213	0.0209	0.0211	2920	2858
20	7.30	0.44	0.0279	0.0270	0.0251	3620	3700
25	7.29	0.56	0.0350	0.0339	0.0292	4600	4650
30	7.27	0.67	0.0423	0.0414	0.0336	5814	5700
35	7.27	0.78	0.0491	0.0469	0.0362	6760	6450
40	7.25	0.89	0.0561	0.0506	0.0383	7598	6980
45	7.24	1.00	0.0625	0.0540	0.0392	8637	7456
50	7.23	1.11	0.0666	0.0578	0.0403	9212	7999
60	7.21	1.33	0.0729	0.0602	0.0417	10109	8349
70	7.18	1.56	0.0767	0.0615	0.0430	10678	8563
80	7.16	1.78	0.0795	0.0631	0.0437	11100	8807
90	7.14	2.00	0.0816	0.0643	0.0454	11435	9000
100	7.11	2.22	0.0832	0.0664	0.0453	11702	9340
110	7.09	2.44	0.0842	0.0683	0.0454	11875	9629
120	7.07	2.67	0.0849	0.0701	0.0464	12004	9922
140	7.02	3.11	0.0887	0.0708	0.0467	12639	10085
						8656	

10 **Rhenium binding to lactoferrin**

Similar experiments were carried out with lactoferrin and rhenium. The data are described below. Re/NTA was then added to the apo-protein and the absorbance spectra recorded with time, to see if the Re was bound by the lactoferrin (figures 6(A), (B) and (C) and figure 7). Both Figure 6(A), (B), (C) and 7 show that rhenium binds to lactoferrin, due to the increase in the 231 nm band upon rhenium binding.

15

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

Figure 6(A), (B) and (C) represent the reaction of apo-lactoferrin with Re/NTA. 1 x 10⁻⁵M apo-lactoferrin was added to 5mM sodium bicarbonate (black) and then 5-fold excess Re/NTA was added after 0 mins, 15, 30, 90, 180, 240, 300 and 420 minutes. Figure 6(B) shows the absorption peak at 231nm, while Figure 6(C) shows the absorption peak at 500nm in more detail. X on Figure 6(C) indicates the absorption peak at 0 and 15 minutes. Y on Figure 6(C) indicates the shift in the maximum absorption wavelength at the end of the time course.

Figure 7 represents the reaction of apo-lactoferrin and sodium bicarbonate with excess Re/NTA. This reaction was monitored by measuring absorbance at 231nm with time.

Both Figure 6(A), 6(B), 6(C) and 7 show that rhenium binds to lactoferrin, due to the increase in the 231 nm band upon rhenium binding.

We believe these experiments show that rhenium can be inserted into the binding site of transferrin, giving stable complexes within about 1 hour of addition. This chemistry is directly applicable to technetium chemistry with transferrin and lactoferrin, and by analogy —since the chemistry of technetium and rhenium are so similar—the same chemical protocol for rhenium binding to transferrin and lactoferrin may be used for technetium binding to the same proteins. The technetium experiments, because of the radioactive nature of technetium cannot be analysed in the same way. The experiments with technetium binding to transferrin and lactoferrin show directly the uptake of these species into tumour cells. These experiments are described below.

25

Example 2

Labelling of Transferrin with Technetium^{99m} and uptake of Tf-Tc complex by cancer cells.

30 **Experimental Procedure:**

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

Stock solutions

The following solutions were made up.

Pertechnetate solution (^{99m}Tc) [TcO_4^-]:

- 5 270MBq received in 1ml aqueous solution.
(Pertechnetate concentration: 5×10^{-12} g/MBq (3.06×10^{-14} mol/MBq))
50 MBq in 0.2 ml (1.53×10^{-12} M)

Apotransferrin solution (Tf):

- 10 Washed 3 x with 0.1 M KCl. Final volume = 1.2 ml Absorbance = 0.65. (Extinction coefficient at 280 nm = $93,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Total Tf = 8.4×10^{-9} mol. Diluted in 5ml.
0.025 ml diluted to 25 ml (1.68×10^{-12} mol/ml)

Tin (reducing) solutions:

- 15 SnCl₂.2H₂O 34×10^{-3} g + NaHCO₃ 4.4×10^{-3} g + Fe(NO₃)₃ 12.5×10^{-3} g in 25 ml:
Working ion mixtures: 0.25 ml diluted to 25 ml and 0.025 ml of this diluted to 25 ml.

Solution combinations

- Following the Re chemistry described previously, the following combinations of
20 solutions were mixed at room temperature for 1 h after which 10 ml of PBS was
added and the solution mixed. 9 ml was then discarded and the remaining 1ml diluted
to 20 ml with PBS.

Solution: 1) 0.2 ml $^{99m}\text{Tc}[\text{TcO}_4^-]$ solution + 0.025 ml of tin solution.

- 25 2) 0.2 ml $^{99m}\text{Tc}[\text{TcO}_4^-]$ solution + 0.025 ml of tin solution + 0.2 ml Tf.

Example 3**Uptake of solutions by cancer cells**

- Each solution from Example 2 was incubated with cells as follows. Cell culture:
30 RT112 cells seeded into four 25 cm² flasks were grown to confluence in Dulbecco's
Minimum Essential Medium + 5% foetal bovine serum. 2 h prior to uptake studies

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

the cells were washed once with Hanks balanced salt solution (HBSS) and incubated for 2 h at room temperature with 4 ml of HBSS. The cells were then washed with PBS and incubated for 1.5 h at room temperature with 4 ml of the corresponding (1-4) labelled incubation solution. The incubation solution was then discarded and the 5 cells washed 5 x with PBS, treated with 2 ml of trypsin and 1ml counted on a Packard gamma counter. A further flask was trypsinized to estimate cell number. Each solution was counted independently and the results averaged to give a measure of uptake.

10 **Results**

In each case the Tc is taken-up by the tumour cells. Since the cells show phagocytotic behaviour, some non-specific uptake is expected. However, as Figure 8 shows there is a clear enhancement of Tc uptake (by almost 50%) once it is complexed to the Tf.

15

Example 4*Preparation of Product*

A product comprising the following components is made up as a lyophilised, pyrogen 20 free powder:

COMPOUND	AMOUNT mg
Lactoferrin	40.0
Tin(II)chloride	0.24
Gentisic acid	0.84
Sodium chloride	30

The mixture is then placed in a vial and sealed. The mixture can then be stored at room temperature until required for use.

25

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

Example 5*Labelling Lactoferrin*

5 The pertechnetate source is either sodium pertechnetate (^{99m}Tc) injection (Fission) or sodium pertechnetate (^{99m}Tc) (Non-Fission), maximum 7.4 GBq 200 mCi. An amount of the pertechnate is aseptically added to a volume of 3-6 ml aqueous solution in a vial and shaken and left for several minutes (2-5 minutes).

10 To prepare a dose for a single patient, the vial containing the lactoferrin and other additives is reconstituted in 3-6 ml saline solution and shaken for 2-5 minutes so as to allow the lyophilised material to reconstitute in solution. All but approximately 1 ml of the solution is withdrawn and added to the required amount of sodium pertechnetate (^{99m}Tc) injection (Fission) or sodium pertechnetate (^{99m}Tc) (Non-Fission). The mixture is then shaken to ensure a high labelling yield of lactoferrin.

15

Example 6*Detecting Tumour Site*

20 A single dose of the ^{99m}Tc labelled lactoferrin complex is administered by the i.v route and γ radiation is observed by conventional means over a selected period of time. The ^{99m}Tc is found to concentrate in specific areas within the body, the area is found to correspond to a tumour site.

25

P32057.1

21

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

Claims

1. A ^{99m}Tc labelled metal transport protein complex.
- 5 2. A complex according to claim 1 wherein the metal transport protein is an iron transport protein.
3. A complex according to claim 2 wherein the iron transport protein is a transferrin.
10
4. A complex according to claim 3 wherein the transferrin is lactoferrin.
5. A complex according to claim 3 wherein transferrin is ovotransferrin and/or serum transferrin
15
6. A complex according to any preceding claim wherein the metal transport protein is derived from mammalian tissue or blood.
7. A complex according to any preceding claim wherein the metal transport protein is a recombinant protein.
20
8. Use of a ^{99m}Tc labelled metal transport protein for the manufacture of a medicament for detecting the presence and/or imaging of a tumour within a mammalian body.
25
9. Use according to claim 8 further including any one or more of the features of claims 2 to 7.
10. A product or composition comprising a metal transport protein and a reducing agent for converting Tc as the pertechnetate (TcO_4^-) to Tc^{3+} .
30

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

11. A product according to claim 10 further including any one or more of the features of claims 2 to 7.
12. A product according either of claims 10 or 11 which is in unit form and
5 wherein the amount of metal transport protein per unit is in the range of 2-60 mg.
13. A product according to any one of claims 10 to 12 further including a ^{99m}Tc source.
- 10 14. A product according to claim 13 wherein the ^{99m}Tc source is pertechnetate TeO_4^- .
15. A product according to either of claims 13 or 14 wherein the pertechnetate source is provided together with the product.
16. A product according to either of claims 13 or 14 wherein the pertechnetate source is provided separately from the metal transport protein and reducing agent.
17. A product according to any one of claims 13 to 16 wherein the ^{99m}Tc source is
20 provided as a aqueous solution.
18. A product according to any one of claims 10 to 17 which is in unit form and wherein the amount of ^{99m}Tc per unit is in the range of 6-8 GBq.
- 25 19. A product according to claim 18 wherein the amount of ^{99m}Tc is about 7.4 GBq (200 mCi).
20. A product according to any one of claims 10 to 19 wherein the reducing agent is selected from the group comprising tin(II) compounds and ascorbic acid.

30

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

21. A product according to any one of claims 10 to 20 which is in unit form and wherein the amount of reducing agent per unit is in the range of 0.2-0.3 mg.
22. A product according to any one of claims 10 to 21 further including a
5 solubilising agent and/or an isotonic agent.
23. A product according to claim 22 wherein the solubilising agent is gentisic acid.
- 10 24. A product according to either of claims 22 or 23 which is in unit form and wherein the amount of solubilising agent per unit is in the range of 0.7-0.9 mg.
25. A product according to claim 22 wherein the isotonic agent is sodium chloride.
- 15 26. A product according to any either claim 22 or 25 which is in unit form and wherein the amount of isotonic agent per unit is in range of 20-40 mg.
27. A product according to any one of claims 10 to 26 that is lyophilised.
- 20 28. A product according to any one of claims 10 to 27 that is provided in powder form.
29. A method of making a ^{99m}Tc labelled metal transport protein complex comprising mixing a metal transport protein with a $^{99m}\text{TcO}_4^-$ source in the presence
25 of a reducing agent.
30. A method according to claim 29 further including any one or more of the features of claims 2 to 28.

30

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

31. Use of a metal transport protein for the manufacture of a 99m Tc labelled imaging agent for imaging and/or diagnosing the presence of a tumour site within a mammalian body.

5 32. Use of a metal transport protein and a reducing agent for the manufacture of an imaging agent for imaging and/or diagnosing the presence of a tumour site within a mammalian body.

10 33. Use of pertechnetate for the manufacture of a 99m Tc labelled metal transport protein complex imaging agent for imaging and/or diagnosing the presence of a tumour site within a mammalian body.

34. A method of detecting the presence of a tumour within a mammalian body comprising the steps of:

15 (i) mixing a metal transport protein with an effective amount of pertechnetate in the presence of a reducing agent and an aqueous solution so as to produce a 99m Tc labelled metal transport protein complex;
(ii) introducing the resultant aqueous medium into a recipient under investigation; and
20 (iii) observing images of 99m Tc within the recipient's body over a selected period.

35. A method according to claim 34 further including any one or more of the features of claims 2 to 28.

25 36. A method according to either claim 34 or 35 for detecting a brain tumour.

37. A method for detecting a tumour comprising observing images of 99m Tc introduced into a patient as a labelled metal transport protein complex.

30

WO 02/11772

PCT/GB01/03531

38. A method of treating a tumour detected using the method any one of claims 29, 30, 34, 35 or 36 and/or the product according to any one of claims 10 to 28 comprising the steps of:

- (i) labelling a metal transport protein with a radionuclide,
- 5 (ii) producing an aqueous formulation of the radionuclide labelled metal transport protein, and
- (iii) introducing the aqueous formulation into a recipient under treatment.

39. A method according to claim 38 wherein the tumour is a brain tumour.

10

40. A method according to either claim 38 or 39 wherein the radionuclide is selected from the group comprising ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{169}Yb , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{203}Pb , ^{153}Sm and/or ^{212}Bi .

15

41. A kit comprising the product according to any one of claims 10 to 28 in a suitably sealed vial or vessel and optionally, a set of written instructions.

20

42. A kit comprising the product according to any one of claims 10 to 28 in a suitably sealed vial or vessel and a further product or composition comprising a radionuclide labelled metal transport protein complex in a suitably sealed vial or vessel and optionally, a set of written instructions.

43. Use according to any one of claims 8, 9, 31, 32 or 33 for detecting brain tumours and/or diseased tissue with a high iron uptake.

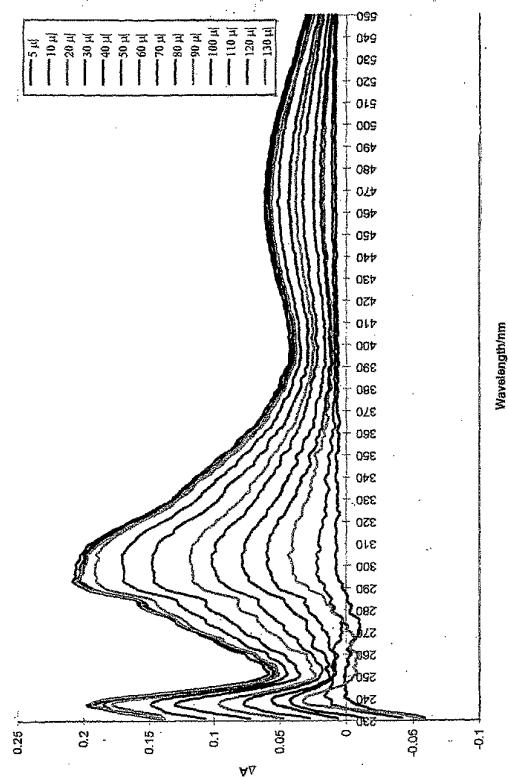
25

WO 02/L1772

PCT/GB01/03531

1/8

FIGURE 1



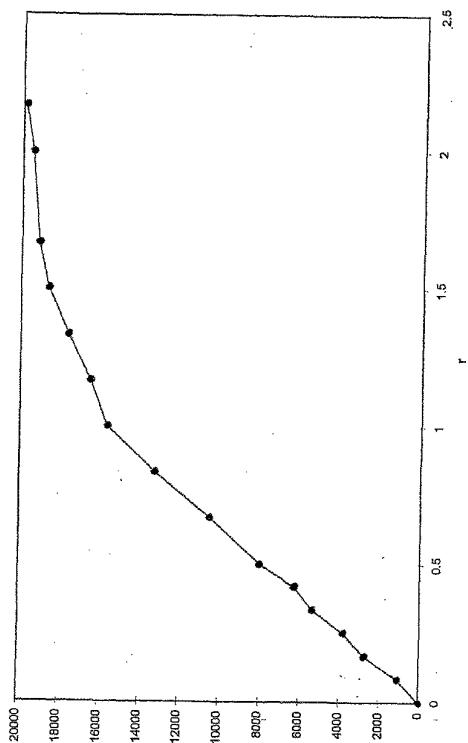
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/L1772

PCT/GB01/03531

2/8

FIGURE 2



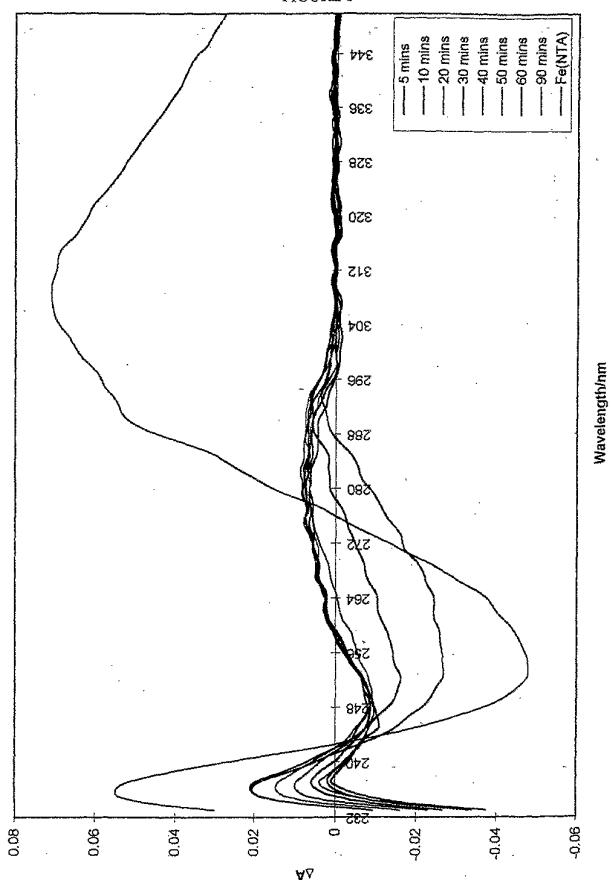
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/17772

PCT/GB01/03531

3/8

FIGURE 3



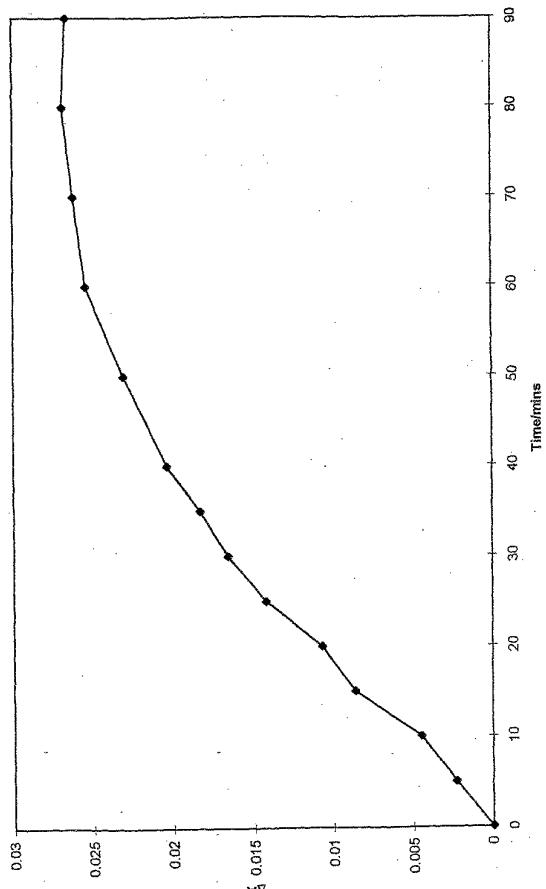
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/L1772

PCT/GB01/03531

4/8

FIGURE 4



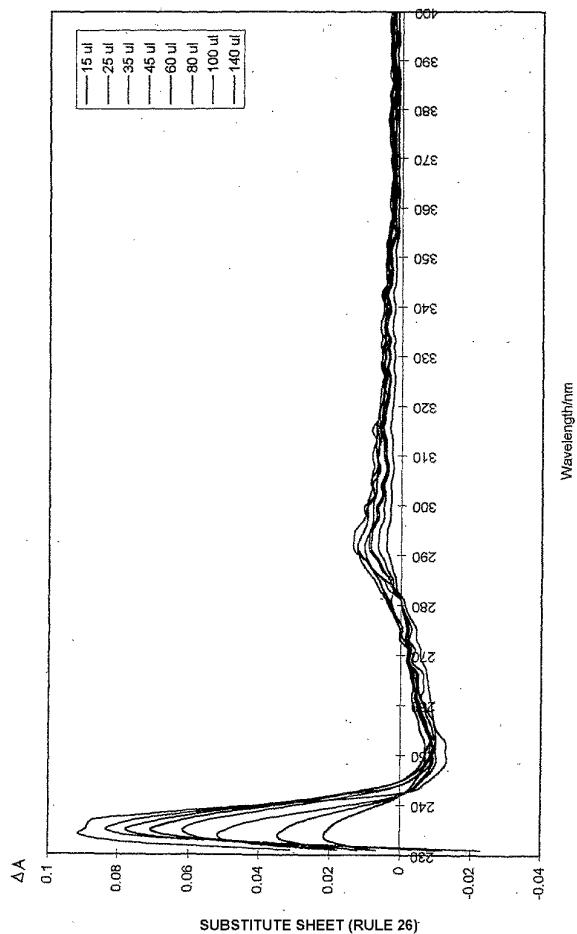
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/L1772

PCT/GB01/03531

5/8

FIGURE 5



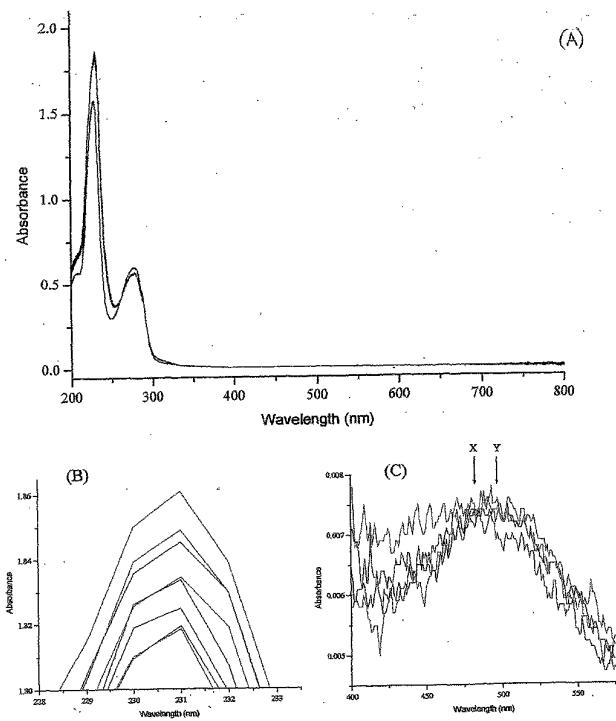
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/L1772

PCT/GB01/03531

6/8

FIGURE 6



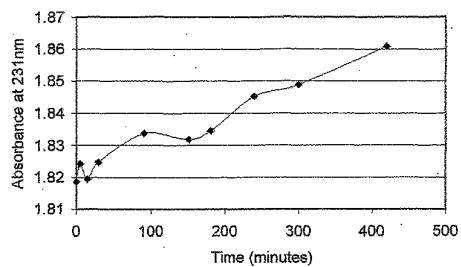
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/L1772

PCT/GB01/03531

7/8

FIGURE 7



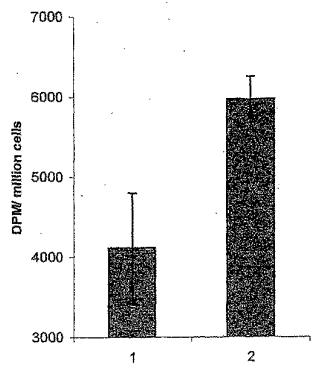
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/L1772

PCT/GB01/03531

8/8

FIGURE 8

 ^{99m}Tc uptake

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)-

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/11772 A3(51) International Patent Classification⁵: A61K 51/08,
33/00, 38/40, A61P 35/00 // (A61K 33/00, 38/40)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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(21) International Application Number: PCT/GB01/03531

(22) International Filing Date: 7 August 2001 (07.08.2001)

(25) Filing Language: English

(54) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0019412.6 8 August 2000 (08.08.2000) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
UNIVERSITY OF YORK [GB/GB]; Heslington Hall,
York YO10 5DD (GB).

(72) Inventor: and

(75) Inventor/Applicant (for US only): WALTON, Paul
[GB/GB]; The University of York, Department of Chemistry,
Heslington, York YO1 5DD (GB).(74) Agent: HARRISON GODDARD FOOTE; Belgrave
Hall, Belgrave Street, Leeds LS2 8DD (GB).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

Published:
 — with international search report
 — before the expiration of the time limit for amending the
 claims and to be republished in the event of receipt of
 amendments

(88) Date of publication of the international search report:
25 April 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/11772 A3

(54) Title: RADIOLABELLED METAL TRANSPORT PROTEINS AS IMAGING AGENTS

(57) Abstract: The invention relates to a ^{99m}Tc labelled metal transport protein, products and uses thereof in imaging and especially detecting the presence of high energy/iron uptake tissues such as a tumour within a mammalian body.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In national Application No PCT/GB 01/03531
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K51/08 A61K33/00 A61K38/40 A61P35/00 // (A61K33/00, 38:40)		
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, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VANLIC-RAZUMENIC, N.; JOKSIMOVIC, J.; RISTIC, B.; TOMIC, M.; BEATOVIC, S.; ADJINOVIC, B.: "Interaction of technetium-99m-radiopharmaceuticals with transport protein in human blood" NUCLEAR MEDICINE & BIOLOGY, vol. 20, no. 3, 1993, pages 363-365, XP001026867 abstract Materials and Methods	1-43
X	US 4 057 617 A (ABRAMOVICI JEAN ET AL) 8 November 1977 (1977-11-08) abstract column 1, line 5 -column 2, line 23 examples 1,2 claims 1-18 ---	1-43 -/-
<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 document for a 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		
Date of the actual completion of the international search 15 February 2002		Date of mailing of the international search report 25/02/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5618 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3015		Authorized officer Taylor, G.M.

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In International Application No PCT/GB 01/03531
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 01773 A (MCINNIS PATRICIA A ;BIOMIRA INC (CA); SYKES THOMAS R (CA); WOO THO) 20 January 1994 (1994-01-20) abstract claims 1-19	1-43
1		

Form PCTISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/GB 01/03531

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4057617	A	08-11-1977	BE 832363 A4 CH 613177 A5 DE 2621311 A1 GB 1534956 A JP 51142521 A SE 7605350 A BE 829128 A1 FR 2310748 A1 NL 7605147 A	01-12-1975 14-09-1979 18-11-1976 06-12-1978 08-12-1976 16-11-1976 01-09-1975 10-12-1976 17-11-1976
WO 9401773	A	20-01-1994	AT 160222 T AU 675235 B2 AU 4666893 A CA 2137561 A1 DE 69315213 D1 DE 69315213 T2 EP 0649532 A1 FI 950062 A JP 8505119 T NO 950037 A WO 9401773 A1 US 6313274 B1	15-11-1997 30-01-1997 31-01-1994 20-01-1994 18-12-1997 19-03-1998 26-04-1995 05-01-1995 04-06-1996 05-01-1995 20-01-1994 06-11-2001

Form PCT/ISA/210 (parent family annex) (July 1992)

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 K 47/12	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 51/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 1/13	
C 0 7 K 1/13	A 6 1 K 49/02	B
	A 6 1 K 43/00	

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,PL,PT,RO,R,U,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

F ターム(参考) 4C076 AA12 AA29 CC27 CC50 DD23D DD41E FF14 FF15
4C084 AA12 MA17 MA43 NA14 ZB261
4C085 HH03 JJ02 JJ11 KA11 KA29 KA34 KB09 KB82 LL18
4H045 AA10 AA20 AA30 BA71 CA40 EA51 FA10