



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104710504 B

(45)授权公告日 2019.09.13

(21)申请号 201510083376.8

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2010.07.22

C07K 1/13(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C07K 16/00(2006.01)

申请公布号 CN 104710504 A

C07K 16/28(2006.01)

(43)申请公布日 2015.06.17

C07H 1/00(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 51/00(2006.01)

61/227,710 2009.07.22 US

A61K 51/10(2006.01)

A61K 103/40(2006.01)

(62)分案原申请数据

(56)对比文件

201080036704.4 2010.07.22

US 5612016 A,1997.03.18,

(73)专利权人 钢医药股份有限公司

US 5612016 A,1997.03.18,

地址 美国新泽西

US 2003086868 A1,2003.05.08,

US 6670456 B2,2003.12.30,

(72)发明人 J·西蒙 A·G·金

审查员 段珊

J·M·莫兰诺贝穆德斯

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

权利要求书2页 说明书29页 附图15页

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(54)发明名称

用于制备放射性免疫缀合物的方法

(57)摘要

本发明公开制备包含单克隆抗体(mAb)(IgG)的放射性缀合物的方法。所述的Ac-225放射性免疫缀合物为[Ac-225]-p-SCN-Bn-DOT AIHuM195放射性免疫缀合物。

1. 一种用于制备锕-225 (Ac-225) 放射性缀合物的方法, 该方法包括以下步骤:

(a) 在缀合反应混合物中, 使螯合试剂与生物分子缀合, 从而制备缀合的生物分子,

(b) 纯化所述的反应混合物以便除去未缀合的螯合试剂, 以及

(c) 在大约37°C下, 在螯合反应混合物中, 使一个或多个Ac-225放射性核与所述的缀合的生物分子螯合, 从而制备Ac-225放射性缀合物,

其中

所述螯合试剂是S-2-(4-异硫氰基苄基)-1,4,7,10四氮杂环十二烷四乙酸 (p-SCN-Bn-DOTA) ;

所述生物分子是林妥珠单抗HuM195;

所述Ac-225的放射活性是大约1mCi;

所述HuM195以大约1mg的量存在于所述缀合反应混合物中; 且

所述Ac-225放射性缀合物的产率是至少84%。

2. 权利要求1所述的方法, 其中所述的在步骤(a)中的缀合包括在大约37°C下将所述的缀合反应混合物温育大约1.5小时。

3. 权利要求1所述的方法, 其中所述的在步骤(a)中的缀合包括在16°C至20°C下将所述的缀合反应混合物温育大约24小时。

4. 权利要求1所述的方法, 其中所述的纯化包括使所述的缀合反应混合物通过过滤器过滤以便纯化所述的缀合的生物分子。

5. 权利要求1所述的方法, 其中所述的缀合反应混合物包含碳酸氢盐缓冲剂。

6. 权利要求1所述的方法, 其中所述的缀合反应混合物包含磷酸盐缓冲剂。

7. 权利要求1所述的方法, 其中所述的缀合反应混合物的pH为8.0至9.2。

8. 权利要求4所述的方法, 其中所述的过滤是在HEPES缓冲剂中进行的。

9. 权利要求4所述的方法, 其中所述的过滤是在NaAc缓冲剂中进行的。

10. 权利要求4所述的方法, 其中所述的过滤包括分子量阻隔为至少10,000Da。

11. 权利要求4所述的方法, 其中所述的过滤包括分子量阻隔为至少20,000Da。

12. 权利要求4所述的方法, 其中所述的过滤包括分子量阻隔为至少40,000Da。

13. 权利要求1所述的方法, 其中所述的螯合反应混合物包含龙胆酸或抗坏血酸。

14. 权利要求1所述的方法, 其中所述的螯合反应混合物的pH为5.5至7.0。

15. 权利要求1所述的方法, 其中所述的在步骤(c)中的螯合包括将所述的一个或多个Ac-225放射性核与所述的缀合的生物分子温育大约1.5小时。

16. 权利要求1所述的方法, 进一步包括将终止螯合剂加入到所述的螯合反应混合物中的步骤。

17. 权利要求16所述的方法, 其中所述的终止螯合剂为二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)。

18. 权利要求16所述的方法, 进一步包括在加入所述的终止螯合剂的步骤之后在大约37°C下将所述的螯合反应混合物温育大约30分钟的步骤。

19. 一种用于制备[Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195放射性免疫缀合物的方法, 该方法包括以下步骤:

(a) 在大约37°C下, 在包含碳酸氢盐缓冲剂以及pH为8.0至9.2的缀合反应混合物中, 使p-SCN-Bn-DOTA与HuM195抗体缀合大约1.5小时, 从而制备p-SCN-Bn-DOTA/HuM195免疫缀合

物，

(b) 使所述的缀合反应混合物通过分子量阻隔为至少10,000Da的过滤器过滤,以便纯化所述的p-SCN-Bn-DOTA/HuM195免疫缀合物,其中所述的过滤是使用HEPES缓冲剂或NaAc缓冲剂进行的,

(c) 在大约37℃下,在包含龙胆酸以及pH为5.5至7.0的螯合反应混合物中,使一个或多个锕-225放射性核与所述的p-SCN-Bn-DOTA/HuM195免疫缀合物螯合大约1.5小时,从而制备[Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195放射性免疫缀合物,

(d) 将DTPA加入到所述的螯合反应混合物中,以及

(e) 在大约37℃下将所述的螯合反应混合物温育大约30分钟,

其中

所述Ac-225的放射活性是大约1mCi;

所述HuM195以大约1mg的量存在于所述缀合反应混合物中;且

所述[Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195放射性免疫缀合物的产率是至少84%。

20. 权利要求19所述的方法,其中步骤(b)中所述过滤器的分子量阻隔为至少20,000Da。

21. 权利要求19所述的方法,其中步骤(b)中所述过滤器的分子量阻隔为至少40,000Da。

22. 权利要求19所述的方法,进一步包括在所述的步骤(b)的过滤之前通过尺寸排阻树脂的尺寸排阻色谱的步骤。

23. 权利要求22所述的方法,其中所述的尺寸排阻树脂的尺寸排阻极限为大约5000Da。

24. 权利要求1所述的方法,进一步包括通过尺寸排阻树脂的尺寸排阻色谱来纯化所述的放射性缀合物。

25. 权利要求19所述的方法,进一步包括通过尺寸排阻树脂的尺寸排阻色谱纯化所述的[Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195放射性免疫缀合物。

26. 权利要求24或25所述的方法,其中所述的尺寸排阻树脂的尺寸排阻极限为大约6000Da。

27. 权利要求24或25所述的方法,其中所述的尺寸排阻树脂的尺寸排阻极限为大约5000Da。

28. 通过权利要求1或权利要求19所述的方法制备的Ac-225放射性免疫缀合物。

29. 药物组合物,其包含权利要求28的放射性免疫缀合物。

30. 权利要求29的药物组合物,其中所述组合物包含治疗学有效量的所述放射性免疫缀合物。

31. 权利要求29的药物组合物,其中所述放射性免疫缀合物的剂量介于0.001和50mg/kg体重之间。

32. 权利要求29的药物组合物,其中所述组合物包含药学可接受的载体。

33. 权利要求29的药物组合物,其中所述组合物静脉内施用。

用于制备放射性免疫缀合物的方法

[0001] 本申请是2010年7月22日提交的同名发明专利申请201080036704.4的分案申请。

[0002] 本专利公开包含受到版权保护的材料。版权所有人不反对美国专利及商标局的专利文件或记录中出现的对专利文件或专利公开的传真复制,但除此之外任何情况下均保留任何及所有的版权。

[0003] 本文提及的所有公开、专利申请、专利和其他文献均以引用方式全文并入本文。本文所指出的专利和科学文献建立了本领域的技术人员可利用的知识。本文所引用的专利公开、申请和其他公开以引用方式并入本文,如同每一份文献均以引用方式具体且单独地指出并入本文。在矛盾的情况下,以专利公开为准。

【背景技术】

[0004] 在诊断和治疗医学过程中可以使用放射性免疫缀合物。放射性药物可以携带至少一种与载体结合的放射性核,例如靶向部分。放射性核可以产生可通过放射学诊断设备检测的信号。由于放射性核发出的辐射对组织具有毒性作用,所以放射学免疫缀合物可以用于取得一种或多种治疗作用。当定位于肌体中的特定结构或位点处的放射性免疫缀合物用作治疗试剂时,其可以用于将放射性免疫缀合物的作用集中在待治疗的结构或位点中,并且可以减少肌体中其他结构和位点处的有害作用。例如,放射性免疫缀合物可以用作杀死癌组织的化疗药品。需要用于制备放射性免疫缀合物的改善的方法。本发明解决了这种需要。

【发明概述】

[0006] 在一个方面中,本文所述的方法涉及制备锕-225 (Ac-225) 放射性缀合物的方法,该方法包含以下步骤: (a) 在缀合反应混合物中,使螯合试剂与生物分子缀合,从而制备缀合的生物分子; (b) 纯化所述的反应混合物从而除去未缀合的螯合试剂; 以及 (c) 在螯合反应混合物中,使一个或多个Ac-225放射性核与缀合的生物分子螯合,从而制备Ac-225放射性缀合物。

[0007] 在一个实施方案中,步骤(a)中的缀合包含在大约37°C下将缀合反应混合物温育1.5小时。在另一个实施方案中,步骤(a)中的缀合包含在大约16°C至大约20°C下将缀合反应混合物温育大约24小时。

[0008] 在另一个实施方案中,纯化包含使缀合反应混合物通过过滤器过滤以便纯化缀合的生物分子。

[0009] 在一个实施方案中,缀合反应混合物包含碳酸氢盐缓冲剂。在另一个实施方案中,缀合反应混合物包含磷酸盐缓冲剂。在另一个实施方案中,缀合反应混合物的pH为大约8.0至大约9.2。

[0010] 在一个实施方案中,过滤是在HEPES缓冲剂中进行的。在另一个实施方案中,过滤是在NaAc缓冲剂中进行的。在另一个实施方案中,过滤包含阻隔的分子量为至少大约10,000Da、至少大约20,000Da或者至少大约40,000Da。

[0011] 在一个实施方案中,螯合反应混合物包含龙胆酸或抗坏血酸。

[0012] 在另一个实施方案中,螯合反应混合物的pH为大约5.5至大约7.0。

[0013] 在另一个实施方案中,步骤(a)中的螯合包括在大约37℃下将一个或多个Ac-225放射性核与缀合的生物分子温育大约1.5小时。

[0014] 在另一个实施方案中,所述的方法进一步包括将终止螯合剂加入到螯合反应混合物中的步骤。在一个实施方案中,终止螯合剂为二乙烯三胺五乙酸(DTPA)。在另一个实施方案中,所述的方法进一步包括在加入终止螯合剂的步骤之后在大约37℃下将螯合反应混合物温育大约30分钟的步骤。

[0015] 在一个实施方案中,所述的生物分子包含蛋白质、肽、多核苷酸、它们的组合或者它们的衍生物。

[0016] 在一个实施方案中,所述的生物分子为抗体、其抗原结合片段、包含抗体的抗原结合多肽序列的单链蛋白质、单一结构域抗体、之前所述的任何一种物质的类似物或者之前所述的任何一种物质的衍生物。在另一个实施方案中,抗原结合片段为单克隆抗体的可变区。在另一个实施方案中,所述的生物分子为包含抗体的抗原结合序列的蛋白质。在另一个实施方案中,所述的生物分子为天然、合成或重组产生的蛋白质,该蛋白质包含与细胞表面上的抗原结合的抗体的抗原结合序列。在另一个实施方案中,靶向细胞的表面上的抗原为CD-33。在另一个实施方案中,所述的生物分子为HuM195。

[0017] 在一个实施方案中,所述的放射性缀合物为放射性免疫缀合物。

[0018] 在另一个实施方案中,所述的螯合试剂为双功能螯合试剂。在一个实施方案中,所述的双功能螯合试剂为S-2-(4-异硫氰酸根合苄基)-1,4,7,10四氮杂环十二烷四乙酸(p-SCN-Bn-DOTA)。在另一个实施方案中,所述的螯合试剂选自二乙烯三胺五乙酸("DTPA");1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N",N"-四乙酸("DOTA");p-异硫氰酸根合苄基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸("pSCN-Bz-DOTA");1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N"-三乙酸("D03A");1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(2-丙酸)("DOTMA");3,6,9-三氮杂-12-氧杂-3,6,9-三羧基亚甲基-10-羧基-13-苯基-十三-烷酸("B-19036");1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N"-三乙酸("NOTA");1,4,8,11-四氮杂环十四烷-N,N',N",N"-四乙酸("TETA");三乙烯四胺六乙酸("TTHA");反式-1,2-己二胺四乙酸("CYDTA");1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-(2-羟基丙基)4,7,10-三乙酸("HP-D03A");反式-环己烷-二胺四乙酸("CDTA");反式-(1,2)-环己烷二乙烯三胺五乙酸("CDTPA");1-氧杂-4,7,10-三氮杂环十二烷-N,N',N"-三乙酸("OTTA");1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四{3-(4-羧基1)-丁酸};1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(乙酸-甲基胺);1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸);2,2',2"--(10-(2-(2,5-二氧化吡咯烷-1-基氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(DOTA-NHS酯);以及它们的衍生物、类似物和混合物。

[0019] 在另一个方面中,本文所述的方法涉及用于制备[Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195放射性免疫缀合物的方法,该方法包含以下步骤:(a)在大约37℃下,在包含碳酸氢盐缓冲剂和pH为大约8.0至大约9.2的缀合反应混合物中,使p-SCN-Bn-DOTA与HuM195抗体缀合大约1.5小时,从而制备p-SCN-Bn-DOTA/HuM195免疫缀合物;(b)使缀合反应混合物通过过滤器过滤,该过滤器阻隔的分子量为至少大约10,000Da、至少大约20,000Da或者至少大约40,000Da,以便纯化p-SCN-Bn-DOTA/HuM195免疫缀合物,其中所述的过滤是使用HEPES

缓冲剂或NaAc缓冲剂进行的；(c)在大约37°C下,在包含龙胆酸和pH为大约5.5至大约7.0的螯合反应混合物中,使一个或多个锕-225放射性核与p-SCN-Bn-DOTA/HuM195免疫缀合物螯合,从而制备[Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195放射性免疫缀合物；(d)将DTPA加入到螯合反应混合物中；以及(e)在大约37°C下,将螯合反应混合物温育大约30分钟。

[0020] 在某些实施方案中,本文所述的方法进一步包含在步骤(b)的过滤之后通过体积排阻树脂进行的体积排阻色谱的步骤。在一个实施方案中,体积排阻树脂的体积排阻极限为大约5000Da。

[0021] 在某些实施方案中,本文所述的方法进一步包含使用体积排阻树脂通过体积排阻色谱纯化放射性缀合物或[Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195放射性免疫缀合物。在一个实施方案中,体积排阻树脂的体积排出极限为大约6000Da。在另一个实施方案中,体积排阻树脂的体积排阻极限为大约5000Da。

[0022] 在另一个方面中,本发明涉及通过本文所述的方法制备的放射性免疫缀合物。

【附图简述】

[0024] 图1A粉色的为天然Hum-195的UV光谱,蓝色的为Hum-195/DOA的UV光谱。两种溶液的溶液的浓度均为大约100μg/mL;使用1cm的光路的小玻璃管测量吸光率。

[0025] 图1B HSA(0.1%,绿色)、天然Hum-195(100μg/mL,粉色)以及DTPA/NaAc(100μg/mL)的UV光谱。

[0026] 图2天然Hum195的SE-HPLC/UV色谱。

[0027] 图3使用用于定量HuM-195的UV检测器校准HPLC。

[0028] 图4所述缀合物的SE-HPLC/UV色谱。

[0029] 图5在HuM-195的定量中用于校准UV分光光度计的典型校准曲线,波长=280nm。

[0030] 图6使用Ac-225标记的缀合物(在纯化之后的主要蛋白质级份)的SE-HPLC/rad色谱。

[0031] 图7包含游离的或DTPA结合的Ac-225的SE-HPLC/rad色谱。

[0032] 图8在P-10柱和反应器小瓶+QC中纯化之后在液体级份中Ac-225的典型活力分布(总的活力为1.2mCi Ac-225)。

[0033] 图9在高分辨率Ge检测器上Ac-225和继承元素的典型γ光谱。

[0034] 图10使用CHCA作为基质溶液的天然Hum195的典型MALDI光谱。

[0035] 图11使用CHCA作为基质溶液的缀合物的典型MALDI光谱。

[0036] 图12一步及两步制备物的PAGE Gel电泳,其显示出了用于计数分析的阻隔的凝胶部分。

[0037] 图13在各个阻隔的凝胶部分中的活力。结果符合结合有HuM-195的Ac-225的大量百分率。对于一步配制物和两步配制物而言,结果是一致的。

[0038] 图14PAGE Gel电泳用于分析对照和使用一步方法得到的制备物。以与一步过程相同的方式制备对照,但是所述的抗体在与Ac-225螯合之前并未与DOTA双功能螯合试剂缀合。与一步制备物相反,对照制备物显示出极少量的Ac-225与HuM-195结合。

【发明详述】

[0040] 本发明提供了用于制备放射性免疫缀合物的方法。在一个方面中,本发明涉及用于标记单克隆抗体(mAb)(IgG)的改善的方法。在一个实施方案中,所述的方法为“后标记或

一步方法”。

[0041] 在一个方面中,本文所述的方法涉及用于制造放射性免疫缀合物的一步缀合后螯合的方法。在一个实施方案中,所述的放射性免疫缀合物为[Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/IgG(HuM195)构建体。

[0042] 本文所述的放射性免疫缀合物可以通过首先形成缀合的靶向部分、然后使放射性核与缀合的靶向部分螯合从而形成放射性免疫缀合物来制备。所述的缀合的靶向部分可以在与靶向部分缀合后的任何时间进行放射性标记。

[0043] 在一个实施方案中, mAb首先与DOTA双功能螯合试剂缀合,然后经纯化的缀合物使用Ac-225标记。根据本文所述的一些实施方案,仅需要单一的一步涉及²²⁵Ac来标记生物分子。本文所述的方法优于两步或重标记方法的益处包括但不限于符合较高的标记产率、简单以及较短的标记时间。此外,与两步或重标记方法相比,本文所述的方法的升级可以更容易地进行。此外,本文所述的方法可以用于制备试剂盒配制物,其中可以在临床位点处形成最终的放射性标记。

[0044] 在一个实施方案中,HuM-195/p-SCN-Bn-DOTA缀合物可以通过使HuM-195的浓缩溶液与p-SCN-Bn-DOTA在pH为大约8至大约9下在碳酸氢盐或磷酸盐缓冲剂中反应、并在大约37°C或室温下温育来制备。在另一个实施方案中,生物缀合物可以由过量的生物功能螯合剂通过重复过滤或离心、并通过比重体积排阻色谱(SEC)来纯化。在纯化方法过程中,所述的碳酸氢盐或磷酸盐缓冲剂被改变为N-2-羟基乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES;游离酸)或醋酸盐介质。缀合物可以通过体积排阻高效液相色谱(SE-HPLC)来表征。

[0045] 为了进行标记,在少量游离的自由基清除剂存在下,将HuM-195和²²⁵Ac溶液在醋酸盐缓冲剂中形成的pH为大约5.5至大约7.0的混合物中温育大约80至大约90分钟。在反应并使用DTPA攻击后,可以通过瞬时薄层色谱(ITLC)测定标记产率。然后可以通过比重体积排阻色谱(SEC)来纯化样品混合物。在纯化的蛋白质级份中,可以分别通过无损高分辨率γ光谱测定法以及UV分光光度法来测量²²⁵Ac和蛋白质的量。通过ITLC和/或SE-HPLC测量纯化级份中的放射化学纯度。

[0046] 在一个方面中,本发明包含具有CD33靶向部分的放射性免疫缀合物。根据本发明,靶向部分可以为合成或天然的蛋白质、或其一部分或其变体(包括物种、等位基因及突变体变体)。在一些实施方案中,靶向部分包含抗体部分。

[0047] 使用本文所述的方法制备的放射性免疫缀合物可以用于诊断或治疗医学过程中。例如,所述的放射性药物可以用作成像造影剂以便产生PET或其他X光线照相术的图像。备选地,所述的放射性药物可以用作将一定剂量的射线传递至肌体中的生理学活性的特定结构或位点处的治疗试剂。本领域的技术人员将理解所述的放射性药品的其他药物用途。

[0048] 在另一个方面中,本发明提供了用于治疗受试对象中的癌症的方法,该方法包含向所述的受试对象给药药物有效量的放射性免疫缀合物。

[0049] 在另一个方面中,本发明提供了用于治疗受试对象中的癌症的方法,该方法包含向所述的受试对象给药药物有效量的药物组合物,其中所述的组合物包含与细胞表面上的CD33分子特异性地结合的放射性免疫缀合物。

[0050] 【定义】

[0051] 除非另作说明,如本文以及所附的权利要求书中所用,单数形式“a”、“an”和“the”

包括多个所指的事物。

[0052] 术语“大约”在本文中用于指近似地，在大体上或附近的范围内。当术语“大约”与数字范围结合使用时，其通过向上及向下延伸所列数值的边界来修改所述的范围。术语“大约”在本文中用于指将所述的值向上及向下改变20%来修改数值。

[0053] 如本文所用，术语“纯度”是指在混合物中基本存在单一的化学实体或者缺乏大量的污染物。

[0054] 使用标准的分析方法，例如高效液相色谱 (HPLC) 或过滤器纯化，来测量通过所公开的方法制备的缀合分子的纯度。当通过测定缀合的靶向部分或放射性免疫缀合物的量来测量纯度时，该纯度可以高于大约70%、高于大约80%，高于大约90%，高于大约95%，高于大约96%，高于大约97%，高于大约98%或者高于大约99%。当通过测定污染物的量来测量纯度时，诸如未缀合的螯合试剂之类的污染物可以少于大约20%、少于大约10%或者少于大约1%。

[0055] 如本文所用，术语“生物分子”是指含碳分子(包含高分子)，并且包含在生物学系统中发现的任何已知的分子，包含氨基酸、抗体、蛋白质、肽、核酸(包含DNA和RNA)、糖类、多糖等。生物分子包含天然形成的以及此类分子的衍生物、类似物和修饰物的那些。此外，所述的术语是指含碳分子，例如药物、抗生素以及在医学中使用的那些等。不能在自然界中找到的包含修饰的碱基的核酸类似物被包含在生物分子的范围内。简言之，在自然界中发现的分子的任何类似物或者此类分子的任何化学修饰物也都包含在生物分子的定义内。生物分子可以由自然界来源分离得到或者在试验室中合成，例如合成的蛋白质、合成的肽或寡核苷酸。

[0056] 如本文所用，术语“靶向部分”是指起到识别特定的生物学靶向位点的任何蛋白质、抗体、抗体片段、激素、肽、生长因子、抗原、半抗原或任何其他载体。抗体及抗体片段是指任何多克隆、单克隆、嵌合、人、哺乳动物、单链、二聚以及四聚抗体或抗体片段。当此类生物学载体与官能化的络合物连接时，其起到将所连接的放射性核携带至特定的靶向组织中的作用。

[0057] 术语“抗体”是指任何多克隆、单克隆、嵌合抗体或异种抗体。在本发明的放射性核缀合物中使用的抗体为对所需的癌细胞具有高特异性的单克隆抗体。在本发明中使用的抗体可以定向针对(例如)癌、肿瘤、白血病、自身免疫紊乱，这些紊乱与免疫系统的细胞、需要被消融的正常细胞(例如骨髓和前列腺组织)、病毒感染的细胞(包括HIV、支原体、分化及其他细胞膜抗原、病原体表面抗原以及任何生物学活性分子)有关。

[0058] 适用于本文所述的方法的抗体的一些实例包括但不限于HuM195(抗-CD33), CC-11, CC-46, CC-49, CC-49F(ab')₂, CC-83, CC-83F(ab')₂和B72.3。抗体片段包括Fab片段、F(ab')₂片段以及对所需的一个或多个抗原决定部位具有特定性的抗体的任何部分。可以在本发明的放射性核缀合物中使用的抗体可以通过本领域公知的技术来制备。高特异性单克隆抗体可以通过本领域公知的杂交技术来制备，例如参见Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497 (1975) 和Eur. J. Immunol., 511-519 (1976)。

[0059] 如本文所用，术语“放射性缀合物”是指使用放射性核标记的生物分子缀合物(例如其中蛋白质缀合物的螯合试剂部分形成了具有放射性核的络合物的一类)。

[0060] 如本文所用，术语“放射性免疫缀合物”是指使用放射性核标记的靶向部分缀合物

(例如其中蛋白质缀合物的螯合试剂部分形成了具有放射性核的络合物的一类)。

[0061] 当形成本文所述的放射性免疫缀合物时,有利的是螯合和缀合度较高。

[0062] 如本文所用,术语“缀合度”和“缀合产率”可交换使用,并且被定义为与靶向部分成功缀合的螯合剂除以在缀合反应中使用的全部螯合剂的百分率。当形成所述反应的缀合靶向部分时,缀合百分率高于50%、高于70%、高于90%、高于95%、高于大约96%、高于大约97%、高于大约98%、或者高于大约99%。

[0063] 如本文所用,术语“螯合度”和“螯合产率”可交换使用,并且被定义为与缀合的靶向部分功能螯合的放射性核除以在螯合反应中使用的全部放射性核的百分率。当形成所述反应的放射性免疫缀合物时,缀合百分率高于50%、高于70%、高于90%、高于95%、高于大约96%、高于大约97%、高于大约98%、或者高于大约99%。

[0064] 如本文所述,产生的缀合度和螯合度可以取决于放射性免疫缀合物制备方法的一个或多个参数。

[0065] 根据本文所述的方法,靶向部分可以溶解于包含螯合剂的缓冲溶液中。可以选择pH以便优化在缀合反应混合物中用于使螯合剂与靶向部分缀合的条件。在一个实施方案中,缀合反应混合物可以包含碳酸氢盐缓冲剂。在另一个实施方案中,缀合反应混合物可以包含磷酸盐缓冲剂。在另一个实施方案中,缀合反应混合物的pH可以为大约8.0至大约9.2。例如,缀合反应混合物的pH可以为大约8.0、大约8.1、大约8.3、大约8.4、大约8.5、大约8.6、大约8.7、大约8.8、大约8.9、大约9.0、大约9.1或者大约9.2。此外,还可以调节缀合反应混合物的温度,以便促进螯合剂与靶向部分的缀合。在一个实施方案中,可以在大约37°C的温度下温育缀合反应混合物。在另一个实施方案中,可以将缀合反应混合物温育大约1.5小时。

[0066] 在另一个实施方案中,缀合的靶向部分可以溶解于包含放射性核的缓冲溶液中。可以选择pH以便优化在螯合反应混合物中用于使放射性核与缀合的靶向部分螯合的条件。在一个实施方案中,螯合反应混合物可以包含龙胆酸。在另一个实施方案中,螯合反应混合物的pH可以为大约5.5至大约7.0。例如,螯合反应混合物的pH可以为大约5.5、大约5.6、大约5.7、大约5.8、大约5.9、大约6.0、大约6.1、大约6.2、大约6.3、大约6.4、大约6.5、大约6.6、大约6.7、大约6.8、大约6.9或者大约7.0。

[0067] 此外,还可以调节螯合反应混合物的温度,以便促进放射性核与缀合的靶向部分的螯合。在一个实施方案中,可以在大约37°C的温度下温育螯合反应混合物。在另一个实施方案中,可以将螯合反应混合物温育大约1.5小时。在一段时间后,可以通过加入淬火螯合物(例如二乙烯三胺五乙酸(DTPA))使所述的溶液淬火,并可以纯化反应混合物。在一个实施方案中,在加入淬火螯合物之后,可以进一步温育螯合反应混合物。在一个实施方案中,在加入淬火螯合物之后,可以将螯合反应混合物进一步温育大约30分钟。在另一个实施方案中,在加入淬火螯合物之后,可以将螯合反应混合物在大约37°C下进一步温育。

[0068] **【螯合剂】**

[0069] 双功能螯合剂为具有双重功能的化合物,所述的功能为螯合金属离子,以及与具有肿瘤细胞抗原决定部位或抗原的特异性的生物学载体共价结合的能力。当此类化合物与(例如)放射活性金属粒子络合并且与特定的抗体共价链接时,可用于治疗和诊断应用中。这些类型的络合物可以用于将放射活性金属携带至肿瘤细胞处,该肿瘤细胞被所述的连接

抗体的特异性所靶向[例如参见Mears et al., Anal. Biochem. 142, 68-74 (1984); Krejcarek et al., Biochem. And Biophys. Res. Comm. 77, 581-585 (1977)]。

[0070] 大量的螯合剂是本领域已知的。例如参见Pitt et al., "The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload," In, INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE; Martell, Ed.; American Chemical Society, Washington, D.C., 1980, pp. 279-312; Lindoy, THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES; Cambridge University Press, Cambridge, 1989; Dugas, BIOORGANIC CHEMISTRY; Springer-Verlag, New York, 1989, 并且这些文献包含在本文中。

[0071] 适用于制备本文所述的放射性免疫缀合物的示例性螯合剂包括但不限于以下螯合剂,例如S-2-(4-异硫氰酸根合苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸(p-SCN-Bn-DOTA);二乙烯三胺五乙酸(DTPA);乙烯二胺四乙酸(EDTA);1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA);p-异硫氰酸根合苄基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(p-SCN-Bz-DOTA);1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N''-三乙酸(D03A);1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(2-丙酸)(DOTMA);3,6,9-三氮杂-12-氧杂-3,6,9-三羧基亚甲基-10-羧基-13-苯基-十三烷酸("B-19036");1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N''-三乙酸(NOTA);1,4,8,11-四氮杂环十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(TETA);三乙烯四胺六乙酸(TTHA);反式-1,2-己二胺四乙酸(CYDTA);1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-(2-羟基丙基)4,7,10-三乙酸(HP-D03A);反式-环己烷-二胺四乙酸(CDTA);反式-(1,2)-环己烷二乙烯三胺五乙酸(CDTPA);1-氧杂-4,7,10-三氮杂环十二烷-N,N',N''-三乙酸(OTTA);1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四{3-(4-羧基1)-丁酸};1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(乙酸-甲基胺);1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸);以及它们的衍生物。

[0072] 【放射性核】

[0073] 与缀合的靶向部分络合的放射性核可以得自任何合适的金属放射性同位素,包括但不限于锕-225,砹-211,碘-120,碘-123,碘-124,碘-125,碘-126,碘-131,碘-133,铋-212,砷-72,溴-75,溴-76,溴-77,铟-110,铟-111,铟-113m,镓-67,镓-68,锶-83,锝-89,钌-95,钌-97,钌-103,钌-105,汞-107,汞-203,铼-186,铼-188,碲-121m,碲-122m,碲-125m,铼-165,铼-167,铼-168,锝-94m,锝-99m,氟-18,银-111,铂-197,钯-109,铜-62,铜-64,铜-67,磷-32,磷-33,钇-86,钇-90,钪-47,钐-153,镥-177,锫-105,镥-142,镥-143,铽-161,钬-166,金-199,钴-57,钴-58,铬-51,铁-59,硒-75,铊-201和镱-169。

[0074] 获得225Ac放射性核的方法对于本发明而言不是重要的。例如,可以在回旋加速器中制备225Ac。可以由Department of Energy (DOE), U.S.A., 和 Institute for Transuranium Elements (ITU), Karlsruhe, Germany得到纯的225Ac。

[0075] 【纯化】

[0076] 在某些实施方案中,本文所述的方法包含将缀合的靶向部分或放射性免疫缀合物与反应混合物的其他组分分离的一个或多个步骤。在一个实施方案中,可以将混合物转移至具有特定的分子量阻隔的过滤装置(例如Millipore离心装置)中,使得反应混合物过滤通过过滤装置可以将缀合的靶向部分或放射性免疫缀合物与反应混合物的其他组分分离。在一个实施方案中,过滤反应混合物可以用于得到纯度为至少大约60%、至少大约65%、至

少大约70%、至少大约75%、至少大约80%、至少大约85%、至少大约90%、至少大约95%、至少大约97%、至少大约98%、至少大约99%或者至少大约99.5%的缀合的靶向部分或放射性免疫缀合物。

[0077] 在多个实施方案中,缀合的靶向部分或者放射性免疫缀合物的产率为至少大约70%、至少大约75%、至少大约80%、至少大约85%、至少大约90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或者至少99%的终产物。

[0078] **【靶向部分】**

[0079] 本文所述的靶向部分可以包含由免疫球蛋白质基因或者免疫球蛋白质基因的片段大部分或部分编码的一种或多种多肽。所识别的免疫球蛋白质基因包含κ、λ、α、γ、δ、ε和μ恒定区基因,以及大量的免疫球蛋白可变区基因。轻链可分为κ和λ。重链可分为γ、μ、α、δ或ε,其相应地分别定义了免疫球蛋白的种类IgG, IgM, IgA, IgD和IgE。

[0080] 基本的免疫球蛋白(抗体)结构单元已知包含四聚体。每个四聚体由两对一致的多肽链构成,每对都具有一个“轻”链(大约25kD)和一个“重”链(大约50–70kD)。各个链的N末端定义了主要负责抗原识别的大约100至110或更多氨基酸的可变区。术语可变轻链(VL)和可变重链(VH)分别指这些轻链和重链。

[0081] 抗体可以以完整的免疫球蛋白质形式或者以通过使用多种肽酶消化而产生的大量良好表征的片段形式存在。具体而言,胃蛋白酶消化了铰链区中二硫键以下的抗体,从而产生F(ab)'2,其为Fab的二聚体,其本身为通过二硫键与VH-CH1连接的轻链。F(ab)'2可以在温和的条件下还原,从而使铰链区中的二硫键断裂,由此将F(ab)'2二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体基本上为具有部分铰链区的Fab(对于多个抗体片段的术语,例如参见Fundamental Immunology, W.E.Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993))。尽管根据完整抗体的消化定义了Fab'结构域,但是本领域的技术人员将会理解的是此类Fab'片段可以以化学方式重新合成或者通过使用重组DNA方法合成。

[0082] Fab'区可以衍生自动物(特别是小鼠或大鼠)或人类起源的抗体,或者可以为嵌合的(Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81, 6851–6855 (1984))或人源化的(Jones et al., Nature 321, 522–525 (1986), 以及UK专利申请公开No. 8707252)。

[0083] 如本文所述,抗体可以包含或者衍生自任何哺乳动物,例如但不限于人类、小鼠、兔、大鼠、啮齿动物、灵长动物或它们的任意组合,并且包含分离的人类、灵长动物、啮齿动物、哺乳动物、嵌合的、人源化的和/或互补性决定区(CDR)-接枝或CDR经修改的抗体,免疫球蛋白,它们的裂解产物、其他部分和变体。

[0084] 用于本发明的实施方案中的抗体可以以本领域公知的多种方法衍生得到。在一个方面中,可以使用本领域公知的任何杂交瘤技术得到抗体,例如参见Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc., NY, N.Y. (1987–2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., NY (1994–2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley&Sons, NY, N.Y., (1997–2001)。

[0085] 此外,所述的抗体还可以得自由此类结构域或成分的文库(例如噬菌体文库)的选

择。可以通过插入随机寡核苷酸的文库或者包含所关注序列的多核苷酸的文库(例如得自免疫的动物或人类的B细胞(Smith, G.P. 1985. *Science* 228:1315-1317))来创建噬菌体文库。抗体噬菌体文库在一个噬菌体中包含重链(H)和轻链(L)可变区,从而可以表达单链Fv片段或Fab片段(Hoogenboom, et al. 2000, *Immunol Today* 21 (8) 371-8)。可以对噬菌粒文库的多样性进行控制,从而增加和/或改变所述文库的单克隆抗体的免疫特异性,由此产生并随后确认额外的所需的人类单克隆抗体。例如,编码重链(H)和轻链(L)免疫球蛋白分子的基因可以随机混合(shuffled),从而在组装的免疫球蛋白分子中创建新的HL对。此外,在免疫球蛋白多肽的可变区的CDR中,编码H链和L链中的一者或二者的基因可以被诱变,并随后针对所需的亲和性和中和能力进行筛选。此外,还可以通过选择一个或多个类框架序列并引入衍生自人类全套抗体的CDR盒的集合或者通过计划的改变来以合成方式创建抗体文库(Kretzschmar and von Ruden 2000, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:598-602)。多样性的位置不限于CDR,而且还可以包含可变区的框架节段或者可以包含不同于抗体可变区的那些,例如肽。

[0086] 可以包含不同于抗体可变区的其他靶向结合成分为核糖体展示、酵母菌展示和细菌展示。核糖体展示为将mRNA翻译成它们的同源蛋白质、同时保持所述蛋白质与RNA连接的方法。核酸编码序列通过RT-PCR回收(Mattheakis, L.C. et al. 1994. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9022)。酵母菌展示是基于膜结合 α -凝集素酵母粘附受体aga1和aga2(交配型系统的一部分)的融合蛋白质的构建(Broder, et al. 1997. *Nature Biotechnology*, 15:553-7)。细菌展示是基于靶物与输出细菌蛋白质的融合,其中所述的输出细菌蛋白质与细胞膜或细胞壁结合(Chen and Georgiou 2002. *Biotechnol Bioeng*, 79:496-503)。

[0087] 与杂交瘤技术相比,噬菌体及其他抗体展示方法提供了在体外针对抗原靶物的选择进行控制的机会,并且不会限制宿主对抗原的作用的可能性,反之亦然。

[0088] 抗体子序列的具体实例包含(例如)Fab, Fab', (Fab')2, Fv, 或单链抗体(SCA)片段(例如scFv)。子序列保护眼保留了全长序列的至少一部分功能或活性的部分。例如,抗体子序列可以保留于抗原选择性地结合的能力,即使与全长抗体的结合亲和性相比,子序列的结合亲和性可以更大或更小。

[0089] Fv片段为包含以两条链表达的轻链VL可变区和重链VH可变区的片段。结合可以是非共价的或者可以是共价的,例如化学交联剂或分子内二硫键(Inbar et al., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2659; Sandhu (1992) *Crit. Rev. Biotech.* 12:437)。

[0090] 单链抗体("SCA")为经过基因工程改造或者经过酶消耗的抗体,其包含轻链VL可变区和重链可变区,它们可任选地通过挠性连接体(例如多肽序列)以VL-连接体-VH方向或者以VH-连接体-VL方向连接。备选地,单链Fv片段可以通过两个半胱氨酸残基之间的二硫键连接两个可变结构域来制备。用于制备scFv抗体的方法(例如)Whitlow et al., (1991)在Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97中;美国专利No. 4,946,778;以及Pack et al., (1993) *Bio/Technology* 11:1271中所述。

[0091] 此外,还可以使用制备抗体子序列的其他方法,例如分离重链从而形成单价轻-重链片段,进一步切割片段或者其他酶、化学或基因技术,前体条件是子序列与完整抗体所结合的抗原结合即可。

[0092] 在本发明中使用的抗体包括全长抗体、子序列(例如单链形式)、二聚体、三聚体、

四聚体、五聚体、六聚体或者保留至少一部分单体的抗原结合活性的任何其他较高级的寡聚体。多聚体可以包含本文所列以及本领域已知的经修饰或未经修饰的全长抗体、子序列的异源或同源组合。与单体相比，抗体多聚体可以用于增加抗原的亲和力，这是由于多聚体具有多个抗原结合位点。此外，抗体多聚体可以用于制备不同抗体的寡聚体（例如二聚体、三聚体、四聚体等）的组合，因此产生多功能（例如双功能、三功能、四功能等）的抗体的组合物。

[0093] 抗体可以通过所选分子（其通过合成手段或者通过编码所述多肽的核酸进行表达来制备）的化学交联或者通过与多肽的体外或细胞表达以及随后的寡聚反应相结合的重组DNA技术来制备。可以通过重组技术以及制备具有不同抗原决定部位特异性的抗体的杂交瘤的表达、融合或者多种核酸（其在单一的细胞中编码了具有不同抗原决定部位特异性的抗体可变链）的表达来简单地制备抗体。

[0094] 抗体可以通过共价结合或非共价结合（例如通过多聚化结构域）直接或间接连接，从而制备多聚体。“多聚化结构域”调节了非共价蛋白质-蛋白质间的相互作用。具体实例包含卷曲螺旋（例如亮氨酸拉链结构）以及 α -螺旋蛋白质序列。通过范德华力、氢键或电荷-电荷键调节蛋白质-蛋白质结合的序列也被考虑为多聚化结构域。其他的实例包含碱性螺旋-环-螺旋结构域以及调节核酸结合蛋白质（例如DNA结合转录因子，如TAF）中异源或同源蛋白质-蛋白质间相互作用的其他蛋白质序列。多聚化结构域的一个具体的实例为p53残基319至360，其调节了四聚体的形成。另一个实例为人类血小板因子4，其自组装形成四聚体。而另一个实例为细胞外蛋白质TSP4，其为凝血酶致敏蛋白家族中的一员，可以形成五聚体。其他具体的实例为jun、fos和酵母蛋白质GCN4的亮氨酸拉链。

[0095] 抗体可以通过化学交联剂彼此直接连接，或者可以通过连接体序列（例如肽序列）连接，从而形成多聚体。

[0096] 在一个实施方案中，本文所述的方法涉及特异性地结合CD33并包含至少人源化V区的至少一部分的靶向部分。例如，所述的抗体可以包含本文所定义的VL区以及具有至少一个人源化的片段的VH区。

[0097] 【药物组合物】

[0098] 在本发明的实施过程中，可以给药放射性免疫缀合物本身，或者作为可药用的配制物的成分给药。

[0099] 如本文所用，“可药用的盐”是指式I所示化合物的任何的盐，所述的化合物完全是无毒的从而可用于治疗哺乳动物。由有机和无机来源通过标准反应形成的那些盐的代表包含（例如）硫酸、盐酸、磷酸、醋酸、琥珀酸、柠檬酸、乳酸、马来酸、富马酸、棕榈酸、胆酸、十六酸、粘酸、谷氨酸、d-樟脑酸、戊二酸、乙醇酸、邻苯二甲酸、酒石酸、蚁酸、月桂酸、硬脂酸、水杨酸、甲磺酸、苯磺酸、山梨酸、苦味酸、安息香酸、肉桂酸以及其他合适的酸。式I所示化合物的盐优选的是其中所述的盐为钾、钠、铵或它们的混合物。

[0100] 如本文所用，术语“治疗有效量”是指对治疗的疾病产生治疗效果的放射性免疫缀合物的量。治疗有效量将根据哺乳动物、放射性免疫缀合物以及给药方法（例如口服或肠胃外）而改变。本领域的普通技术人员可以确定放射性免疫缀合物的治疗有效量。

[0101] 药物组合物包含“可药用的”和“生理学可接受的”载体、稀释剂或赋形剂。如本文所用，术语“可药用的”和“生理学可接受的”包含与药物给药相容的溶剂（水性或非水性）、

溶液、乳液、分散介质、涂料、等涉及吸收的促进或延迟试剂。此类配制物可以包含在液体中；乳液、悬浮液、糖浆或酏剂、或者固体形式中；片（包衣或未包衣的）、胶囊（硬或软）、粉末、颗粒、晶体或微珠中。此外，还可以将补充活性化合物（例如防腐剂、抗细菌试剂、抗病毒试剂和抗真菌试剂）引入到所述的组合物中。

[0102] 可以将药物组合物配制成与特定的局部给药或者系统途径的给药相容。因此，药物组合物包含适用于特定给药途径的载体、稀释剂或赋形剂。

[0103] 用于本发明组合物的给药途径的具体的非限定性实例为吸入或鼻内传递。其他途径包含口服、经鼻、肠胃外，例如静脉内、皮内、皮下、口服、经皮（局部）以及经肌肉给药。

[0104] 可以根据标准的技术制备包含本文所述的放射性免疫缀合物的药物组合物，并且该组合物进一步包含可药用的载体。通常，生理盐水可以用作可药用的载体。其他合适的载体包含（例如）水、缓冲的水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等（包含用于增加稳定性的糖蛋白，例如清蛋白、脂蛋白、球蛋白等）。这些组合物可以通过常规的公知的灭菌技术来灭菌。所得的水性溶液可以包装使用，或者在无菌条件下过滤并冷冻，经冷冻的制备物可以在给药之前与灭菌的水性溶液结合。所述的组合物可以包含接近生理学条件所需的可药用辅助物质，例如pH调节和缓冲试剂、张力调节试剂等，例如醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙等。

[0105] 在所述的药物配制物中本文所述的放射性免疫缀合物的浓度可以大幅改变，即，大约0.05重量%至大约1重量%，大约1重量%至大约2重量%，大约2重量%至大约5重量%，大约5重量%至大约10重量%，大约10重量%至大约30重量%，大约30重量%至大约50重量%，大约50重量%至大约75重量%，大约75重量%至大约99重量%。可以根据药物组合物的物理特征来选择药物组合物，其特征包含但不限于流体的体积、粘性以及符合所选的具体给药模式的其他参数。例如，可以增高浓度以便降低与治疗有关的流体承载。给药的放射性免疫缀合物的量取决于所用的具体的靶向部分、待治疗的疾病状态、待传递的治疗试剂以及临床医生的判断。通常，给药的放射性免疫缀合物的量足以传递治疗有效剂量的具体的药理学试剂。用于各种药理学试剂的治疗有效剂量对于本领域的技术人员而言是公知的，并且对于上文所述的大量药物而言，给出了代表性的范围。典型的放射性免疫缀合物的剂量可以为大约0.001至大约50mg/千克体重，或者大约0.1至大约10mg/kg体重。此外，还可以在医生的判断下确定治疗有效剂量。

[0106] 放射性免疫缀合物药物组合物可以以肠胃外的方式给药，即，关节内、静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、口服或经鼻。适用于所述用途的具体的配制物可以在Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985) 中找到。所述的配制物可以包含悬浮在可接受的载体或水性载体中的放射性免疫缀合物的溶液。可以使用多种水性载体，例如水、缓冲的水、0.9%等渗盐水等。这些组合物可以通过传统的公知的灭菌技术灭菌，或者可以进行灭菌过滤。所得的水性溶液可以包装使用，或者被冷冻，经冷冻的制备物可以在给药之前与灭菌的水性溶液结合。所述的组合物可以包含接近生理学条件所需的可药用辅助物质，例如pH调节和缓冲试剂、张力调节试剂、润湿剂等，例如醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。

[0107] 用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包含：灭菌稀释剂，例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、聚丙三醇或其他合成溶剂；抗细菌试剂，例如苯基

醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，例如抗坏血酸或重亚硫酸钠；螯合试剂，例如乙烯二胺四乙酸；缓冲剂，例如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；以及用于调节张力的试剂，例如氯化钠或右旋葡萄糖。可以使用酸或碱调节pH，例如盐酸或氢氧化钠。

[0108] 对于经粘膜或经皮给药而言，在所述的配制物中可以使用适用于待渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂是本领域公知的，并且对于经粘膜给药而言，包含（例如）洗涤剂、胆盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给药可以通过使用鼻喷雾剂、吸入装置（例如吸气器）或栓剂来完成。对于经皮给药而言，所述的活性化合物可以被配制成本领域公知的软膏、油膏、凝胶或乳膏。

[0109] 在本发明的方法中，适用于给药组合物的其他药物配制物是本领域已知的（例如参见Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa.; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, N.J.; 和Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)）。

[0110] 所述的药物组合物可以以剂量单位形式包装以用于容易地给药以及剂量的一致。如本文所用，“剂量单位形式”是指适合作为待治疗的受试对象使用的单一剂量的物理分离单位；每个单位都包含预定量的活性化合物，经计算所述的量能够产生与药物载体或赋形剂有关的所需的治疗作用。

[0111] 【试剂盒】

[0112] 此外，本发明还提供了包含根据本文所述的方法制备的放射性免疫缀合物的试剂盒。在所述的试剂盒中放射性免疫缀合物的靶向部分在自然界中可以为单克隆的或多克隆的。所述试剂盒的靶向部分的一个或两个臂可以是嵌合的、人类的、人源化的或免疫原性去除的（deimmunized）。

[0113] 此外，通过本申请提供的试剂盒还可以包含由所述的组织中清除未结合的放射性免疫缀合物的清除组合物。一种合适的清除试剂为糖基化的抗-独特型Fab'片段，其靶向针对放射性免疫缀合物的靶向部分的疾病靶向臂。在该实施方案中，给予放射性免疫缀合物并使其在靶物中最大程度地共生。为了清除残留的放射性免疫缀合物，靶物Ab的抗-独特性Ab以糖基化的Fab'片段形式给予。清除试剂以单价方式与放射性免疫缀合物结合，同时它所附着的羧基残基使完整的络合物定向于肝脏，在此进行快速的代谢。清除试剂在美国系列No. 09/314,135和09/337,756中有更详细地描述。

[0114] 以下实施例说明了本发明，并列出以帮助理解本发明，并且不应该以任何方式解释为限定了本发明的范围，本发明的范围如所附的权利要求书所定义。

【实施例】

[0115] 【实施例1：系统命名法及定义】

[0116] P-SCN-Bn-DOTA:S-2-(4-异硫氰酸根合苄基)1,4,7,10四氮杂环十二烷四乙酸 (Macrocyclics, Dallas, TX)

[0117] BFC:双功能螯合试剂

[0118] DOTA-BFC:DOTA双功能螯合试剂：例如NHS-DOTA；p-SCN-Bn-DOTA

[0119] Na (NH₄) Ac:醋酸铵钠

- [0120] mAb:单克隆抗体:HuM-195
- [0121] HuM-195:用于治疗髓性白血病的抗-CD33抗体。HuM-195为将鼠科M-195的CDR区与人类框架/恒定区结合的重组IgG1mAb。
- [0122] SEC:体积排阻色谱
- [0123] HPLC:高效液相色谱
- [0124] SE-HPLC/UV:与UV检测器偶联的SE-HPLC
- [0125] SE-HPLC/rad.:与放射活性检测器偶联的SE-HPLC
- [0126] ITLC:瞬时薄层色谱
- [0127] NH₄CH₃CO₂:醋酸铵,NH₄Ac
- [0128] NaCH₃CO₂:醋酸钠,NaAc
- [0129] D_f:稀释因子
- [0130] CHCA: α -氰基-4-羟基肉桂酸
- [0131] MALDI:基质辅助激光解吸/电离质谱
- [0132] HDPE:高密度聚乙烯
- [0133] HEPES:N-2-羟基乙基哌嗪-N-2-乙磺酸
- [0134] 【实施例2:HuM195与p-SCN-Bn-DOTA的缀合】
- [0135] 2.3.1材料和化学品。参见表2的说明。
- [0136] 2.3.2化学品的制备以及用于缀合反应的条件。
- [0137] 2.3.2.1预先制备以下溶液:
- [0138] 天然HuM195,5mg/mL,储存在4-8℃。
- [0139] p-SCN-Bn-DOTA,储存在-20℃。
- [0140] NaCl,0.9%:称0.45g NaCl,并将其溶解于不含金属的水中,然后使体积达到50mL。混合所述溶液并在均化后使其过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在50mL-HDPE容器中。
- [0141] 0.2M磷酸二氢钠(溶液A):称0.48g NaH₂PO₄,并将其加入到20mL蒸馏H₂O中。混合所述的溶液直到完全溶解。
- [0142] 0.2M磷酸一氢钠(溶液B):称2.83g NaHPo₄,并将其加入到100mL蒸馏H₂O中。
- [0143] 0.1M磷酸盐缓冲剂,pH=8:将5.3mL溶液A与94.7mL溶液B结合并混合。为了测试pH,使用pH试纸。通过加入等体积的蒸馏H₂O(100mL)来稀释缓冲剂。使所述的溶液过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在50mL-HDPE容器中。
- [0144] 2M NaOH:取得大约5mL 30%的NaOH,并将其与不含金属的水混合,使溶液冷却,然后使体积达到25mL。将所述的溶液保持在50mL-FEP容器中。
- [0145] 4M NaOH:向50ml HDPE容器中加入50ml不含金属的水以及8.0g NaOH,并搅拌至完全溶解。
- [0146] 3M NH₄Ac(或NaAc):称6.15g NaAc,并将其溶解于不含金属的水中。在所述的盐溶解之后,使体积达到25mL。混合所述溶液并在均化后使其过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在25mL-HDPE容器中。
- [0147] 0.25M NH₄Ac(或NaAc):取得2.1mL 3M NaAc,并将其与不含金属的水混合,使体积达到25mL。混合所述溶液并在均化后使其过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述

的溶液保持在25mL-HDPE容器中。

[0148] 0.1M NH₄Ac (NaCH₃CO₂) , pH 7。取得3.3mL 3M NaAc，并将其与不含金属的水混合，使体积达到100mL。将所述的溶液保持在100mL-HDPE容器中。

[0149] 0.1M HCl:取得2.5mL 10M HCl，并将其与不含金属的水在25mLPE容量瓶中混合。等候直至溶液冷却，并使体积达到25mL。混合所述溶液并在均化后使其过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在25mL-HDPE容器中。

[0150] 0.05M HCl:取得1.25mL 10M HCl，并将其与不含金属的水在25mL PE容量瓶中混合。等候直至溶液冷却，并使体积达到25mL。混合所述溶液并在均化后使其过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在25mL-HDPE容器中。

[0151] NaN₃0.05%。称0.5g NaN₃，并将其溶解于Millipore水中。使体积达到1L。

[0152] 1.0M NaHCO₃。向50ml HDPE容器中加入50.0mL不含金属的水以及8.4g NaHCO₃，并搅拌至完全溶解。(这产生了2M NaHCO₃溶液)。将17.8mL 4M NaOH溶液和50mL 2M NaHCO₃溶液在Coning Costar 250mL储存瓶中混合(或者是当量的)。混合良好。

[0153] 备选地：

[0154] 1.0M NaHCO₃:向100mL HDPE容器中加入50.0mL不含金属的水以及8.4g NaHCO₃，并与17.8mL 4M NaOH溶液混合。搅拌直至完全溶解，并使体积达到100mL。将所述的溶液保持在Coning Costar250mL储存瓶中混合(或者是当量的)。混合良好。

[0155] 0.1M HEPES溶液。将3.0mL 1M HEPES缓冲剂(Fisher BioReagents, 产品号BP299-500)放置在50ml HDPE瓶中，并加入27ml水用于注射。

[0156] 2.3.2.2材料

[0157] 表2:用于缀合的化学品和材料的列表

[0158]

化学品/材料	订单名	说明/组成	供应商
HCl, 30 %	1.00318.1000	超纯的	VWR
NaOH, 30 %	1.05589.0250	超纯的	VWR
醋酸 Na	1.062640050	> 99.99%	VWR
醋酸 NH ₄	372331-10 04030KH	> 99.999%	Sigma Aldrich
冰醋酸, 100%	100264 1000660250	超纯的	VW
DOTA -NHS - 酯	B-280		Macro cyclies, Dallas, TX
DOTA - p -SCN - Bn	B-205		Macro cyclies, Dallas, TX
NaCl	1.064060050	> 99.99%	VWR
Hum195		5 mg/ml	Isotex
DTPA	1083900250	> 99%	VWR
不含金属的水	1.01262.1000	超纯的	VWR
Na ₂ HPO ₄	106566.0050	Suprapur 99.99	VWR
NaH ₂ PO ₄	106370.0100	Suprapur 99.99	VWR
一次性 PD-10 脱盐柱	17-0851-01		GE Health Care Europe GmbH
pH 试纸	1.09533.0001 1.09542.0001	pH= 5.0 -10 pH= 4.0 - 7	VWR
PP Eppen dorf 小瓶	211-2130	PP	VWR
微量恒温仪	460-3249	203x315X89	VWR
PE 小瓶	6008117	PE	Perkin Elmer GmbH
Protein Pack 300SW	WRT080013	Protein Pack 300SW	Waters
Protein Pack 125 centriguard 柱	WRT1866000926	Protein Pack 125 centriguard 柱	Waters
叠氮化 Na, Na ₃ N	8.22335.0111	纯度≥ 99 %	VWR
HEPES	BP299-100		Fisher BioReagents
NaHCO ₃	106329.0500		VWR
移液管	613-3646	0.5 -10 μ L (灰尖)	VWR
Eppendorf	613-3649 613-3650	10 -100 μ L (黄尖) 100 -1000 (蓝尖)	
移液管尖	612-1158	0.5 -10 μ L (灰尖)	VWR
Eppendorf	612-1160 612-1163	10 -100 μ L (黄尖) 100 -1000 (蓝尖)	
Millipore 离心装置 YM - 10	4411 (8 个单位) 4421 (24 个单位)	具有阻隔 10000 MW 分 子量的过滤器	Milli pore

[0159]

Nalgene 容器	2002-0001 2002-0002 2002-0004	30, 60 和 125 mL, 用于溶液的储存	VWR
Amicon Ultra 离心过滤器装置, 小于 4mL			
Amicon Ultra 离心过滤器装置, 小于 4mL Ultra -10 K, 再生纤维素, 阻隔 10 000 MW	目录号 UFC801096		Millipore

[0160] 2.3.2.3仪器:

[0161] 具有制冷功能的超高速离心机(4°C)“Biofuge primo R, Heraeus'”或得自Themo Scientific或类似品牌的相当物(在6500rpm下旋转)。

[0162] 【Vortex或类似的系统】

[0163] 装配有用于光谱储存及评价、或者类似系统的计算机的UV-Visible Spectrophotometer Varian Cary-Win 5000(或相当物)

[0164] 装配有用于光谱储存及评价的计算机、并具有UV检测器和Waters Protein Pack 300SW作为固定相的HPLC(或相当物)

[0165] 储存mAb和缀合的mAb的冰箱(4-8°C)

[0166] 储存BFC-DOTA的冷藏室(-20°C)

[0167] 分析天平

[0168] 烘箱内的微量恒温仪章动器

[0169] 2.3.3用于定量HuM195的HPLC-UV检测器的校准。HuM195的质量控制。

[0170] 2.3.3.1由5mg/mL HuM195溶液制备至少3种具有已知浓度的稀释溶液,其浓度通过与SE-HPLC偶联的放射活性检测器的敏感度以及使用中的设定来定义。通常,当关注敏感度和线性时,125-625μg/mL的浓度范围是足够的。

[0171] 2.3.3.2在280nm下使用UV检测器建立HPLC以用于测量。

[0172] 2.3.3.3使用0.5mL/min的速度在0.9%NaCl中形成SE-HPLC柱的条件。

[0173] 2.3.3.4由稀释的HuM-195溶液(或者由所述的缀合物)取得等分液并使它们通过SE-HPLC/UV。例如,对于使用100μL-环的注射系统建立的HPLC而言,通过Protein Pack 300SW柱的蛋白质的量为12.5μg至62.5μg。使用0.9%NaCl作为流动相。参见图2作为典型色谱的图示。

[0174] 2.3.3.5在信号I_c(峰下的面积)与浓度之间建立关系。生成校准曲线(参见图3,其示出了典型的色谱)以便使分析员可以计算缀合物样品中Hum195的浓度*。另一种近似的方法是以找到浓度/信号的比为基础的,其中所述的浓度/信号的比得自HuM-195标准样品的SE-HPLC/UV色谱。如果线性条件得到满足,则浓度/信号的比为恒定的,K_{280nm}。因此,根据下式计算缀合物样品中Hum-195的浓度:

[0175] C (HuM195, mg/mL) = K_{280nm}*I_s*D_f

[0176] K_{280nm}为校准样品中HuM195 (mg/mL) 的浓度与校准样品的UV(设定在270nm下) 色谱

上峰下的面积 (I_c) 的比

[0177] I_c 为在校准样品的SE-HPLC/UV (280nm) 色谱上峰下的面积 (图2)

[0178] I_s 为所述样品的SE-HPLC/UV (280nm) 色谱上峰下的面积 (图4)

[0179] D_f 为稀释因子

[0180] C (HuM195, mg/mL) 为未稀释样品中HuM195的浓度, 以mg/mL计

[0181] *缀合物溶液不应该包含游离的BFC或者在280nm下吸光的任何其他物质 (参见图1B)。

[0182] 2.3.4可任选地: 通过过滤-离心的mAb的浓度。

[0183] 当待制备大量的缀合物时, 该步骤是相关的。以下过程适用于处理大约10mgHuM-195/单个试验/小瓶。

[0184] 2.3.4.1取得分子量阻隔为10000MW的新的Millipore离心装置YM-10 (可以使用具有较高阻隔的YM装置, 并且离心时间相应增加), 并使用数mL 0.05M HCl和纯H₂O对其进行洗涤。

[0185] 2.3.4.2预先将离心管的温度调节至4°C。

[0186] 2.3.4.3量2mL天然的5mg/mL HuM195溶液或纯化的Hum195, 并将其转移至离心管中。

[0187] 2.3.4.4在6500rpm和4°C下对溶液进行离心, 直至溶液的体积为1mL或更少。

[0188] 2.3.4.5离心后, 在500rpm下再次旋转离心管和离心机从而将浓缩的mAb溶液收集在滞留瓶中。

[0189] 2.3.4.6将浓缩的mAb (大约10mg/mL) 转移至Eppendorf小瓶中。此外, 收集滤液并在两种溶液中通过SE-HPLC分析HuM195的含量。将所述的溶液保持在4-8°C。

[0190] 2.3.5在碳酸氢盐缓冲剂中的缀合反应

[0191] 2.3.5.1温暖Epperdonf小瓶, 其装有处于0.25mL不含金属的水中的2.5mg DOTA/p-SCN-Bn。

[0192] 2.3.5.2加入1mL 5mg/mL (或0.5mL 10mg/ml) 的HuM-195溶液并混合该溶液。

[0193] 2.3.5.3加入0.05mL 1.0M NaHCO₃并混合该溶液。

[0194] 2.3.5.4混合后, 通过移出0.001mL等分液并将其点在具有合适的pH范围的pH试纸上来检测pH。pH应该在8至9之间, 并且目标pH为9。持续加入0.01mL 0.1M NaHCO₃并测量pH直至pH介于8.0至9.2之间。

[0195] 在37°C下将反应混合物在章动器中温育1小时30分钟。

[0196] 2.3.6可任选地: 在磷酸盐缓冲剂中的缀合反应

[0197] 2.3.6.1在事先清洁的Eppendorf小瓶中称5mg/p-SCN-Bn-DOA, 并将其溶解于0.4mL 0.1M磷酸盐缓冲剂中, pH=8。

[0198] 2.3.6.2将大约10mg/ml的浓缩mAb溶液与400μL磷酸盐缓冲剂溶液温和低混合。

[0199] 2.3.6.3混合后, 通过移出0.001mL等分液并将其点在具有合适的pH范围的pH试纸上来检测pH。pH应该在8.0至9.2之间。

[0200] 2.3.6.4如果pH太低, 则将2M NaOH的0.010mL等分液加入到所述的溶液中, 并温和地混合所述的溶液。

[0201] 2.3.6.5重复步骤2.3.6.3和2.3.6.4直至达到目标pH。大约需要0.03mL 2M NaOH

溶液达到目标pH。

[0202] 2.3.6.6封闭Eppendorf小瓶并使用Vortex系统进行混合,使其在室温下进行24小时或者按照以下步骤2.3.6.7所述进行。

[0203] 2.3.6.7备选地,在37℃下将反应混合物在微量恒温仪中或者在柜式培养箱摇床中温育1小时30分钟。

[0204] 2.3.7通过过滤-离心纯化反应混合物。用于SE-HPLC/UV的QC。

[0205] 2.3.7.1将全部的构建体反应混合物(部分2.3.5.5或2.3.6.7)转移至新的Millipore离心装置YM-10或相当物(阻隔10 000MW)中。阻隔分子量为20,000或40,000的过滤器也是可接受的。

[0206] 2.3.7.2加入1mL 0.1M HEPES或0.1M NaAc并在6500*rpm和4℃下离心样品直至溶液的体积为大约1mL.*可以使用较低的旋转,并且分离的时间随后增加。当使用其他过滤器时使用制造商的说明书。

[0207] 2.3.7.3将步骤2.3.7.2重复3次以上。

[0208] 2.3.7.4由最终纯化的缀合级份取得少量等分液,并使其通过由Protein Pack 300SW柱构成的SE-HPLC(参见2.3.3)。使用0.9%NaCl作为流动相。与未缀合的MAb相比,缀合的MAb显示出色谱上峰向左侧迁移(参见图4)。

[0209] 2.3.7.5分析SE-HPLC/UV色谱(参见图4)并检测到未观察到与游离BFC相应的信号区。

[0210] 2.3.7.6如果在SE-HPLC/UV色谱上观察到游离的BFC,则重复步骤2.3.7.2,否则继续进行以下步骤。

[0211] 2.3.7.7按照用于校准试验的2.3.3.4-2.3.3.5中所述或者按照部分2.3.9中所述,对样品中缀合的mAb的含量进行定量。

[0212] 2.3.7.8将纯化的缀合级份储存在4-8℃下:样品准备用于放射性标记。

[0213] 2.3.8可任选地通过比重SE色谱和过滤-离心来纯化反应混合物。

[0214] 以下过程为2.3.7中所述方法的备选方法。

[0215] 2.3.8.1参见步骤2.3.7.1。

[0216] 2.3.8.2通过使5mL 0.1M NaAc通过所述的柱,使新的PD-10树脂在0.1M NaAc溶液中形成一定的条件。丢弃洗涤液。

[0217] 2.3.8.3将全部的构建体反应混合物(在部分2.3.5.5或2.3.6.7之后)施加到所述柱的填充池中,并将洗脱液收集在Eppendorf管或PE小瓶中(级份1)。

[0218] 2.3.8.4使用0.5mL 0.1M NaAc溶液洗涤反应小瓶,并将洗涤液倒入PD-10柱的填充池中。

[0219] 2.3.8.5分别将洗脱液收集在Eppendorf管中(级份2)。

[0220] 2.3.8.6将步骤2.3.8.4-2.3.8.5重复2次(级份3,4)。

[0221] 2.3.8.7将0.5mL 0.1M NaAc持续施加到PD-10柱的填充池中,并重复该操作直至总洗脱体积达到6mL(级份5,6,7,8,9,10,11,12)。

[0222] 2.3.8.8分别使用2mL 0.1M NaAc将柱洗涤2次以上(级份13和14)。收集洗脱液。

[0223] 2.3.8.9将级份5至12合并(4mL),因为这些级份包含大部分缀合的mAb。级份13至14包含大部分未结合的或游离的BFC。

- [0224] 2.3.8.10按照步骤2.3.7.2-2.3.7.8所述进行。
- [0225] 2.3.9在缀合物中通过UV分光光度法测定蛋白质的浓度。
- [0226] 2.3.9.1在280nm下设定UV分光光度计(天然及缀合的HuM-195的典型的UV光谱参见图1)。
- [0227] 2.3.9.2制备一个稀释的标准样品,或者可任选地,为了生成校准曲线,在0.9% NaCl中制备HuM195的浓度已知的至少3个稀释标准溶液,并找到光密度(通常为0.1-0.8)和浓度(通常为60-600 600 μ g/mL)之间的线性区。对于校准曲线的实例参见图5。在1cm光路的小玻璃管中,对于0.1% (1mg/mL, 处于0.9%NaCl中)下的HuM195溶液而言,吸光率为大约1.4。
- [0228] 2.3.9.3通过使用得自图“光密度与浓度”的校准曲线(例如图5)或者根据精确度较低的以下等式来计算样品中的蛋白质浓度:
- [0229] $C(\text{HuM195, mg/mL}) = A_{280\text{nm}} * D_f * f_c / \epsilon_{280\text{nm}} * L$
- [0230] $A_{280\text{nm}}$ 为在280nm下的吸光率
- [0231] $\epsilon_{280\text{nm}}$ 为对于0,1% = 1.4时在280nm处的消光系数
- [0232] L为小玻璃管的光路,1cm
- [0233] D_f 为稀释因子
- [0234] f_c 为校正天然与缀合IgG的消光系数之间的差异的因子。该
- [0235] 因子在280nm下为大约1(参见图1)。
- [0236] $C(\text{HuM195conj, mg/mL})$ 为未稀释样品中HuM-195的浓度,
- [0237] 以mg/mL计。
- [0238] 【实施例3:放射性标记过程的描述:一步法】
- [0239] 3.1规模
- [0240] 使用之前与DOTA双功能螯合试剂缀合的HuM-195来标记²²⁵Ac。
- [0241] 3.2系统命名法及定义
- [0242] 同样参见实施例1。
- [0243] DTPA:二乙烯三胺五乙酸
- [0244] 龙胆酸:2,5-二羟基苯甲酸
- [0245] AA:抗坏血酸
- [0246] 3.3放射性标记方案
- [0247] 3.3.1材料和化学品
- [0248] 参见表3
- [0249] 表3:用于标记的化学品和材料的列表

[0250]

化学品/材料	订单名	说明/组成	供应商
30% HCl	1.00318.1000	超纯的	VW
NaOH, 30%	1.05589.0250	超纯的	VW
醋酸 Na	1.062640050	> 99.99%	VW
醋酸 NH ₄	372331-109 04030KH	> 99.999%	Aldrich
乙酸	100264	超纯的	VW
龙胆酸	841745	> 99%	VW
抗坏血酸, 用于生物学用途	101566.0100	> 99%	VW
DOTA-NHS-酯	B-280		Macro cyclies, Dallas, TX
DOTA-p-SCN-Bn	B-205		Macro cyclies, Dallas, TX
NaCl	1.064060050	> 99.99%	VW
HuM195		5 mg/ml	PDL/PacificGMP
DTPA	1083900250	> 99%	VW
不含金属的水	1.01262.1000	超纯的	VW
一次性 PD-10 脱盐柱	17-0851-01		GE Health Care Europe GmbH
pH 试纸	1.09543.0001 1.09542.0001	pH= 6.5-10 pH= 4.0-7	VW
PP Eppendorf 小瓶	211-2130 211-2160	PP	VW
微量恒温仪	460-3249	203x315X89	VW
PE 小瓶	6008117	PE	Perkin Elmer GmbH
Protein Pack 300SW	WRT080013	Protein Pack 300SW	Waters
Protein Pack 125 centriguard 柱	WRT1866000926	Protein Pack 125 centriguard 柱	Waters
过滤器	514-7014	0.45 μm 孔径 25 mm 直径	VW
移液管 Eppendorf	613-3646 613-3649 613-3650	0.5 -10 μL (灰尖) 10 -100 μL (黄尖) 100 -1000 (蓝尖)	VW
移液管尖 Eppendorf	612-1158 612-1160 612-1163	0.5 -10 μL (灰尖) 10 -100 μL (黄尖) 100 -1000 (蓝尖)	VW
ITLC SG 5X20 cm	516-7805		VW
人类血清清蛋白(HSA) -----		1 %	Swiss Red Cross, Bern, Switz.

[0251]

	PZN-0504775	20 %	Behring
灭菌管, 移液管尖塑料制品			
50 mL Corning 管			Sigma-Aldrich
Nunc 管			Sigma-Aldrich
10DG 尺寸排阻脱盐柱	732-2010	MW 阻隔 6000	Biorad Inc.

[0252] 3.3.2 化学品的制备及用于反应的条件

[0253] 反应小瓶以及微量恒温仪

[0254] 3.3.2.1 取得新的反应管(例如2mL容量的Eppendorf管),并使用几mL 0.1M HCl、注射用水H₂O以及最终用0.5M NaAc(0.5M NH₄Ac)缓冲剂对其进行洗涤。

[0255] 3.3.2.2 使用与用于标记的反应管相同类型的反应管来校准微量恒温仪。管内液体(水)的温度应该为37±2℃。

[0256] Ac-225的制备

[0257] 3.3.2.3 在得自制造商的小瓶中对225Ac的活性进行定量。

[0258] 3.3.2.4 将所述的残余物溶解于小瓶中的0.05mL 0.2M HCl溶液中(如果样品是干燥的)。就放射性标记而言,所取得的等分液应该少于0.3mL。

[0259] 3.3.2.5 针对存在的不溶性材料进行检验。所述的残余物应该被完全溶解并且所得的溶液应该是均质的、透明的并且不含颗粒和外源材料。

[0260] 其他化学品和材料

[0261] 3.3.2.6 为了进行标记,预先制备以下溶液:

[0262] 如部分2中所述,在0.9%NaCl中形成蛋白质浓度为5-10mg/mL的p-SCN-Bn-DOTA-mAb缀合物溶液。

[0263] 0.5M NH₄Ac(或NaAc):取得4.2mL 3M NaAc,并将其与不含金属的水混合,然后使体积达到25mL。混合所述的溶液,并在均化后使其过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在25mL-HDPE容器中。

[0264] 龙胆酸在3M NaAc中形成的溶液:称0.033g龙胆酸,并使其溶解于1mL 3M NaAc中。使用前,使所述的溶液过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。在冷却及黑暗的条件下,将所述的溶液保持在2mL容量的Eppendorf小瓶中。

[0265] 150g/L 1-AA溶液:称1.5g AA并将其溶解于10mL不含金属的水中。使所述的溶液过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。在冷却及黑暗的条件下,将所述的溶液保持在25mL-HDPE容器中。

[0266] 50mM DTPA溶液:称0.49g DTPA并将其溶解于25mL不含金属的水中。使所述的溶液过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在25mL-HDPE容器中。

[0267] 20mM DTPA溶液:称0.20g DTPA并将其溶解于25mL不含金属的水中。使所述的溶液过滤通过0.45μm醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在25mL-HDPE容器中。

[0268] 制备以下材料

[0269] PD-10柱

[0270] pH试纸:范围在4-10内的pH试纸的薄纸条。

- [0271] Eppendorf小瓶
- [0272] PE小瓶
- [0273] 0.45μm 25mm-直径的醋酸纤维素过滤器以及用于过滤的灭菌注射器。
- [0274] ITLC SG 5X20cm
- [0275] 3.3.2.7在标记前,使非放射活性的溶液过滤通过0.45μm 25mm醋酸纤维素过滤器
- [0276] 3.3.2.8仪器:
- [0277] Vortex或类似的系统
- [0278] 具有UV检测器以及Protein Pack 300SW SEC柱作为固定相的HPLC
- [0279] 储存mAb和缀合的mAb样品的冰箱(4-8℃)
- [0280] 储存BFC的冷藏室(-20℃)
- [0281] 具有高纯度Germanium检测器的γ-光谱仪系统。可任选地并且尤其对于活性均衡性评估而言,所述的检测器还应该为ISOCS,其可表征为Canberra Industries并具有ISOCS/LABSOCS软件包,该软件包在标准的GENIE2000软件下运行,其中所述的GENIE2000软件被构造成能够对各种具体的计算几何条件(例如小瓶、柱等)进行绝对的测量。
- [0282] Squibb CRC-17放射性核素活度计(或相当的模型)
- [0283] 3.3.3放射性标记
- [0284] 3.3.3.1取得至多0.3mL 0.05M HC1的等分液,其包含所需活性的225Ac(例如在标记当天为大约1mCi)并将其吸入到反应管中(在部分3.3.7.3中的更新表中)。
- [0285] 3.3.3.2可任选地,通过高分辨率γ-光谱仪测量反应管中225Ac的活性。
- [0286] 3.3.3.3加入0.1mL 3M NaAc(或NH4Ac),并使用Vortex系统温和且短暂地混合。
- [0287] 3.3.3.4通过移出0.001mL等分液并将其点在具有合适的pH范围的pH试纸上来检测pH。pH应该在5至8.5之间。不要丢弃尖端和pH试纸;将它们收集在小的PE袋中以用于放射活性均衡性评估。
- [0288] 3.3.3.5根据HuM195在缀合物溶液中的浓度,加入0.1mL(当浓度为10mg/mL时)或者计算体积的p-SCN-Bn-DOTA-mAb缀合物溶液,其包含大约1mg的mAb。所述的体积不应该超过0.2mL。
- [0289] 注意:在对照试验中,该步骤被省略。
- [0290] 3.3.3.6加入0.020mL新制备的饱和龙胆酸溶液,并使用Vortex系统进行短暂且温和的混合。
- [0291] 3.3.3.7重复3.3.3.4。目标pH应该介于5.5-7.0之间。
- [0292] 3.3.3.8如果pH高于7.0,则加入0.010mL 0.1M HC1。如果pH低于5.5,则加入0.25mL 3M NaAc。
- [0293] 3.3.3.9如果需要,重复步骤3.3.3.8。
- [0294] 3.3.3.10封闭装有反应混合物的2mL反应小瓶反应管,并将其在微量恒温仪(3.3.2.2)中在37℃下放置80-90分钟。
- [0295] 3.3.4.DTPA攻击以及通过ITLC对反应产率的测定
- [0296] 3.3.4.190分钟后,终止反应并加入0.010mL 10mM DTPA溶液,并使用Vortex系统进行短暂且温和的混合。
- [0297] 3.3.4.2将反应管放回到微量恒温仪中并温育30分钟。

[0298] 3.3.4.3 20分钟后,关闭微量恒温仪,由反应混合物中移出0.002mL等分液并将其点在ITLC小条的参照线(在距一侧大约15mm处标记的线)的中心。将空尖收集在废物袋中(参见3.3.3.4)。使装有反应混合物的管保持安全。

[0299] 3.3.4.4 将ITLC放置在装有流动相的玻璃管中:几mL 20mM DTPA溶液(取决于用于ITLC的容器的尺寸)。

[0300] 3.3.4.5 等待7-8分钟直至流动相的前方到达距小条的另一端大约15mm处标记的第二参照线。

[0301] 3.3.4.6 由ITLC管中移出小条并使其干燥。然后将小条切成小的部分,每部分的距离均为15mm。

[0302] 3.3.4.7 将各个部分放置在预先计数的聚乙烯小瓶中(例如通常用于液体闪烁计数的20mL PE小瓶)。

[0303] 3.3.4.8 等待1小时,并在用于首次评价的各个色谱部分中,通过在高分辨率 γ -光谱仪上测量221Fr来计数225Ac的活性(可任选地)。

[0304] 3.3.4.9 等待超过6小时以达到225Ac与所有继承元素之间的放射活性平衡,并通过221Fr和213Bi测量225Ac的活性以用于最终的评价。

[0305] 3.3.4.10 通过使用下式来计算放射性标记:

$$Y(\%) = (A_1 + A_2) * 100\% / A_t$$

[0307] 其中,

[0308] Y=放射性标记的产率%

[0309] A_1 =在色谱的部分1中测量的 ^{225}Ac 的活性(由底部开始计数),Bq (μCi)

[0310] A_2 =在色谱的部分2中测量的 ^{225}Ac 的活性(由底部开始计数),Bq (μCi)

[0311] A_t =在色谱的所有部分中测量的 ^{225}Ac 活性的总和,Bq (μCi) 如果使用相同的几何测量所述的样品(样品来源距检测器的距离、相同的小瓶、检测器等),然后可以使用下式计算产率:

$$Y(\%) = (I_1 + I_2) * 100\% / I_t$$

[0313] 其中,

[0314] Y=放射化学产率%

[0315] I_1 =在色谱的部分1中测量的 ^{225}Ac 的计数率(由底部开始计数),cps

[0316] I_2 =在色谱的部分2中测量的 ^{225}Ac 的计数率,cps

[0317] I_t =在色谱的所有部分中测量的 ^{225}Ac 的计数率,cps

[0318] 3.3.5 使用10DG柱通过体积排阻色谱纯化反应混合物

[0319] 3.3.5.1 获得以下成分:10mL 10DG SE树脂;柱成分,以及用于下文所述的纯化步骤的3通阀。

[0320] 3.3.5.2 将10mL体积的10DG树脂倒入一次性塑料柱中,使其安定并施加顶部熔块。所有这些材料均得自Biorad Inc., Hercules CA。使用2个10mL体积的0.9%NaCl洗涤包装的树脂。丢弃洗涤液。

[0321] 3.3.5.3 使用2个10mL体积的1%HAS平衡所述的树脂。丢弃洗涤液。

[0322] 3.3.5.4 量取用于收集药品产物的新的50mL灭菌Corning管的皮重,并将全部的构建体反应混合物施加到所述的柱上(参见3.3.4),并将洗脱液收集在废料管中。

[0323] 3.3.5.5 使用20mL 1%HSA洗涤构建体反应小瓶并将该洗涤液加入到柱中,然后将洗脱液再次收集在废料管中。加入2.0mL 1%HSA作为流动相并将洗脱液再次收集在废料管中。将2mL 1%HAS加入到体积排阻柱中并收集最终的产物。

[0324] 3.3.5.5 将收集的药品产物称重并记录包含所述产物的溶液的质量。

[0325] 3.3.5.6 假设使用纯化方案除去了1.0mg抗体中的80%。通过将所述的活性除以回收HuM195的总量(0.8mg)来计算所述产物的比活。可以在纯化之后的6小时后测定产物的活性水平。需要这段时间来用于在剂量校准器或相当物中建立及测量的Ac-225久期平衡,从而测定产物的产率和活性水平。

[0326] 3.3.6 可任选地: 使用PD-10柱通过体积排阻色谱纯化反应混合物

[0327] 以下过程为在部分3.3.5中所述过程的备选过程。

[0328] 3.3.6.1 通过使5mL NaCl 0.9% 通过所述的柱来使PD-10树脂在0.9%NaCl溶液中形成一定的条件。丢弃洗涤液。

[0329] 3.3.6.2 将全部的构建体反应混合物(部分3.3.4.3)施加到柱的填充池中,并将洗脱液(f1)收集在Eppendorf管或PE小瓶中。

[0330] 3.3.6.3 使用0.5mL 0.9%NaCl溶液洗涤反应小瓶并将洗涤液倒入PD-10柱的填充池中。将空的反应小瓶放置在小的PE废物袋中以用于活性均衡性评估(参见3.3.3.4)。

[0331] 3.3.6.4 将洗脱液分别收集在Eppendorf管或PE小瓶中。

[0332] 3.3.6.5 将步骤3.3.6.3-3.3.6.4重复2次,并将这些洗脱液收集在一起(fw)。

[0333] 3.3.6.6 将0.5mL 0.9%NaCl连续施加到PD-10柱的填充池中,直至总洗脱体积达到6mL。共收集4mL的洗脱液。这些级份应该包含大部分的标记缀合物(fp)。

[0334] 3.3.6.7 使用额外的8mL 0.9%NaCl洗涤柱。将洗脱液单独地收集在新的容器中。该级份为包含游离的或者结合有DTPA Ac-225的级份(ff)。

[0335] 3.3.6.8 等待一(1)小时,并在用于首次评价的各个小瓶中,通过在高分辨率 γ -光谱仪上测量221Fr来计数225Ac的活性(可任选地)。

[0336] 3.3.6.9 等待超过6小时以达到225Ac与所有继承元素之间的放射活性平衡,并通过221Fr和213Bi测量225Ac的活性以用于最终的评价。

[0337] 3.3.6.10 如果浓度是所需的,则将级份f_p(4mL)转移至分子量阻隔为10000MW的新Millipore离心装置YM-10中(可以使用具有分子量阻隔较高的薄膜的YM管,并且旋转的时间相应增加)。否则直接进入3.3.5.5。

[0338] 3.3.6.11 在6500rpm及4°C下,离心缀合物结合的溶液,直至溶液的体积为大约1mL。

[0339] 3.3.6.12 加入1mol 0.9%NaCl,并重复步骤3.3.6.11。

[0340] 3.3.6.13 量取用于收集产物的新的50mol灭菌Corning管的皮重。

[0341] 3.3.6.14 将产物转移至新的50mL灭菌Corning管中。

[0342] 3.3.6.15 使用至多1mL 1%HAS洗涤空的YM-10管,并将洗涤液转移至装有产物的管中。

[0343] 3.3.6.16 按照3.3.5.5中所述进行。

[0344] 3.3.7 可任选地: 活性均衡性的评估

[0345] 3.3.7.1 在高分辨率 γ -分光仪上测量PD-10柱,以便定量留在柱上的225Ac的活

性。

[0346] 3.3.7.2 测量装有空的反应小瓶、尖端和pH试纸的袋,其中所述的反应小瓶、尖端和pH试纸在标记试验过程中用于QC。

[0347] 3.3.7.3 将结果概况于下表中(表4) :

[0348]

分隔	^{225}Ac 的活性, mCi	活性%
Ac-225的初始活性		
在结合有mAb的纯化/浓缩级份中		<u>回收</u>
在未结合mAb的其他液体级份中		
留在PD-10柱上		
留在用于QC的反应小瓶、尖端和pH试纸,组织等中		

[0349] 3.4 放射性标记的缀合物的质量控制

[0350] 3.4.1 外观/视觉测试:

[0351] 3.4.1.1 使用黑白背景,针对清晰度、颜色和外源物质的缺乏方面视觉检验所得的产物。

[0352] 3.4.2 放射性核的鉴定

[0353] 3.4.2.1 在校准的 γ 分光仪上收集 γ 光谱。其实例参见图9。

[0354] 3.4.2.2 使用标准的核素库(参见表1),在218keV下寻找Fr-221的主峰、在441KeV下寻找Bi-213的主峰。此外,寻找以证明Ac-225和Tl-209的峰。

[0355] 表1:核素库*:Ac-225及继承元素

库的列表报告

26.03.2009 15:22:20

页码 1

```
*****
***** 库的列表报告 *****
*****
```

文件地址: C:\GENIE2K\CAMFILES\Ac.NLB

核素库的描述 :

核素名称	半衰期 (秒)	能量 (keV)	能量 Uncert. (keV)	产率 (%)	产率 Uncert. (Abs.+-)
TL-209	8.640E+005	72.800	0.000	5.9100	0.0000
		74.970	0.000	9.9800	0.0000
		84.800	0.000	3.4000	0.0000
		87.300	0.000	1.0000	0.0000
		117.000	0.000	77.0000	0.0000
		465.000*	0.000	96.6000	0.0000
		1566.000	0.000	99.7000	0.0000
		76.862	0.005	1.1800	0.0600
		79.290	0.005	2.0000	0.1000
		89.600	0.000	0.7000	0.0500
[0356]	8.640E+005	92.400	0.100	0.2000	0.0700
		292.300	0.100	0.4900	0.0700
		309.000	0.100	0.2000	0.0700
		323.600	0.100	0.1300	0.0700
		440.200*	0.020	27.3000	1.2000
		806.600	0.040	0.3500	0.0200
		1101.000	0.060	0.3900	0.0230
		62.800	0.010	0.8000	0.1200
		68.000	0.010	0.4000	0.1200
		78.950	0.010	0.2000	0.1200
FR-221	8.640E+005	81.520	0.010	0.3000	0.2000
		92.100	0.000	0.1000	0.0900
		99.500	0.200	0.1400	0.0400
		217.600*	0.040	12.5000	0.9000
		409.500	0.000	0.1200	0.0400
		62.900	0.030	0.5100	0.0220
		73.700	0.020	0.5200	0.0150
		83.200	0.020	1.5900	0.0700
		86.110	0.020	2.5400	0.1200
		87.300	0.030	0.3000	0.0120
AC-225	8.640E+005	97.300	0.000	0.9400	0.0600
		99.600	0.050	2.9000	0.0400
		100.300	0.050	0.2500	0.0400
		108.200	0.030	0.2500	0.0110
		111.400	0.030	0.3200	0.0150
		116.000	0.030	1.5500	0.0150
		124.400	0.030	0.2200	0.0150
		138.200	0.030	0.2000	0.0150
		144.700	0.050	0.1300	0.0070
		149.900*	0.020	0.7300	0.0400
[0357]	8.640E+005	153.500	0.050	0.1500	0.0090
		157.200	0.020	0.3500	0.0220
		171.300	0.020	0.1000	0.0220
		187.700	0.050	0.5500	0.0300

[0357] *核素库编辑者,Genie 2000,Canberra Industries。

[0358] 3.4.3通过ITLC得到的放射化学纯度

[0359] 3.4.3.1在上文3.3.4中有所描述

[0360] 3.4.4通过尺寸排阻HPLC得到放射化学纯度

[0361] 3.4.4.1由所述的构建体得到等分液,使得峰中的计数率显著高于放射活性检测器的背景。

[0362] 3.4.4.2使用与校准试验中相同的条件通过SE-HPLC运行所述的样品:0.9%NaCl,

1mL/min速度等。

[0363] 3.4.4.3针对检测器检测的总活性,比较并计算与缀合物有关的活性。参见图6作为说明。

[0364] 3.4.4.4通过使用下式计算缀合物“R_c”的放射化学品的纯度:

$$[0365] R_c (\%) = (I_c) * 100\% / I_t$$

[0366] 其中,

[0367] R_c=标记缀合物的放射化学纯度%

[0368] I_c=在SE-HPLC/rad.色谱上在缀合物峰下测量的面积(图6)

[0369] I_t=在SE-HPLC/rad.色谱上测量的总面积(图6)

[0370] 使用下式计算与高MW聚集体结合的Ac-225的百分率:

$$[0371] A_H (\%) = (I_h) * 100\% / I_t$$

[0372] 其中,

[0373] A_H=与高MW聚集体结合的Ac-225的百分率, %

[0374] I_h=在SE-HPLC/放射活性色谱上,在缀合物峰的左侧上测量的面积

[0375] 通过使用下式计算与低MW聚集体结合的Ac-225的百分率:

$$[0376] A_L (\%) = (I_l) * 100\% / I_t$$

[0377] 其中,

[0378] A_L=与低MW聚集体结合的Ac-225的百分率, %

[0379] I_l=在缀合物峰的右侧上测量的面积,直至峰开始相应于游离的Ac-225,图6

[0380] 3.4.5免疫反应性

[0381] 3.4.5.1通过将总体积为0.030mL的大约2ng放射性标记的抗体与500至1000倍过量的抗原温育来测定225Ac-HuM 195的免疫反应性(大约10x 10⁶CD33-阳性AL67细胞)。

[0382] 这些细胞的每个细胞都表达了大约400,000个CD33-阳性结合位点,并且相对于加入的HuM-195是抗原过量的。在0℃下温育30分钟后,通过离心并除去上清液收集细胞,使用磷酸盐缓冲的盐水(PBS)对这些细胞进行一次洗涤,并除去洗涤液。通过闪烁计数测量细胞团、上清液和洗涤液的放射活性。免疫反应性百分率计算等于{(与细胞结合的225Ac-HuM195) / (结合的加上未结合的总活性(上清液和洗涤液)}乘以100。

[0383] 3.4.6小瓶中Ac-225的活性

[0384] 3.4.6.1等待超过6小时以达到225Ac与所有继承元素之间的放射活性平衡,并通过221Fr和213Bi测量225Ac的活性以用于最终的评价。

[0385] 3.4.7构建体的总体积

[0386] 3.4.7.1重力测量法测定产物的总体积

[0387] 3.4.8计算Ac-225的活性浓度

[0388] 3.4.8.1通过在3.4.6.1中获得的活性除以在3.4.7.1中获得的体积来计算活性浓度(mCi/mL)。

[0389] 3.4.9比活的计算

[0390] 3.4.9.1按照部分3.3.5.5中所述

[0391] 3.4.10可任选地:通过UV分光光度法测定蛋白质并计算比活。

[0392] 如果在纯化的蛋白质级份中不存在HAS,则仅使用该方法(参见图12)。

[0393] 3.4.10.1由结合的蛋白质级份“fp”(部分3.3.6.6)取得0.02mL等分液,并使用0.9%NaCl使体积达到0.5mL(Df=25)。当1mg缀合物用于标记时,建议稀释因子Df为25。

[0394] 3.4.10.2如部分2.3.7和2.3.9中所述,在结合的且浓缩的样品中测量蛋白质的浓度(cpi)。

[0395] 【实施例4】

[0396] 表5:比较林妥珠单抗-Ac225“一步”法与现有方法的制造过程

[0397]

测试	说明	“一步”法	现有方法
产率	N/A	84±17.9%	7.7±2.05%
ITLC	≥95% 林妥珠单抗-Ac225	通过	通过
HPLC	≥90% HuM195	通过	通过
	≤5% 高 MW 聚集体	通过	通过
	≤10% 低 MW 聚集体	通过	通过
免疫反应性	≥60% 活性	通过	通过

[0398] 参考文献

[0399] Meares C.F., McCall M.J., Rearan D.T., Goodwin D.A., Diamanti C.I., McTigue M. (1984) Conjugation of antibodies with bifunctional chelating agents: isothiocyanate and bromoacetamide reagents, methods of analysis and subsequent addition of metal ions. *Anal Biochem*;142:68-78.

[0400] Shrikant V.D., Sally J.D., David L.K., Min K.M., Michael J. Mc., Gerald L.D. y Meares C.F. (1990) Yttrium-90-Labeled monoclonal antibody for therapy: Labeling by new macrocyclic bifunctional chelating agent. *J Nucl Med*.31,473-479.

[0401] Michael R. Lewis, Andrew Raubitschek and John E. Shively. (1994) A Facile, Water-Soluble Method for Modification of Proteins with DOTA. Use of Elevated Temperature and Optimized pH To Achieve High Specific Activity and High Chelate Stability in Radiolabeled Immunoconjugates. *Bioconjugate Chem*.5,565-576.

[0402] D.R. Beckford, A. Xiques, R. Leyva, M. Perez-Malo; E. Casanova, M. Barrabi (2007) Nuevo radioimmunoconjunto 90Y-DOTA-HR3Sintesis y radiomarcaje. *Nucleus* 2007, 41, 3-8.

[0403] Michael R.L., Jim Y.K., Anne-Line J.A., John E.S., and Andrew R. (2001) An improved method for conjugating monoclonal antibodies with N-hidroxysulfosuccinimidyl DOTA. *Bioconjugate Chem*.12,320-324.

[0404] Yasushi Ogawa, Joseph Traina, Eike Zimmermann, Tao Yu, Douglas W. Schneider, Erno Pungor Jr. (2007) Quantification of bifunctional diethylenetriaminepentaacetic acid derivative conjugation to monoclonal antibodies by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 368 214-221.

[0405] Sharon X.Lu,Edward J.Takach,Marjorie Solomon,Qing Zhu,Say-Jong Law, Frank Y.Hsieh (2005) Mass Spectral Analyses of Labile DOTA-HNS and Heterogeneity Determination of DOTA or DM1 Conjugated Anti-PSMA Antibody for Prostate Cancer Therapy.Journal of Pharmaceutical Sciences,Vol.94,No 4,April 2005.

[0406] Instructions 52-1308-00 BB:PD-10 Desalting Column,GE Healthcare.

[0407] Amicon Centricon Centrifugal Filter Devices.Data sheet Millipore

[0408] [Ac-225]-DOTA-Hum195 Manufacturing Protocol (Two step labelling procedure) ,MSKCC

[0409] Labelling of Hum-195/DOTA conjugates with Ac-225 using the one step method,TUM report,February 2009.

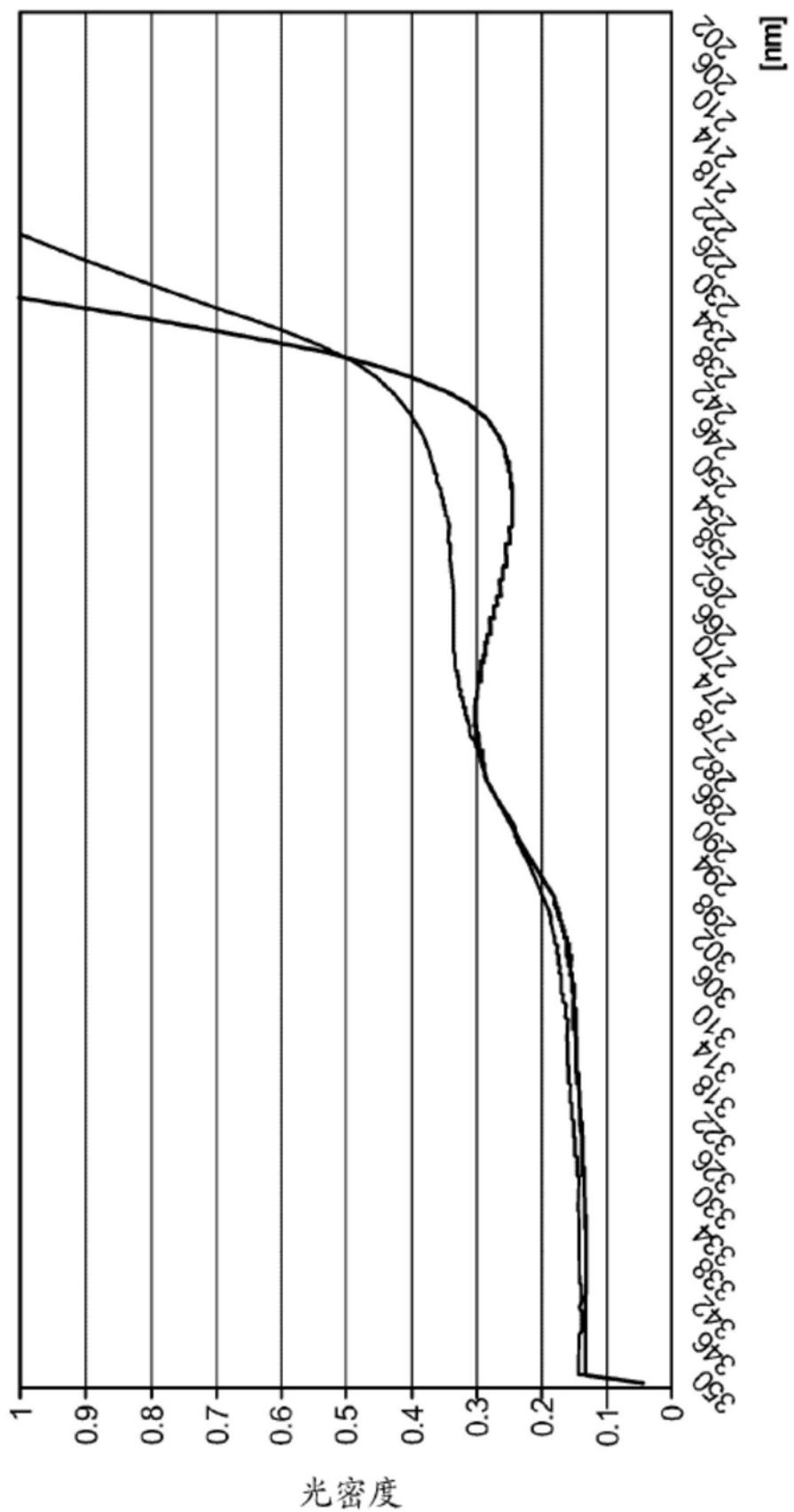


图1A

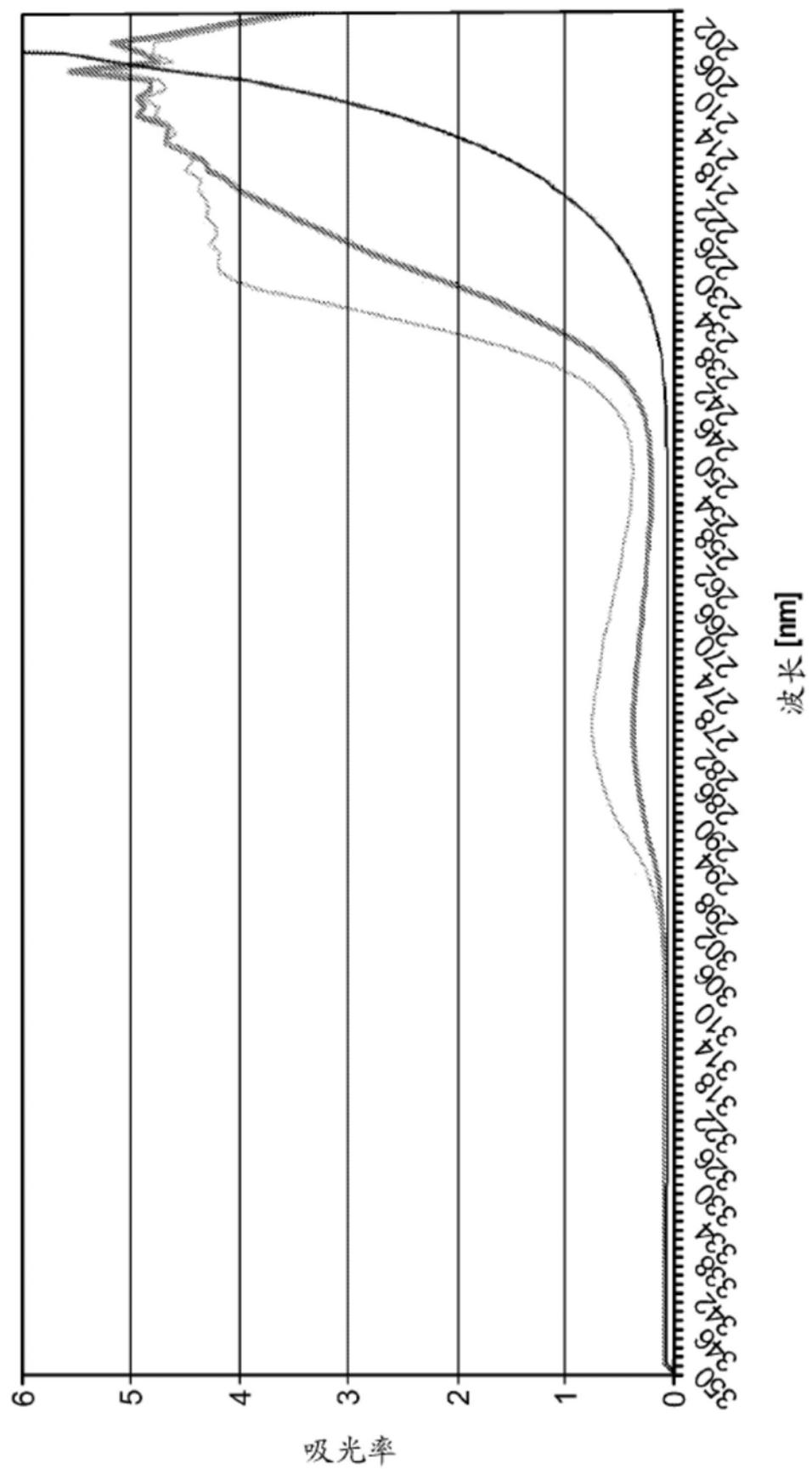


图1B

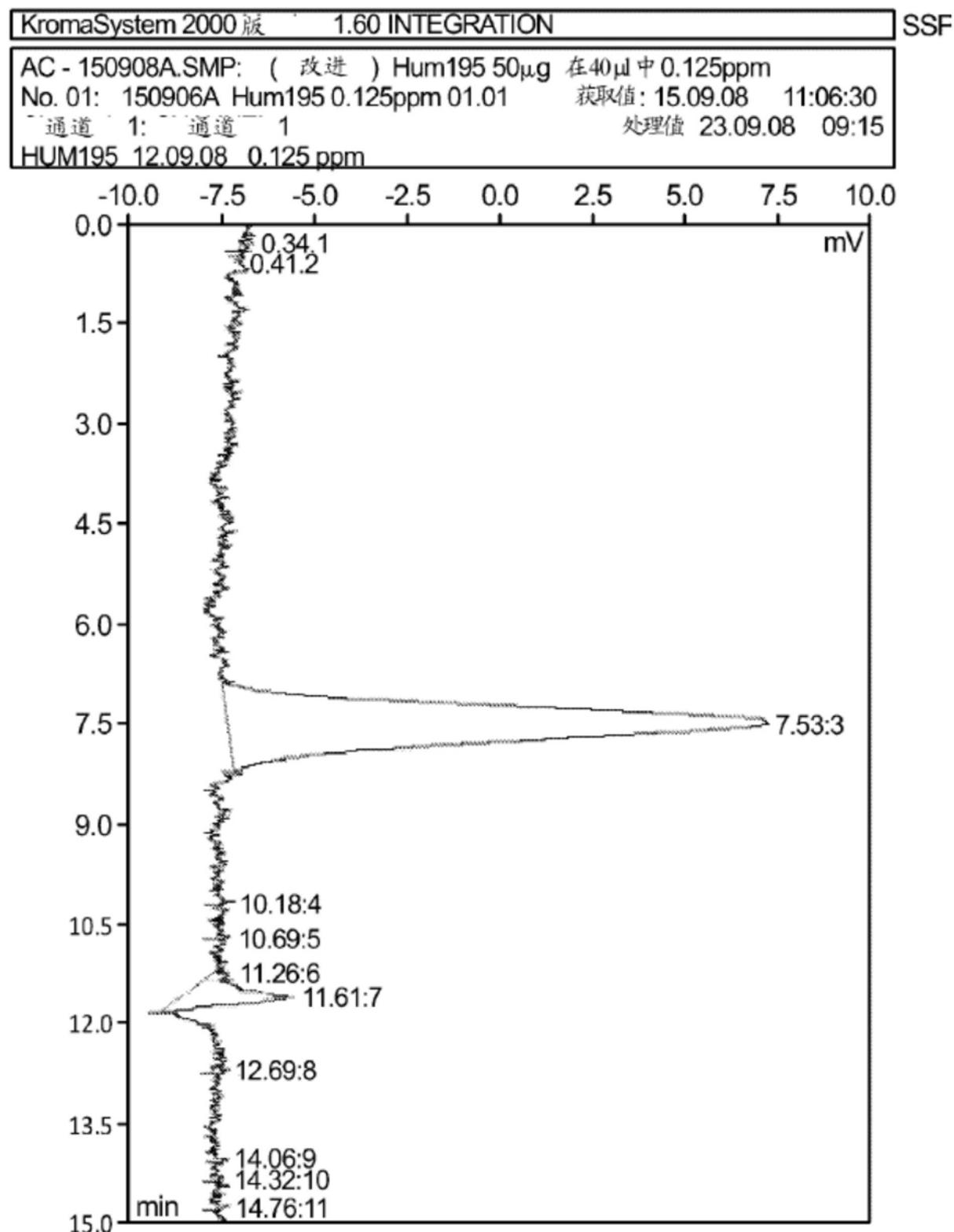
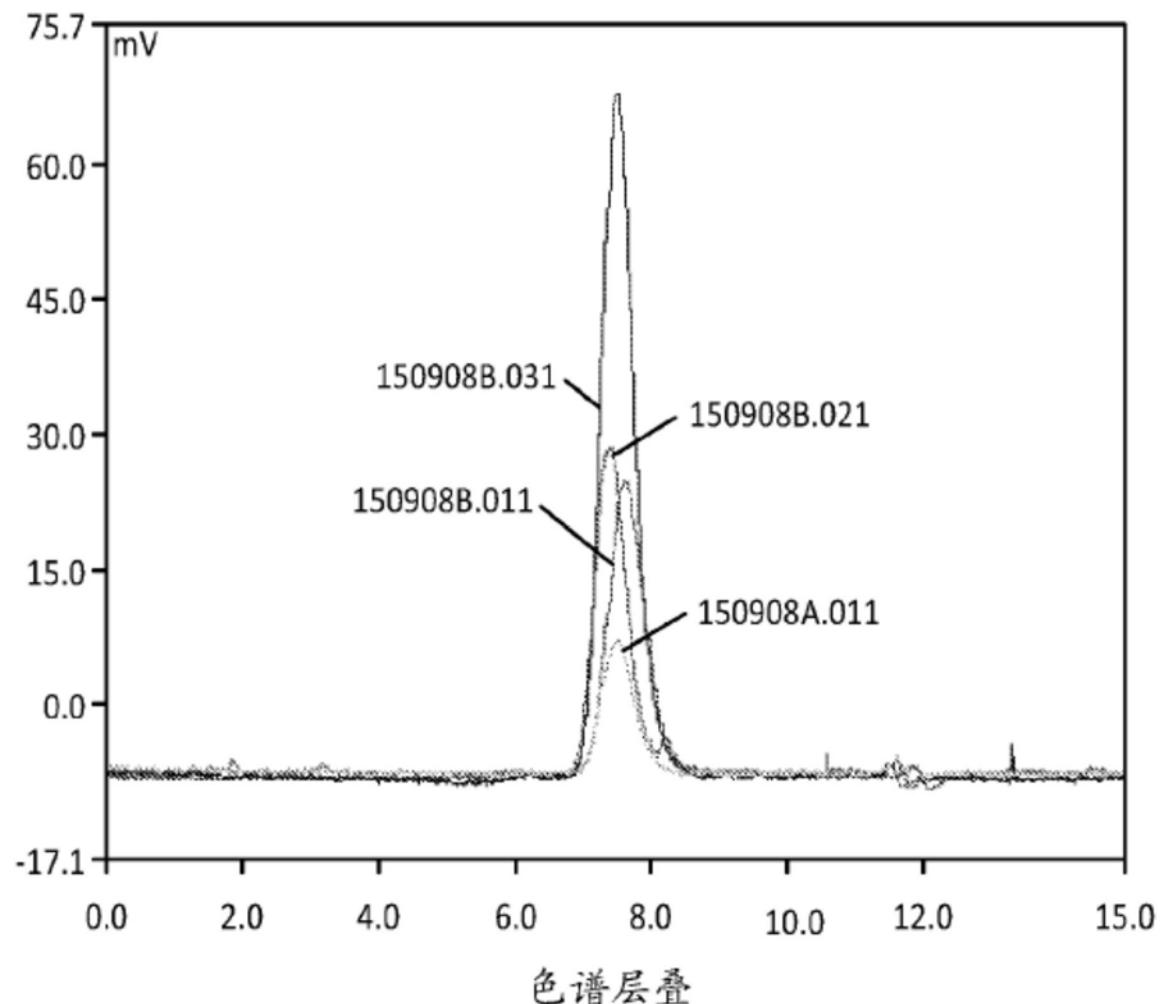


图2



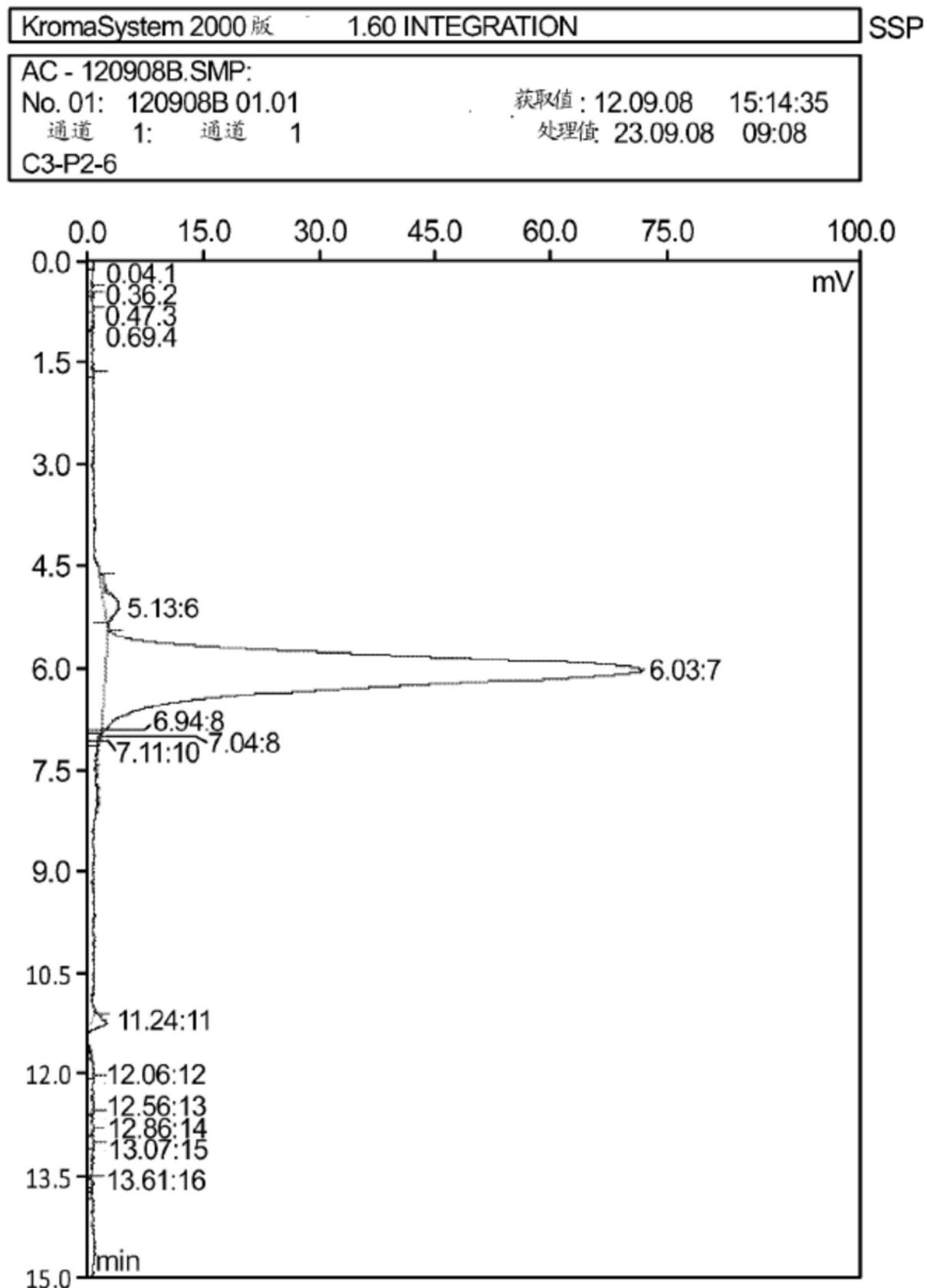


图4

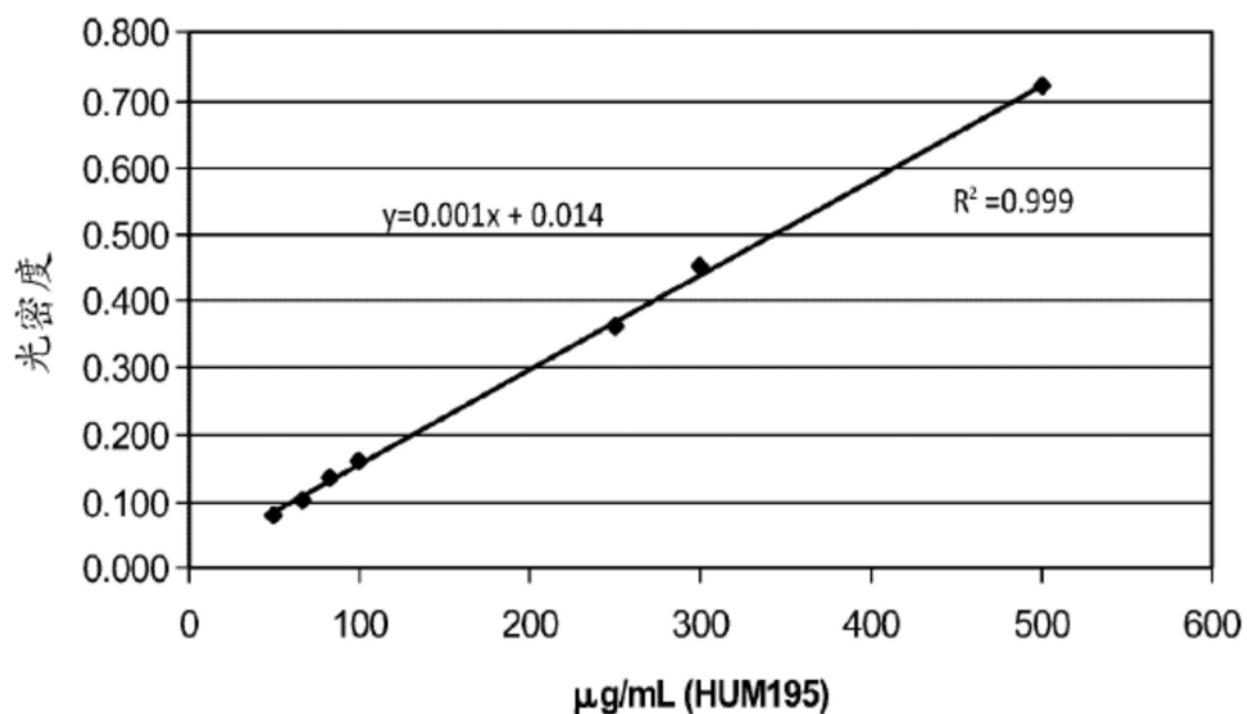


图5

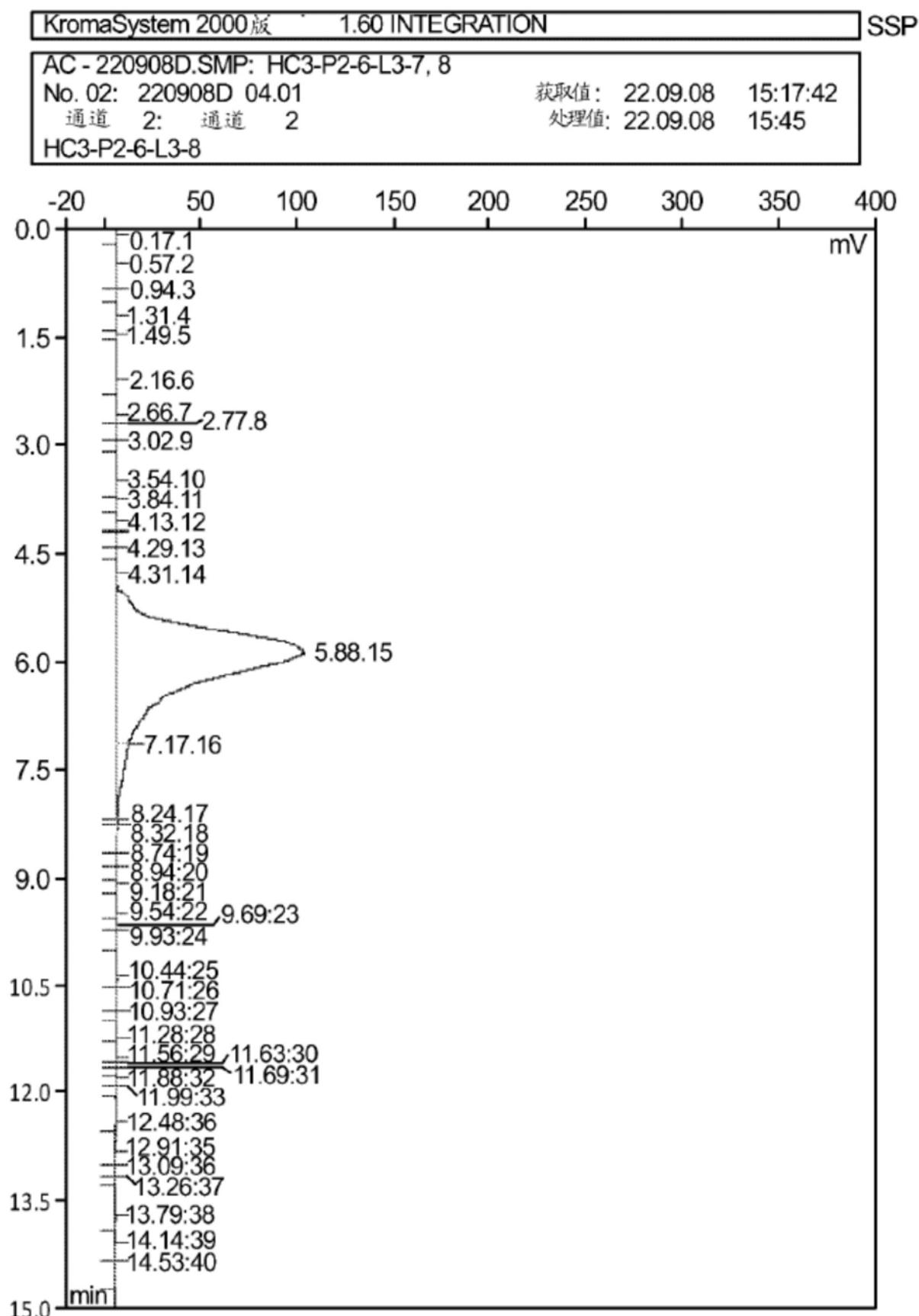


图6

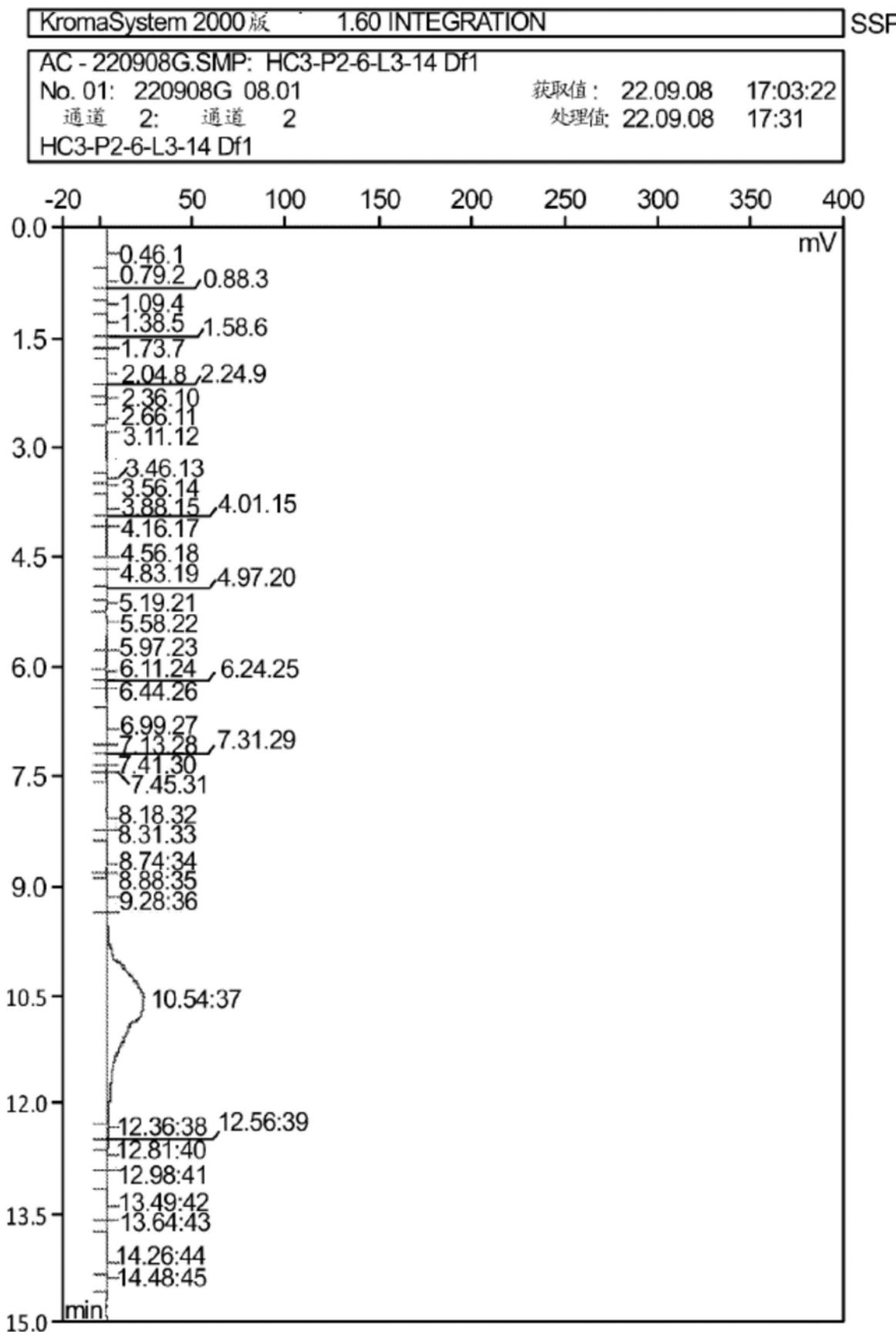


图7

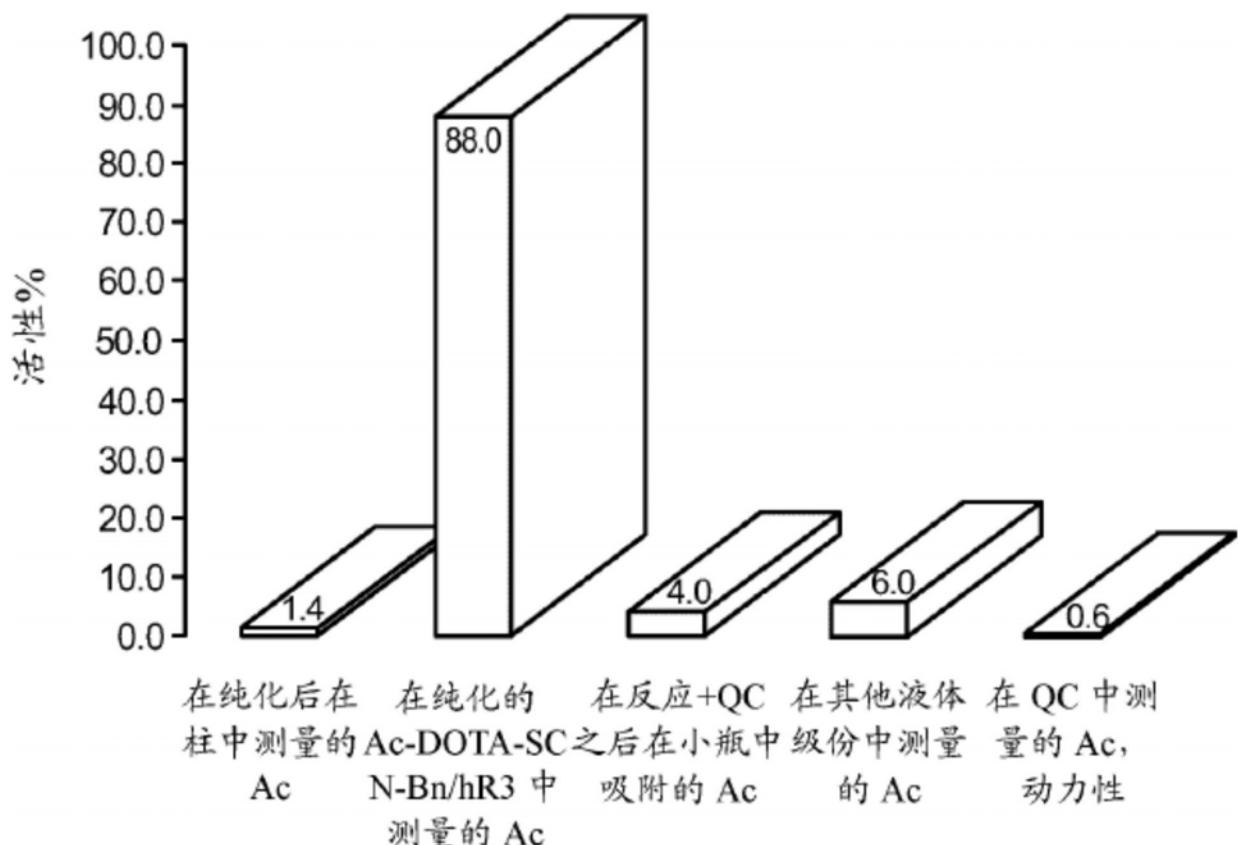


图8

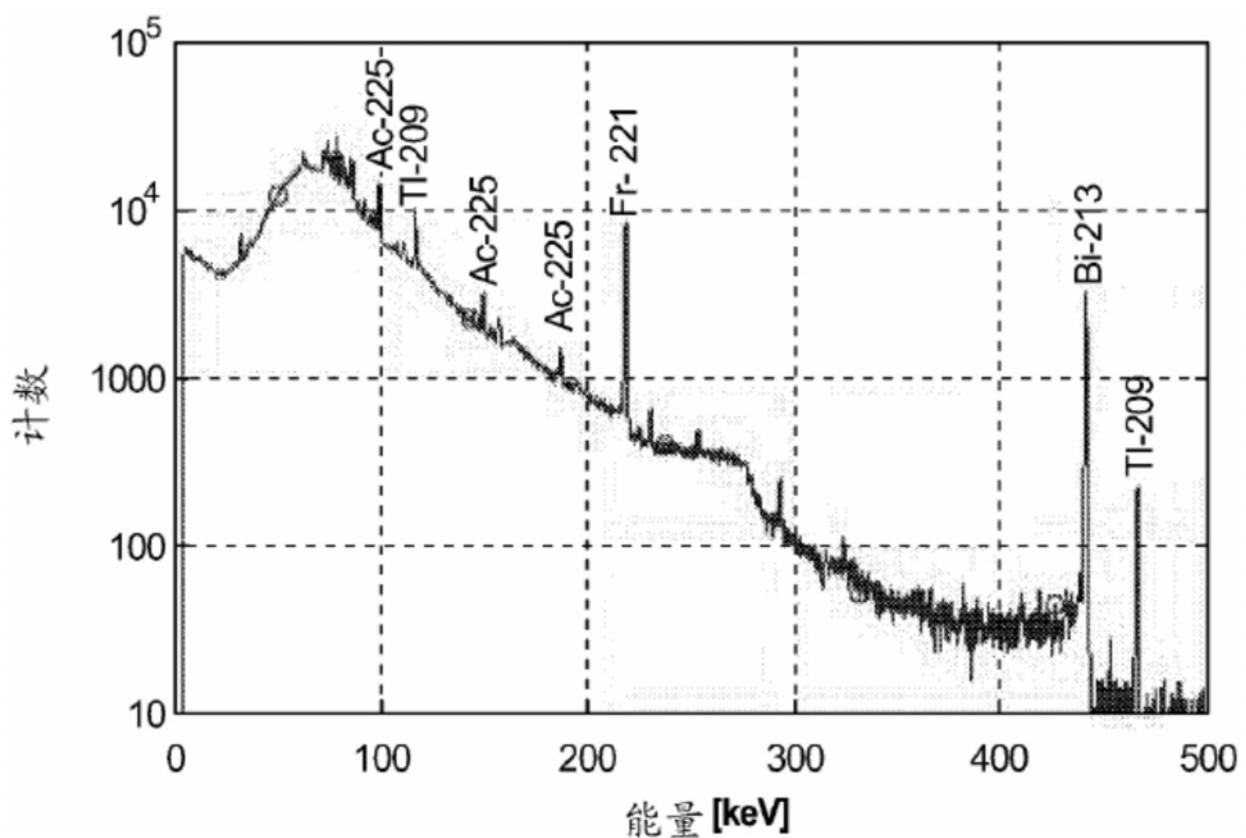


图9

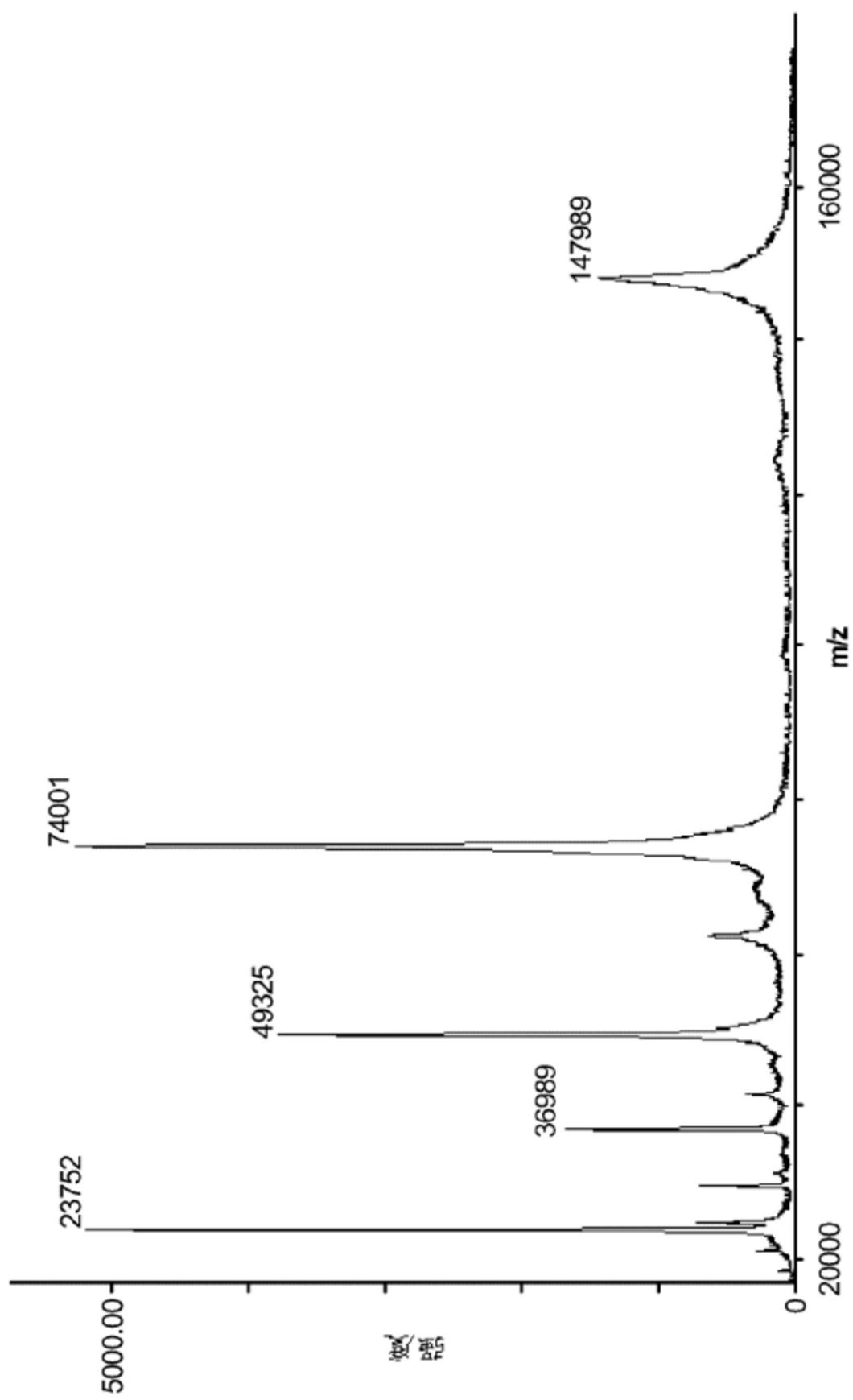


图10

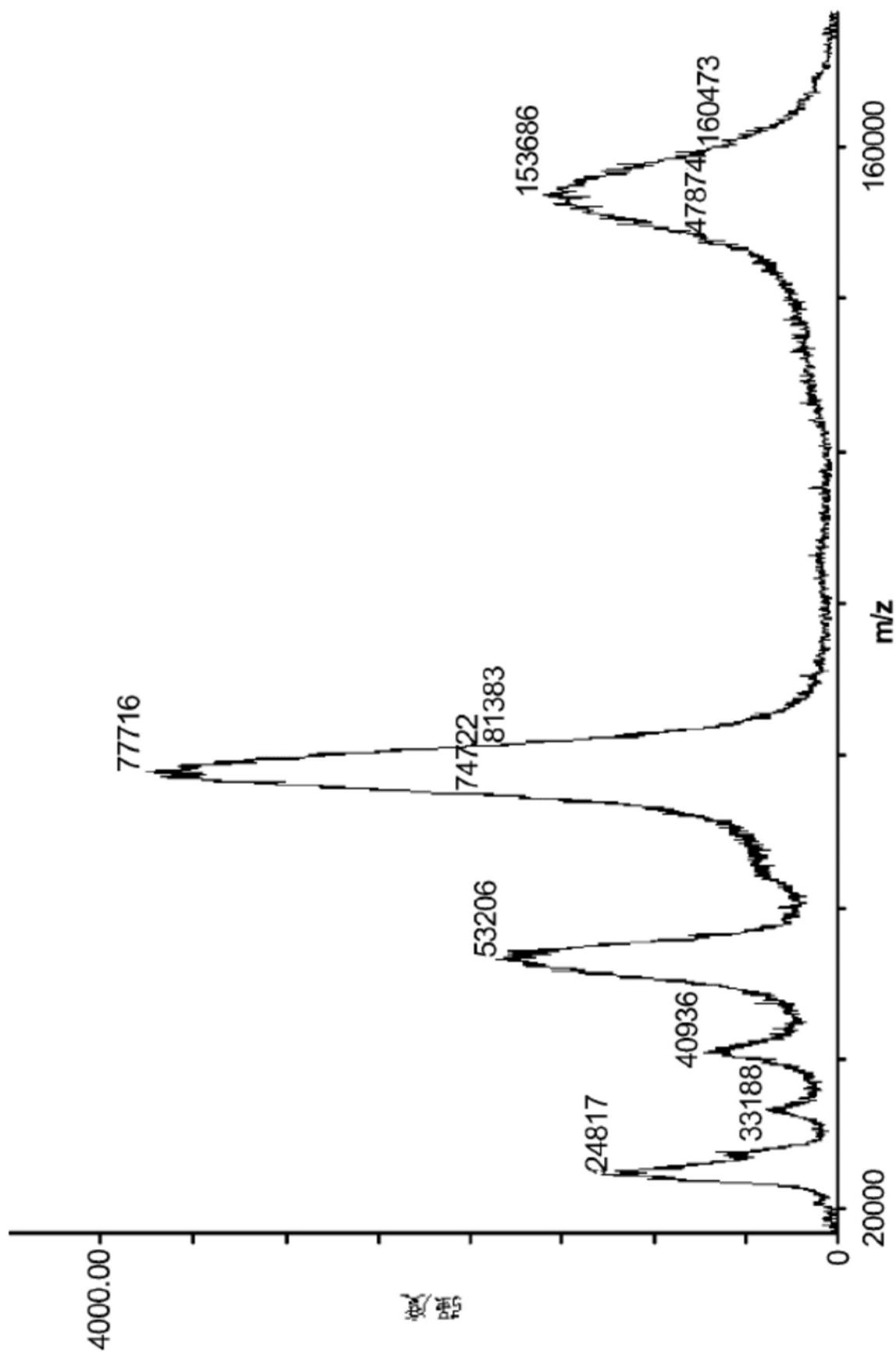


图11

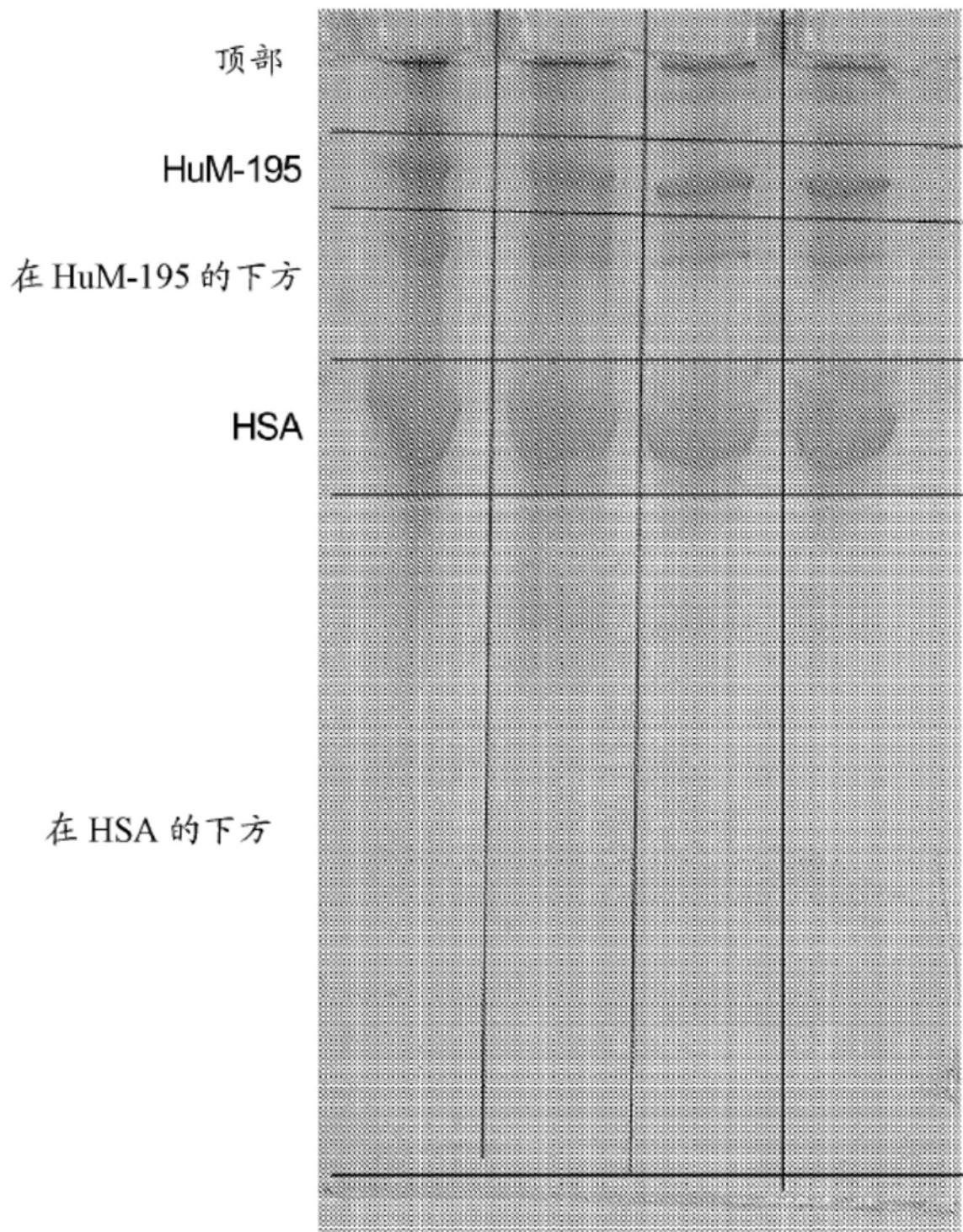


图12

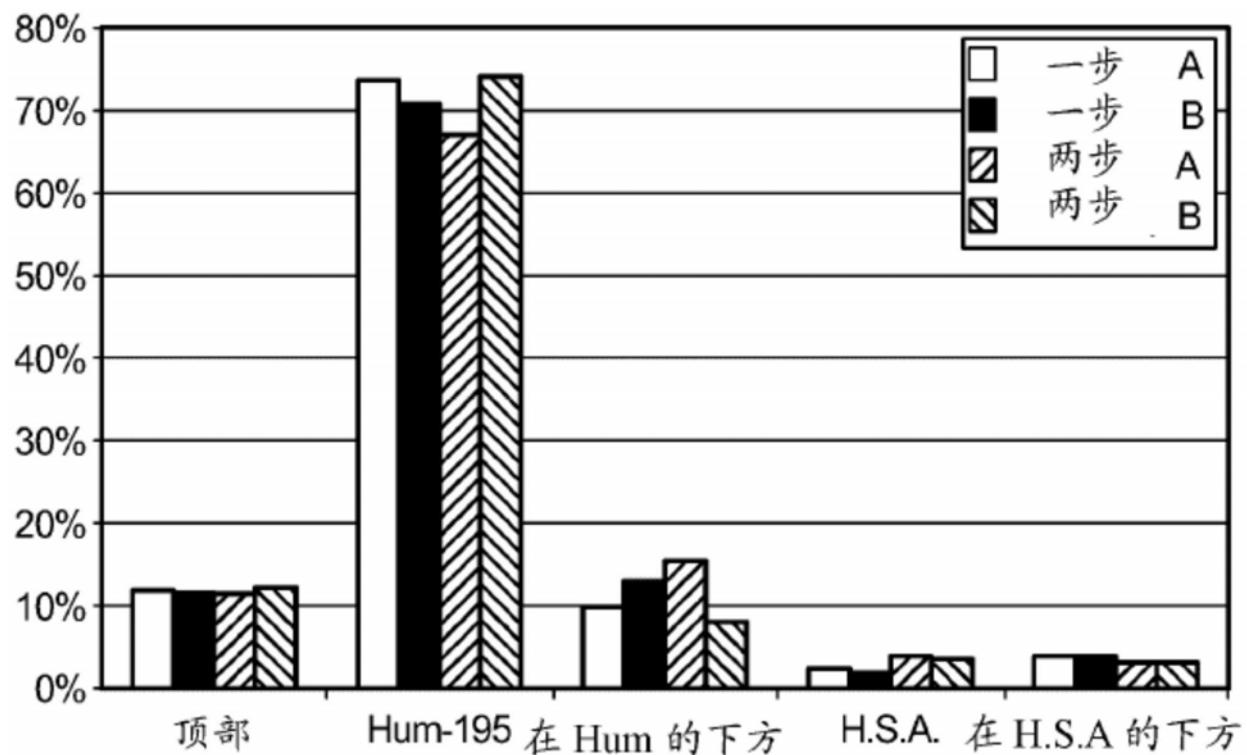


图13

凝胶电泳

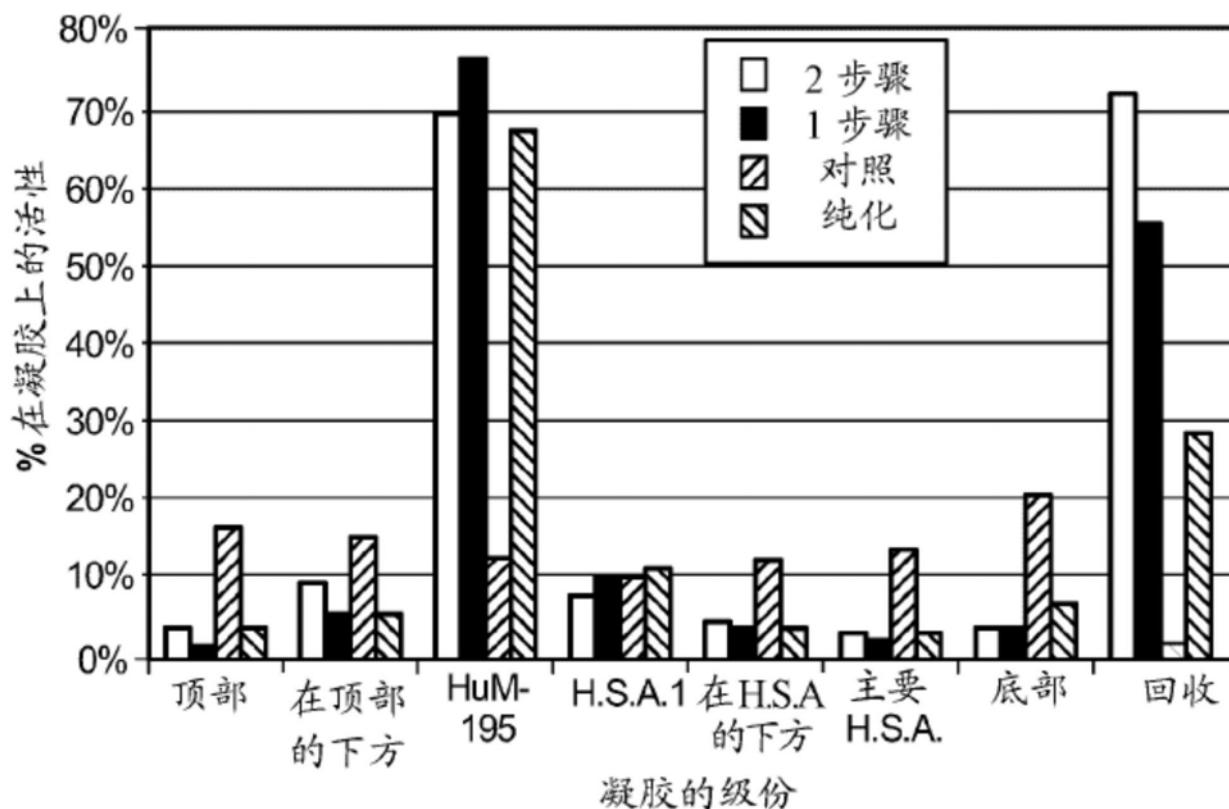


图14