



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 51/0474 (2019.02); A61K 39/395 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2015137512, 22.07.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.07.2010Дата регистрации:
31.10.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
22.07.2009 US 61/227,710Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2012106301 22.07.2009

(43) Дата публикации заявки: 25.12.2018 Бюл. № 36

(45) Опубликовано: 31.10.2019 Бюл. № 31

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

САЙМОН Джейми (US),

КИНГ А. Гэйлорд (US),

МОРЕНО БЕРМУДЕС Хосуэ Мануэль (DE)

(73) Патентообладатель(и):

АКТИНИУМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНК. (US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20020058007 A1, 16.05.2002. US
2003086868 A1, 08.05.2003. BORREBAEK et al.
An improved labeling method for Thorium-227
labeled antibodies for targeted alpha therapy. J
Nucl Med. 2009; 50 (Supplement 2):1821.
KENNEL SJ., et al. Evaluation of 225Ac for
vascular targeted radioimmunotherapy of lung
tumors. Cancer Biother Radiopharm. 2000 (см.
прод.)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ РАДИОИММУНОКОНЬЮГАТОВ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается способа получения радиоконъюгата актиния-225 (Ac-225), включающего стадии (a) конъюгирования хелатообразующего агента с биологической молекулой в конъюгирующей реакционной смеси для получения конъюгированной биологической молекулы; (b) очистки реакционной смеси для удаления неконъюгированных хелатообразующих агентов и (c) хелатирования одного или нескольких Ac-225 радионуклидов с конъюгированной биологической молекулой в хелатообразующей реакционной смеси при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ для

получения Ac-225 радиоконъюгата, где хелатообразующая реакционная смесь содержит кислоту и имеет pH от 5,5 до 7,0; и где биологическая молекула представляет собой HuM195, хелатирующий агент представляет собой p-SCN-Bn-DOTA, радиоактивность Ac-225 составляет $1 \pm 0,2$ мКи и содержание HuM195 составляет $1 \pm 0,2$ мг. Группа изобретений также касается радиоиммуноконъюгата Ac-225, полученного согласно указанному способу. Группа изобретений обеспечивает выход радиоиммуноконъюгата Ac-225 по меньшей мере 80%. 3 н. и 20 з.п. ф-лы, 14 ил., 5 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

Jun;15(3):235-44.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)*A61K 51/00* (2006.01)*A61K 103/40* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 51/0474 (2019.02); *A61K 39/395* (2019.02)(21)(22) Application: **2015137512, 22.07.2010**(24) Effective date for property rights:
22.07.2010Registration date:
31.10.2019

Priority:

(30) Convention priority:
22.07.2009 US 61/227,710Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2012106301 22.07.2009(43) Application published: **25.12.2018 Bull. № 36**(45) Date of publication: **31.10.2019 Bull. № 31**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**SAJMON Dzhejmi (US),
KING A. Gejlord (US),
MORENO BERMUDES Khosue Manuel (DE)**

(73) Proprietor(s):

AKTINIUM FARMASYUTIKALZ INK. (US)(54) **METHODS FOR PRODUCING RADIOIMMUNOCONJUGATES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine and a method for producing actinium-225 radioactive conjugate (Ac-225), comprising steps (a) conjugating a chelating agent to a biological molecule in a conjugating reaction mixture to obtain a conjugated biological molecule; (b) purifying the reaction mixture to remove unconjugated chelating agents and (c) chelating one or more Ac-225 radionuclides with a conjugated biological molecule in a chelating reaction mixture at temperature of 37 ± 2 °C to obtain Ac-225

radio conjugate, wherein the chelating reaction mixture contains an acid and has pH from 5.5 to 7.0; and where the biological molecule is HuM195, the chelating agent is p-SCN-Bn-DOTA, the radioactivity of Ac-225 is 1 ± 0.2 mCi and the content of HuM195 is 1 ± 0.2 mg. Group of inventions also relates to a radioimmunoconjugate Ac-225 obtained according to said method.

EFFECT: group of inventions provides output of radioimmunoconjugate Ac-225 of at least 80 %.

23 cl, 14 dwg, 5 tbl, 4 ex

[0001] Раскрытие данного патентного документа содержит материал, который подлежит защите авторским правом. Владелец авторского права не возражает против факсимильного воспроизведения любым лицом патентного документа или патентного раскрытия, как это представлено в файлах или записях Патентного ведомства США, но в остальном оставляет за собой все права, вытекающие из авторского права.

[0002] Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые здесь, включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей их полноте. Патентная и научная литература, относящаяся к настоящей заявке, устанавливает знания, которые доступны специалистам в данной области техники. Выданные патенты, заявки и другие публикации, которые приводятся здесь, являются, таким образом, включенными в качестве ссылки в той же степени, как если бы каждый из документов был специально и индивидуально указан для включения в виде ссылки. В случае противоречий будет преобладать настоящее раскрытие.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Радиоиммуноконъюгаты могут быть использованы в диагностических и лечебных медицинских процедурах. Радиоизотопные фармацевтические средства могут переносить по меньшей мере один радионуклид, связанный с носителем, например таргетирующий фрагмент. Радионуклид может продуцировать сигнал, который распознается при помощи радиологического диагностического оборудования.

Поскольку излучение, испускаемое радионуклидом, может оказывать токсическое действие на ткани, радиоиммуноконъюгаты могут быть использованы для достижения одного или нескольких терапевтических эффектов. При применении в качестве терапевтического средства локализация радиоиммуноконъюгатов на специфической структуре или участке в организме может быть использована для концентрирования эффектов радиоиммуноконъюгата в структурах или участках, которые подлежат лечению, и может уменьшить вредное воздействие на другие структуры и участки в организме. Например, радиоиммуноконъюгат может быть использован в качестве химиотерапевтического лекарственного средства для уничтожения раковых тканей. Существует необходимость совершенствования способов получения

радиоиммуноконъюгатов. Настоящее изобретение решает эту потребность.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В одном аспекте способы, описанные здесь, относятся к способу получения радиоконъюгата актиния-225 (Ac-225). Способ включает стадии: (a) конъюгирование хелатообразующего агента с биологической молекулой в конъюгирующей реакционной смеси для получения конъюгированной биологической молекулы, (b) очистка реакционной смеси таким образом, чтобы удалить неконъюгированные хелатообразующие агенты, и (c) хелатирование одного или нескольких Ac-225 радионуклидов с конъюгированной биологической молекулой в хелатообразующей реакционной смеси для получения Ac-225 радиоконъюгата.

[0005] В одном варианте стадия конъюгирования (a) включает инкубацию конъюгирующей реакционной смеси в течение приблизительно 1,5 часов при температуре, приблизительно равной 37°C. В другом варианте конъюгирование на стадии (a) состоит из инкубации конъюгирующей реакционной смеси в течение приблизительно 24 часов при температуре от приблизительно 16°C до приблизительно 20°C.

[0006] В еще одном дополнительном варианте очистка включает фильтрацию конъюгирующей реакционной смеси через фильтр, таким образом, чтобы очистить конъюгированную биологическую молекулу.

[0007] В одном варианте конъюгирующая реакционная смесь содержит бикарбонатный буфер. В другом варианте конъюгирующая реакционная смесь содержит фосфатный буфер. В еще одном дополнительном варианте конъюгирующая реакционная смесь имеет уровень pH от приблизительно 8,0 до приблизительно 9,2.

5 [0008] В одном варианте фильтрация выполняется в ГЭПЭС (HEPES) буфере. В другом варианте фильтрация выполняется в NaAc буфере. В еще одном дополнительном варианте фильтрация включает отсечение молекулярной массы при по меньшей мере приблизительно 10000 Да, по меньшей мере приблизительно 20000 Да или по меньшей мере приблизительно 40000 Да.

10 [0009] В одном варианте хелатообразующая реакционная смесь включает гентизиновую кислоту или аскорбиновую кислоту.

[0010] В другом варианте хелатообразующая реакционная смесь имеет уровень pH, приблизительно равный от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,0.

[0011] В еще одном варианте хелатирование на стадии (с) включает инкубацию
15 одного или нескольких радионуклидов Ac-225 с конъюгированной биологической молекулой в течение приблизительно 1,5 часов при температуре приблизительно 37°C.

[0012] В другом варианте способ дополнительно содержит стадию добавления терминирующего хелатора к хелатообразующей реакционной смеси. В одном варианте терминирующий хелатор представляет собой диэтилентриаминпентауксусную кислоту
20 (ДТПК, DTPA). В еще одном варианте способ дополнительно включает стадию инкубации хелатообразующей реакционной смеси в течение приблизительно 30 минут при температуре, приблизительно равной 37°C, следующую за стадией добавления терминирующего хелатора.

[0013] В одном варианте биологическая молекула содержит белок, пептид,
25 полинуклеотид, их комбинацию или их производные.

[0014] В одном варианте биологическая молекула представляет собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, одноцепочечный белок, содержащий антигенсвязывающие полипептидные последовательности антитела, однодоменное антитело, аналог любого из вышеизложенных или производные любого из
30 вышеизложенных. В другом варианте антигенсвязывающий фрагмент представляет собой вариабельный регион моноклонального антитела. В еще одном варианте биологическая молекула представляет собой белок, включающий антигенсвязывающую последовательность антитела. В еще одном варианте биологическая молекула является белком, полученным естественным, синтетическим или рекомбинантным образом,
35 включающим антигенсвязывающую последовательность антитела, которая связывает антиген на поверхности клетки. В еще одном варианте антиген на поверхности клетки-мишени представляет собой CD-33. В еще одном варианте биологическая молекула представляет собой HuM195.

[0015] В одном варианте радиоко́нъюгат представляет собой радиоиммуноконъюгат.

40 [0016] В другом варианте хелатообразующий агент представляет собой бифункциональный хелатообразующий агент. В одном варианте бифункциональный хелатообразующий агент является S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7,10-тетраазациклододекантетрауксусной кислотой (пара-SCN-Bn-ДОТУК). В другом варианте хелатообразующий агент выбран из группы соединений, состоящей из
45 следующих: диэтилентриаминпентауксусная кислота ("ДТПК", "DOTU"); 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N",N'''-тетрауксусная кислота ("ДОТУК", "DOTA"); пара-изотиоцианатобензил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота ("пара-SCN-Bz-ДОТУК", pSCN-Bz-DOTA); 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N"-

триуксусная кислота ("ДОЗУК", "DO3A"); 1,4,7,10-тетраазаиклододекан-1,4,7,10-тетракис(2-пропионовая кислота) ("ДОТПК", "DOTMA"); 3,6,9-триаза-12-окса-3,6,9-трикарбоксиметилен-10-карбокси-13-фенилтридеканоевая кислота ("В-19036"); 1,4,7-триазаиклононан-N,N',N"-триуксусная кислота ("НОТУК", "NOTA"); 1,4,8,11-тетраазаиклотетрадекан-N,N',N",N"'-тетрауксусная кислота ("ТЕТУК", "TETA"); триэтилететраамингексауксусная кислота ("ТТГУК", "TTGA"); транс-1,2-диаминогексаметрауксусная кислота ("трансДТУК", "CYDTA"); 1,4,7,10-тетраазаиклододекан-1-(2-гидроксипропил)4,7,10-триуксусная кислота ("ГП-ДОЗУК", "HP-DO3A"); транс-циклогександиаминтетрауксусная кислота ("ЦДТУК", "CDTA"); транс-(1,2)-циклогександиэтилентриаминпентауксусная кислота ("ЦДТПУК", "CDTPA"); 1-окса-4,7,10-триазаиклододекан-N,N',N"-триуксусная кислота ("ОТТУК", "OTTA"); 1,4,7,10-тетраазаиклододекан-1,4,7,10-тетракис{3-(4-карбоксил)бутановая кислота}; 1,4,7,10-тетраазаиклододекан-1,4,7,10-тетракис(уксусной кислоты метиламид); 1,4,7,10-тетраазаиклододекан-1,4,7,10-тетракис(метиленфосфоновая кислота); 2,2',2''-(10-(2-(2,5-диоксопирролидин-1-илокси)-2-оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазаиклододекан-1,4,7-триил)триуксусная кислота (ДОТУК-NHS эфир) и их производные, аналоги, и смеси.

[0017] В другом аспекте способы, описанные здесь, относятся к способу получения [Ac-225]-пара-SCN-Bn-ДОТУК/HuM195 радиоиммуноконъюгата. Способ, включающий следующие стадии: (а) конъюгирование пара-SCN-Bn-ДОТУК с антителом HuM195 в конъюгирующей реакционной смеси, содержащей бикарбонатный буфер и имеющей уровень pH, равный от приблизительно 8,0 до приблизительно 9,2, в течение 1,5 часов при температуре, приблизительно равной 37°C, для получения пара-SCN-Bn-ДОТУК/HuM195 иммуноконъюгата, (b) фильтрация конъюгирующей реакционной смеси через фильтр, имеющий отсечение молекулярной массы по меньшей мере приблизительно 10000 Да, по меньшей мере приблизительно 20000 Да или по меньшей мере приблизительно 40000 Да таким образом, чтобы очистить пара-SCN-Bn-ДОТУК/HuM195 иммуноконъюгат, где фильтрация осуществляется с помощью ГЭПЭС буфера или NaAc буфера, (с) хелатирование одного или нескольких радионуклидов актиния-225 с иммуноконъюгатом пара-SCN-Bn-ДОТУК/HuM195 в хелатообразующей реакционной смеси, содержащей гентизиновую кислоту и имеющую уровень pH, равный от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,0, в течение 1,5 часов при температуре приблизительно 37°C для получения [Ac-225]-пара-SCN-Bn-ДОТУК/HuM195 радиоиммуноконъюгата, (d) добавление ДТПК к хелатообразующей реакционной смеси и (е) инкубация хелатообразующей реакционной смеси в течение приблизительно 30 минут при температуре приблизительно 37°C.

[0018] В некоторых вариантах способы, описанные здесь, дополнительно включают стадию гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии через эксклюзионную смолу перед фильтрацией стадии (b). В одном варианте эксклюзионная смола для гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии имеет ограничение размера эксклюзии, приблизительно равное 5000 Да.

[0019] В некоторых вариантах способы, описанные здесь, дополнительно включают очистку радиоиммуноконъюгата или [Ac-225]-пара-SCN-Bn-ДОТУК/HuM195 радиоиммуноконъюгата при помощи гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии через эксклюзионную смолу. В одном варианте эксклюзионная смола имеет ограничение размера эксклюзии, равное приблизительно 6000 Да. В другом варианте эксклюзионная смола имеет ограничение размера эксклюзии, равное приблизительно 5000 Да.

[0020] В другом аспекте изобретение относится к радиоиммуноконъюгату,

изготавливаемому при помощи способов, описанных здесь.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0021] На Фиг. 1А представлен УФ-спектр нативной Hum-195 (розового цвета) и Hum-195/ДОТУК конъюгата (синего цвета). Оба раствора имели концентрацию
5 приблизительно 100 мкг/мл; оптическая плотность измерялась с помощью кюветы с длиной оптического пути 1 см.

[0022] На Фиг. 1В представлен УФ-спектр ЧСА(HSA) (0,1% зеленого цвета), нативного Hum-195 (100 мкг/мл розового цвета) и ДТПК/NaAc (100 мкг/мл).

[0023] На Фиг. 2 представлена ГП-ВЭЖХ/УФ хроматограмма нативного Hum195.

10 [0024] На Фиг. 3 представлена калибровка ВЭЖХ с УФ детектором для количественной оценки Hum-195.

[0025] На Фиг. 4 представлена ГП-ВЭЖХ/УФ хроматограмма конъюгата.

[0026] На Фиг. 5 представлена типичная калибровочная кривая, длина волны = 280 нм для калибровки УФ-спектрофотометра в количественной оценке HUM-195.

15 [0027] На Фиг. 6 представлена ГП-ВЭЖХ/рад. хроматограмма конъюгата (основная белковая фракция после очистки), меченная Ac-225.

[0028] На Фиг. 7 представлена ГП-ВЭЖХ/рад. хроматограмма фракции, содержащей свободный или ДТПК-связанный Ac-225.

20 [0029] На Фиг. 8 представлено типичное распределение активности Ac-225 в жидких фракциях после очистки, в Р-10 колонке и во флаконе реактора + КК (общая активность 1,2 мКи Ac-225).

[0030] На Фиг. 9 представлен типичный гамма-спектр Ac-225 и дочерних радиоактивных нуклидов на Ge детекторе с высокой разрешающей способностью.

25 [0031] На Фиг. 10 представлен типичный МАЛДИ(MALDI) спектр нативного Hum195 с ЦГКК(СНСА) (циано-4-гидроксикоричная кислота) в виде матричного раствора.

[0032] На Фиг. 11 представлен типичный МАЛДИ спектр конъюгата с ЦГКК в виде матричного раствора.

30 [0033] На Фиг. 12 представлен ПАГЭ(PAGE) гель-электрофорез одностадийного и двухстадийного препаратов, демонстрирующий секцию геля, вырезанную для анализа импульсов.

[0034] На Фиг. 13 показана активность в каждой вырезанной секции геля. Результаты согласуются со значительным процентным содержанием Ac-225, связанного с HUM-195. Результаты были идентичны для одностадийного и двухстадийного состава.

35 [0035] На Фиг. 14 представлен ПАГЭ гель-электрофорез, который был использован для анализа препарата с использованием одностадийного процесса и контроля. Контроль был подготовлен так же, как одностадийная процедура, но антитела не были конъюгированы с ДОТУК бифункциональным хелатообразующим агентом перед хелатированием с Ac-225. Контрольный препарат, в отличие от одностадийного препарата, демонстрирует очень небольшие количества Ac-225, связанные с HUM-195.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

40 [0036] Изобретение предоставляет способы получения радиоиммуноконъюгата. В одном аспекте изобретение относится к усовершенствованному способу для введения метки в моноклональное антитело (mAb) (IgG). В одном варианте способ представляет собой “постлейблинг или одностадийный подход”.

45 [0037] В одном аспекте способы, описанные здесь, относятся к одностадийному постконъюгационному процессу хелатирования для изготовления радиоиммуноконъюгата. В одном варианте радиоиммуноконъюгат является [Ac-225]-пара-SCN-Bn-ДОТУК/IgG (Hum195) конструкцией.

[0038] Радиоиммуноконъюгаты, описанные здесь, могут быть получены при помощи формирования вначале конъюгированного таргетирующего фрагмента, а затем хелатирования радионуклидов с конъюгированным таргетирующим фрагментом, чтобы образовать радиоиммуноконъюгат. Конъюгированный таргетирующий фрагмент
5 может быть радиоактивно меченным в любое время после конъюгации с таргетирующим фрагментом.

[0039] В одном варианте mAb вначале конъюгируют с ДОТУК бифункциональным хелатообразующим агентом, а затем очищенный конъюгат метят с помощью Ас-225. Согласно некоторым вариантам, описанным здесь, только одна-единственная стадия,
10 вовлекающая ²²⁵Ас, необходима для введения метки в биологическую молекулу. Преимущества способов, описанных здесь, над двухстадийными процессами или процессами смены меток включают, но не ограничиваются этим, постоянный высокий результат введения меток, простоту и более короткое время введения метки. Кроме того, расширение масштабов способов, описанных в настоящем документе, может
15 быть выполнено более легко по сравнению с двухстадийными процессами или процессами смены меток. Кроме того, способы, описанные здесь, пригодны для подготовки состава комплекта, где финальное введение радиоактивной метки может произойти на клиническом участке.

[0040] В одном варианте Num-195/пара-SCN-Bn-ДОТУК конъюгаты получают при помощи реакции концентрированного раствора HUM-195 с пара-SCN-Bn-ДОТУК в бикарбонатном или в фосфатном буфере при значениях pH, находящихся в диапазоне между приблизительно 8 и приблизительно 9, и с помощью инкубации при температуре приблизительно 37°C или при комнатной температуре. В другом варианте биоконъюгаты
20 могут быть очищены от избытка бифункционального хелатора с помощью повторной фильтрации или центрифугирования и при помощи гравитационной гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии (ГПХ, SEC). Во время процесса очистки бикарбонатный или фосфатный буфер изменяется на N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновую кислоту (ГЭПЭС; свободная кислота) или ацетатную среду. Конъюгаты могут быть
25 охарактеризованы при помощи гель-проникающей (эксклюзионной) высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГП-ВЭЖХ).

[0041] Для введения метки смесь HUM-195 и раствор ²²⁵Ас в ацетатном буфере с уровнем pH от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,0 инкубируют в течение от
35 приблизительно 80 минут до приблизительно 90 минут в присутствии небольшого количества «ловушек» радикалов. После реакции и испытания с ДТПК результат введения меток можно определить при помощи моментальной тонкослойной хроматографии (МТСХ, ITLC). Образец смеси может затем очищаться при помощи гравитационной гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии (ГПХ). В очищенной белковой фракции можно измерить количество ²²⁵Ас и белка с помощью
40 неразрушающей гамма-спектрометрии высокого разрешения и УФ-спектрофотометрии, соответственно. Радиохимическую чистоту в очищенной фракции измеряют при помощи МТСХ и/или ГП-ВЭЖХ.

[0042] В одном аспекте изобретение включает радиоиммуноконъюгаты, имеющие CD33 таргетирующий фрагмент. В соответствии с изобретением, таргетирующий
45 фрагмент может быть синтетическим или природным белком или его частью, или вариантом (включая видовые, аллельные и мутантные варианты). В некоторых вариантах таргетирующие фрагменты включают фрагменты антител.

[0043] Радиоиммуноконъюгаты, которые производятся с использованием способов,

описанных в настоящем документе, могут быть использованы в диагностических или терапевтических медицинских процедурах. Например, радиоизотопное фармацевтическое средство может быть использовано в качестве визуализирующего контрастного вещества для получения ПЭТ или других радиографических изображений. Кроме того,

5 радиоизотопное фармацевтическое средство может быть использовано в качестве терапевтического средства, которое доставляет дозы радиации к специфическим структурам или участкам физиологической активности в организме. Специалист в данной области по достоинству оценит другие виды фармакологического использования радиоизотопного фармацевтического средства.

10 [0044] В другом аспекте изобретение предоставляет способ лечения рака у субъекта, способ включает введение субъекту фармацевтически эффективного количества радиоиммуноконъюгата.

[0045] В еще одном аспекте изобретение предоставляет способ лечения рака у субъекта, способ включает введение субъекту фармацевтически эффективного

15 количества фармацевтической композиции, где композиция содержит радиоиммуноконъюгат, который специфично связывается с молекулой CD33 на поверхности клетки.

[0046] ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0047] Как используется здесь и в формуле изобретения, формы единственного числа

20 включают и множественное число ссылок, если содержание четко не диктует иное.

[0048] Термин "приблизительно" используется здесь для обозначения примерно, в районе, грубо говоря, или около. Когда термин "приблизительно" используется в сочетании с числовым диапазоном, он изменяет этот диапазон за счет расширения границ выше и ниже изложенных числовых значений. Термин "приблизительно"

25 используется здесь для изменения числового значения выше или ниже указанного значения на отклонение 20%.

[0049] Как используется здесь, термин "чистота" относится к присутствию существенного единственного химического объекта или отсутствию существенных загрязняющих веществ в смеси.

30 [0050] Чистота конъюгированной молекулы, произведенной способами раскрытия, может быть измерена с помощью стандартных аналитических способов, например, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или фильтровальной очисткой. Когда чистота измеряется путем определения количества конъюгированных таргетирующих фрагментов или радиоиммуноконъюгатов, чистота может составлять

35 больше, чем приблизительно 70%, больше, чем приблизительно 80%, больше, чем приблизительно 90%, больше, чем приблизительно 95%, больше, чем приблизительно 96%, больше, чем приблизительно 97%, больше, чем приблизительно 98%, или больше, чем приблизительно 99%. Когда чистота измеряется путем определения количества загрязнений, загрязняющие вещества, такие как неконъюгированные хелатообразующие

40 агенты, могут составлять меньше, чем приблизительно 20%, меньше, чем приблизительно 10%, или меньше, чем приблизительно 1%.

[0051] Термин "биологическая молекула", используемый в настоящей заявке, относится к углеродсодержащим молекулам, в том числе макромолекулам, и включает любую молекулу, известную тем, что она встречается в биологических системах, включая

45 аминокислоты, антитела, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты (в том числе ДНК и РНК), углеводы, полисахариды и им подобные. Биологические молекулы включают те, которые встречаются в природе, а также производные, аналоги и модификации таких молекул. Кроме того, термин относится к углеродсодержащим молекулам, таким

как лекарственные средства, антибиотики и им подобные, которые используются в медицине. Аналоги нуклеиновых кислот, содержащие модифицированные основания, которые не встречаются в природе, включены как биологические молекулы. Подобным образом любой аналог молекулы, который встречается в природе, или любая химическая модификация такой молекулы также включены в определение биологических молекул. Биологические молекулы могут быть выделены из природных источников или синтезированы в лабораторных условиях, как, например, синтетические белки, пептиды и олигонуклеотиды.

[0052] Используемый здесь термин "таргетирующий фрагмент" относится к любому белку, антителу, фрагменту антитела, гормону, пептиду, фактору роста, антигену, гаптену или любому другому носителю, функция которого заключается в распознавании специфического биологического целевого сайта. Антитело и фрагмент антитела относятся к любому поликлональному, моноклональному, химерному, человеческому, млекопитающих, одноцепочечному, димерному и тетрамерному антителу или фрагменту антитела. Такой биологический носитель при присоединении к функционализированному комплексу служит для транспортировки присоединенных радионуклидов к специфическим целевым тканям.

[0053] Термин "антитело" относится к любому поликлональному, моноклональному, химерному антителу или гетероантителу. Антитела, используемые в радионуклидных конъюгатах настоящего изобретения, являются моноклональными антителами, имеющими высокую специфичность для заданных раковых клеток. Антитела, используемые в настоящем изобретении, могут быть направлены против, например, рака, опухолей, лейкозов, аутоиммунных нарушений, вовлекающих клетки иммунной системы, нормальные клетки, которые должны быть удалены, такие как клетки костного мозга и ткани предстательной железы, клетки, инфицированные вирусом, включая ВИЧ, микоплазму, дифференцирование и другие клеточные мембранные антигены, поверхностные антигены патогенных микроорганизмов и любые биологически активные молекулы.

[0054] Некоторые примеры антител, подходящих для использования в способах описанных здесь, включают, но не ограничиваясь этим, HuM195 (anti-CD33), CC-11, CC-46, CC-49, CC-49 F(ab')₂, CC-83, CC-83 F(ab')₂ и B72.3. Фрагменты антител включают Fab фрагменты и F(ab')₂ фрагменты, и любую часть антитела, обладающую специфичностью по отношению к желаемому эпитопу или эпитопам. Антитела, которые могут быть использованы в конъюгатах радионуклидов настоящего изобретения, могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники.

Высокоспецифичные моноклональные антитела могут быть получены с помощью способов гибридизации, хорошо известных в данной области техники, см., например, работу Kohler and Milstein, Nature, 256, 495-497 (1975); и Eur. J. Immunol., 511-519 (1976).

[0055] Как используется в настоящем документе, термин "радиоконъюгат" относится к конъюгату биологической молекулы, меченному радионуклидом (например, к тому, в котором фрагмент хелатообразующего агента белкового конъюгата сформировал комплекс с радионуклидом).

[0056] Как используется в настоящем документе, термин "радиоиммуноконъюгат" относится к конъюгату таргетирующего фрагмента, меченному радионуклидом (например, к тому, в котором фрагмент хелатообразующего агента белкового конъюгата сформировал комплекс с радионуклидом).

[0057] При формировании радиоиммуноконъюгатов, описанных здесь, степень хелатообразования и конъюгации преимущественно является высокой.

[0058] Как используются здесь, термины "степень конъюгации" и "результат (выход) конъюгации" используются как синонимы и определяются как процентное содержание хелатирующего агента, который успешно конъюгирован с таргетизирующим фрагментом, деленное на общее количество хелатирующего агента, который используется в реакции конъюгации. Процент конъюгации при создании конъюгированных таргетизирующих фрагментов настоящей реакции составляет больше чем 50%, еще больше чем 70%, больше чем 90%, больше чем 95%, больше чем приблизительно 96%, больше чем приблизительно 97%, больше чем приблизительно 98%, или больше чем приблизительно 99%.

[0059] Как используются здесь, термины "степень хелатирования" и "результат (выход) хелатирования" используются как синонимы и определяются как процентное содержание радионуклида, который успешно хелирован с таргетизирующим фрагментом, деленное на общее количество радионуклида, который используется в реакции хелатирования. Процент хелатирования при создании радиоиммуноконъюгатов настоящей реакции составляет больше чем 50%, еще больше чем 70%, больше чем 90%, больше чем 95%, больше чем приблизительно 96%, больше чем приблизительно 97%, больше чем приблизительно 98%, или больше чем приблизительно 99%.

[0060] Как описано здесь, производство степени конъюгации и степени хелатообразования может зависеть от одного или нескольких параметров процесса подготовки радиоиммуноконъюгата.

[0061] Согласно способам, описанным в настоящем документе, таргетизирующий фрагмент может быть растворен в буферном растворе, содержащем хелатирующий агент. Уровень pH может быть выбран для оптимизации условий для конъюгации хелатирующего агента с таргетизирующим фрагментом в конъюгирующей реакционной смеси. В одном варианте конъюгирующая реакционная смесь может содержать бикарбонатный буфер. В другом варианте конъюгирующая реакционная смесь может содержать фосфатный буфер. В еще одном варианте конъюгирующая реакционная смесь может иметь уровень pH, равный от приблизительно 8,0 до приблизительно 9,2. Например, конъюгирующая реакционная смесь может иметь уровень pH, равный приблизительно 8,0, приблизительно 8,1, приблизительно 8,3, приблизительно 8,4, приблизительно 8,5, приблизительно 8,6, приблизительно 8,7, приблизительно 8,8, приблизительно 8,9, приблизительно 9,0, приблизительно 9,1 или приблизительно 9,2. Температура конъюгирующей реакционной смеси также может быть отрегулирована, чтобы способствовать конъюгации хелатирующего агента с таргетизирующим фрагментом. В одном варианте конъюгирующую реакционную смесь можно инкубировать при температуре, приблизительно равной 37°C. В еще одном дополнительном варианте конъюгирующую реакционную смесь можно инкубировать на протяжении приблизительно 1,5 часов.

[0062] В другом варианте конъюгированный таргетизирующий фрагментом может быть растворен в буферном растворе, содержащем радионуклид. Уровень pH может быть выбран для оптимизации условий для хелатирования радионуклида с конъюгированным таргетизирующим фрагментом в хелатообразующей реакционной смеси. В одном варианте хелатообразующая реакционная смесь может содержать гентизиновую кислоту. В другом варианте хелатообразующая реакционная смесь может иметь уровень pH в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,0. Например, хелатообразующая реакционная смесь может иметь уровень pH, равный приблизительно 5,5, приблизительно 5,6, приблизительно 5,7, приблизительно 5,8, приблизительно 5,9, приблизительно 6,0, приблизительно 6,1, приблизительно 6,2, приблизительно 6,3,

приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9 или приблизительно 7,0.

[0063] Температура хелатообразующей реакционной смеси также может быть отрегулирована, чтобы способствовать хелатированию радионуклидов с конъюгированным таргетирующим фрагментом. В одном варианте хелатообразующую реакционную смесь можно инкубировать при температуре, приблизительно равной 37°C. В еще одном дополнительном варианте хелатообразующую реакционную смесь можно инкубировать в течение приблизительно 1,5 часов. После периода времени раствор может быть погашен добавлением хелата тушения (например, диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПК)) и реакционная смесь может быть очищена. В одном варианте хелатообразующая реакционная смесь может быть дополнительно инкубирована после добавления хелата тушения. В одном варианте хелатообразующая реакционная смесь может быть дополнительно инкубирована в течение приблизительно 30 минут после добавления хелата тушения. В другом варианте хелатообразующая реакционная смесь может быть дополнительно инкубирована при температуре, равной приблизительно 37°C после добавления хелата тушения.

[0064] Хелаторы

[0065] Бифункциональные хелаторы являются соединениями, которые имеют двойную функциональность изолирующих ионов металла плюс способность ковалентно связывать биологический носитель, обладающий специфичностью к эпитопам или антигенам опухолевой клетки. Такие соединения являются пригодными для терапевтического и диагностического использования, когда они, например, находятся в комплексе с радиоактивными ионами металлов и ковалентно связаны со специфичным антителом. Эти типы комплексов используются для транспортировки радиоактивных металлов к опухолевым клеткам, которые являются мишенью для специфичности присоединенных антител [см., например, Mears et al., Anal. Biochem. 142, 68-74 (1984); Krejcarek et al., Biochem. And Biophys. Res. Comm. 77, 581-585 (1977)].

[0066] Многочисленные хелаторы известны в данной области техники. См., например, Pitt et al., "The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload," в 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, и ссылки, содержащиеся в них.

[0067] Типичные хелаторы, подходящие для приготовления радиоиммуноконъюгатов, описанные в настоящей заявке, включают, но не ограничиваясь этим, хелаторы, такие как S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7,10-тетраазациклододекантетрауксусная кислота (пара-SCN-Bn-ДОТУК), диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПК); этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусная кислота (ДОТУК); пара-изотиоцианатобензил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (пара-SCN-Bz-ДОТУК); 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N''-триуксусная кислота (ДОЗУК); 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(2-пропионовая кислота) (ДОТПК); 3,6,9-триаза-12-окса-3,6,9-трикарбоксиметил-10-карбокси-13-фенилтридекановая кислота ("B-19036"); 1,4,7-триазациклононан-N,N',N''-триуксусная кислота (НОТУК); 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусная кислота (ТЕТУК); триэтилентетраамингексауксусная кислота (ТТГУК); транс-1,2-диаминогексантетрауксусная кислота (трансДОТУК); 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-(2-гидроксипропил)4,7,10-триуксусная кислота (ГП-ДОЗУК); транс-

циклогександиаминтетрауксусная кислота (ЦДТУК); транс-(1,2)-циклогександиэтиленцентриаминпентауксусная кислота (ЦДТПУК); 1-окса-4,7,10-триазациклододекан-N,N',N''-триуксусная кислота (ОТТУК); 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис{3-(4-карбоксил)бутановая кислота}; 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(уксусной кислоты метиламид); 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(метиленфосфоновая кислота); и их производные.

[0068] Радионуклиды

[0069] Радионуклиды в комплексе с конъюгированными таргетирующими фрагментами могут быть из любого подходящего содержащего металл радиоизотопа, включая, но не ограничиваясь этим, актиний-225, астат-211, йод-120, йод-123, йод-124, йод-125, йод-126, йод-131, йод-133, висмут-212, мышьяк-72, бром-75, бром-76, бром-77, индий-110, индий-111, индий-113m, галлий-67, галлий-68, стронций-83, цирконий-89, рутений-95, рутений-97, рутений-103, рутений-105, ртуть-107, ртуть-203, рений-186, рений-188, теллур-121m, теллур-122m, теллур-125m, тулий-165, тулий-167, тулий-168, технеций-94m, технеций-99m, фтор-18, серебро-111, платина-197, палладий-109, медь-62, медь-64, медь-67, фосфор-32, фосфор-33, иттрий-86, иттрий-90, скандий-47, самарий-153, лютеций-177, родий-105, празеодимий-142, празеодимий-143, тербий-161, гольмий-166, золото-199, кобальт-57, кобальт-58, хром-51, железо-59, селен-75, таллий-201, и иттербий-169.

[0070] Способ получения радионуклида ^{225}As не является критичным для настоящего изобретения. Например, ^{225}As может быть изготовлен в циклотроне. ^{225}As может быть получен в чистом виде от Министерства энергетики (Минэнерго), США, и Института трансурановых элементов (ИТЭ), Карлсруэ, Германия.

[0071] Очистка

[0072] В некоторых вариантах способы, описанные здесь, включают одну или несколько стадий разделения конъюгированного таргетирующего фрагмента или радиоиммуноконъюгата от других компонентов реакционной смеси. В одном варианте смесь может быть перемещена в фильтрующее устройство (например, центрифужный аппарат Millipore), имеющее специфическое отсеечение молекулярной массы, таким образом, что фильтрация реакционной смеси через устройство фильтрации может разделить конъюгированный таргетирующий фрагмент или радиоиммуноконъюгат от других компонентов реакционной смеси. В одном варианте фильтрация реакционной смеси может быть использована для получения конъюгированного таргетирующего фрагмента или радиоиммуноконъюгата, имеющих чистоту, составляющую по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99%, или по меньшей мере приблизительно 99,5%.

[0073] В различных вариантах выход конъюгированного таргетирующего фрагмента или радиоиммуноконъюгата составляет по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, или по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% конечного продукта.

[0074] Таргетирующие фрагменты

[0075] Таргетирующие фрагменты, описанные здесь, могут содержать один или

несколько полипептидов, в основном или частично закодированных генами иммуноглобулинов или фрагментами генов иммуноглобулинов. Общеизвестные гены иммуноглобулинов включают гены каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эpsilon и мю константных регионов, а также множество генов переменных регионов иммуноглобулинов. Легкие цепи подразделяются на каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно.

[0076] Основная структурная единица иммуноглобулинов (антител), как известно, включает тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет переменный регион, из от приблизительно 100 до 110 или более аминокислот, в первую очередь ответственных за распознавание антигена. Термины «переменная легкая цепь (VL)» и «переменная тяжелая цепь (VH)», относятся к этим легким и тяжелым цепям, соответственно.

[0077] Антитела могут существовать как интактные иммуноглобулины или как ряд хорошо характеризованных фрагментов, получаемых при переваривании различными пептидазами. В частности, пепсин переваривает антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области, для получения F(ab)'₂, димер Fab, который сам по себе является легкой цепью, которая присоединена к VH-CN1 дисульфидными связями. F(ab)'₂ может быть уменьшен в мягких условиях, чтобы разрушить дисульфидные связи в шарнирной области, таким образом, конвертируя F(ab)'₂ димер в мономер Fab'. Мономер Fab' является по существу Fab с частью шарнирной области (см., Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993) для большей терминологии фрагмента антитела). Хотя Fab' домен определяется с точки зрения переваривания интактного антитела, специалист оценит по достоинству, что такие Fab' фрагменты могут быть синтезированы заново либо химически, либо при помощи использования методологии рекомбинантных ДНК.

[0078] Регионы Fab' могут быть получены из антител животного (особенно мышинного или крысиного) происхождения или человеческого происхождения или могут быть химерными (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855 (1984)) или гуманизированными (Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986), и опубликованная заявка на патент Великобритании № 8707252).

[0079] Как описано в настоящем документе, антитело может включать или быть полученным от любого млекопитающего, например, но не ограничиваясь этим, человека, мыши, кролика, крысы, грызунов, приматов, или любой их комбинации и включает изолированные человеческие, приматов, грызунов, млекопитающих, химерные, гуманизированный и/или определяющий комплементарность регион (РОК)-трансплантированные или РОК-адаптированные антитела, иммуноглобулины, продукты расщепления и другие части, и их варианты.

[0080] Антитела, пригодные в вариантах осуществления изобретения, могут быть получены несколькими способами, хорошо известными в данной области техники. В одном аспекте антитела могут быть получены с помощью любой гибридомной методики, хорошо известной в данной области техники, см., например, 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., eds., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001).

[0081] Антитела могут быть также получены выбором из библиотек таких доменов или компонентов, например, фаговой библиотеки. Фаговая библиотека может быть
 5 создана путем вставки библиотеки случайных олигонуклеотидов или библиотеки полинуклеотидов, содержащих последовательности, которые представляют интерес, например, из В-клеток иммунизированных животных или человека (Smith, G.P. 1985. *Science* 228: 1315-1317). Библиотеки фаговых антител содержат пары переменных регионов тяжелой (H) и легкой (L) цепи в одном фage, что позволяет экспрессию
 10 одноцепочечных Fv фрагментов или Fab фрагментов (Hoogenboom, et al. 2000, *Immunol. Today* 21(8) 371-8). Разнообразием фагмидной библиотеки можно манипулировать для расширения и/или изменения иммуноспецифичности моноклональных антител библиотеки для создания, а затем идентификации дополнительных, желательных, человеческих моноклональных антител. Например, тяжелая (H) цепь и легкая (L) цепь
 15 молекулы иммуноглобулина, кодирующие гены, могут быть случайным образом смешаны (перетасованы), чтобы создать новые пары HL в собранной молекуле иммуноглобулина. Кроме того, одна или обе H и L цепи кодирования генов могут быть мутагенизированы в РОК переменном регионе полипептида иммуноглобулина, а затем обследованы на желательную аффинность и возможности нейтрализации.
 20 Библиотеки антител также могут быть созданы синтетически, путем выбора одной или нескольких рамок последовательностей человека и помещения коллекций РОК кассет, полученных из спектра антител человека или через выполненные по плану вариации (Kretzschmar and von Ruden 2000, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:598-602). Позиции разнообразия не ограничиваются РОК, но также могут включать сегменты рамок
 25 переменных регионов или могут включать иные переменные регионы антител, такие как пептиды.

[0082] Другие целевые связующие компоненты, которые могут включать не только переменные регионы антител, представляют собой рибосомный дисплей, дрожжевой дисплей, и бактериальные дисплеи. Рибосомный дисплей представляет собой способ
 30 трансляции мРНК в свои родственные белки, сохраняя при этом белок присоединенным к РНК. Нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность, восстанавливают с помощью ОТ-ПЦР (Mattheakis, L.C. et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9022). Дрожжевой дисплей основан на конструкции белков слияния связанного с мембраной альфа-агглютининового дрожжевого рецептора адгезии, *aga1* и *aga2*, части системы
 35 типа спаривания (Broder, et al. 1997. *Nature Biotechnology*, 15:553-7). Бактериальный дисплей основан на слиянии мишени с экспортированными бактериальными белками, которые связывают с клеточной мембраной или клеточной стенкой (Chen and Georgiou 2002. *Biotechnol Bioeng*, 79:496-503).

[0083] По сравнению с гибридной технологией способы фагового и других дисплеев
 40 антител предоставляют возможность манипулировать выбором против антигена мишени *in vitro* и без ограничения возможности влияния хозяина на антиген, или наоборот.

[0084] Специфические примеры подпоследовательностей антител включают, например, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, или фрагмент одноцепочечного антитела (ОЦА)
 45 (например, scFv). Подпоследовательности включают части, которые сохраняют по меньшей мере часть функции или активности последовательности полной длины. Например, подпоследовательность антитела сохранит способность избирательно связываться с антигеном, даже если аффинность связывания подпоследовательности

может быть больше или меньше, чем аффинность связывания антител полной длины.

[0085] Фрагмент Fv является фрагментом, который содержит переменный регион легкой цепи VL и переменный регион тяжелой цепи VH, экспрессированный как две цепи. Объединение может быть нековалентным или может быть ковалентным, таким

5 как химический сшивающий агент или межмолекулярная дисульфидная связь (Inbar et al., (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2659; Sandhu (1992) Crit. Rev. Biotech. 12:437).

[0086] Одноцепочечное антитело ("ОЦА") представляет собой генно-инженерное или ферментативно переваренное антитело, содержащее переменный регион легкой цепи VL и переменный регион тяжелой цепи, дополнительно связанный гибким

10 линкером, таким как полипептидная последовательность, в VL-линкер-VH ориентации или в VH-линкер-VL ориентации. Кроме того, одноцепочечный Fv фрагмент может быть получен путем объединения двух переменных доменов через дисульфидные связи между двумя остатками цистеина. Способы получения scFv антител описаны, например, Whitlow et al., (1991) In: Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97;

15 U.S. Pat. No. 4,946,778; and Pack et al., (1993) Bio/Technology 11:1271.

[0087] Другие способы получения подпоследовательностей антител, такие как разделение тяжелых цепей для формирования моновалентных фрагментов легких-тяжелых цепей, дальнейшее расщепление фрагментов, или другие ферментативные, химические, или генетические техники также могут использоваться при условии, что

20 подпоследовательности связываются с антигеном, с которым связывается интактное антитело.

[0088] Антитела, используемые в изобретении, включают антитела полной длины, подпоследовательности (например, одноцепочечные формы), димеры, тримеры, тетрамеры, пентамеры, гексамеры или любой другой олигомер более высокого порядка,

25 который сохраняет по меньшей мере часть антигенсвязывающей активности мономера. Мультимеры могут содержать гетеромерные или гомомерные комбинации антител

полной длины, подпоследовательности, немодифицированные или модифицированные, изложенные в настоящем документе и известные в данной области техники. Мультимеры антител являются пригодными для повышения активности антигена по сравнению с

30 мономером за счет наличия у мультимера нескольких антигенсвязывающих сайтов. Мультимеры антител также являются пригодными для получения олигомерных

(например, димерных, тримерных, тетрамерных и т.д.) комбинаций разных антител, таким образом производя композиции антител, которые являются многофункциональными (например, бифункциональными, трифункциональными,

35 тетрафункциональными и т.д.).

[0089] Антитела могут быть получены путем химического сшивания выбранных молекул (которые были получены синтетическим путем или путем экспрессии нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды) или с помощью технологии рекомбинантной ДНК в сочетании с *in vitro*, или клеточной экспрессией полипептида,

40 и последующей олигомеризацией. Антитела могут быть произведены аналогичным образом путем рекомбинантной технологии и экспрессии, слияния гибридом, которые производят антитела с различными эпитопными особенностями, или экспрессией множественных нуклеиновых кислот, кодирующих переменные цепи антител, с различными эпитопными особенностями в одной клетке.

[0090] Антитела могут быть соединены непосредственно или опосредованно, через ковалентное или нековалентное связывание, например, через домен мультимеризации, для получения мультимеров. "Домен мультимеризации" опосредует нековалентные взаимодействия белок-белок. Специфические примеры включают биспиральные

(например, структуры "лейциновая застежка-молния" (зиппер)) и альфа-спиральные белковые последовательности. Последовательности, которые опосредуют связывание белок-белок через силы ван-дер-Ваальса, водородные связи или связи заряд-заряд, также рассматриваются как домены мультимеризации. Дополнительные примеры

5 включают основные-спираль-петля-спираль домены и другие последовательности белков, которые опосредуют гетеромерные или гомомерные взаимодействия белок-белок между связывающими белками нуклеиновых кислот (например, ДНК связывающие транскрипционные факторы, такие как TAF). Один конкретный пример домена мультимеризации представляет собой остатки р53 от 319 до 360, являющиеся

10 медиаторами образования тетрамера. Другим примером является тромбоцитарный фактор человека 4, который самостоятельно собирается в тетрамеры. Еще одним примером является внеклеточный белок TSP4, член семейства тромбоспондина, который может образовывать пентамеры. Дополнительные конкретные примеры представляют собой "лейциновую застежку молнию" белков JUN, FOS, и дрожжевого белка GCN4.

15 [0091] Антитела могут быть непосредственно связаны друг с другом с помощью химического кросс-сшивающего агента или могут быть соединены через линкерную последовательность (например, пептидную последовательность), чтобы образовать мультимеры.

[0092] В одном варианте способы, описанные здесь, относятся к таргетирующему

20 фрагменту, который специфически связывает CD33 и включает по меньшей мере часть гуманизированных V регионов. Например, антитело может включать VL регион, как это определено, и VH регион, имеющий по меньшей мере один гуманизированный фрагмент.

[0093] Фармацевтические композиции

25 [0094] В практике настоящего изобретения конъюгат радиоиммуноконъюгата можно вводить самостоятельно или в качестве компонента фармацевтически приемлемого препарата.

[0095] Как используется здесь, "фармацевтически приемлемая соль" означает любую соль соединения формулы I, которая является достаточно нетоксичной, чтобы быть

30 пригодной в лечении млекопитающих. Представители таких солей, которые образуются при помощи стандартных реакций как из органических, так и из неорганических источников, включают, например, серную, соляную, фосфорную, уксусную, янтарную, лимонную, молочную, малеиновую, фумаровую, пальмитиновую, желчную, палмевую, муциновую, глутаминовую, d-камфорную, глутаровую, гликолевую, фталевую, винную,

35 муравьиновую, лауриновую, стерическую, салициловую, метансульфоновую, бензолсульфоновую, сорбиновую, пикриновую, бензойную, коричную и другие подходящие кислоты. Кроме того, включены соли, образованные при помощи стандартных реакций из органических и неорганических источников, таких как аммоний, ионы щелочных металлов, ионы щелочноземельных металлов, и других подобных

40 ионов. Предпочтительными являются соли соединений формулы I, где соли представляют собой соли калия, натрия, аммония или их смеси.

[0096] Как используется здесь, термин "терапевтически эффективное количество" означает количество радиоиммуноконъюгата, который производит терапевтический эффект на заболевание, которое лечат. Терапевтически эффективное количество будет

45 варьироваться в зависимости от млекопитающих, радиоиммуноконъюгата и способа его введения (например, перорально или парентерально). Обычный специалист в данной области техники может определить терапевтически эффективное количество радиоиммуноконъюгата.

[0097] Фармацевтические композиции включают "фармацевтически приемлемые" и "физиологически приемлемые" носители, разбавители или наполнители. Используемые здесь термины "фармацевтически приемлемый" и "физиологически приемлемый" включают растворители (водные или неводные), растворы, эмульсии, дисперсные среды, покрытия, изотонические и содействующие или задерживающие абсорбцию вещества, совместимые с введением лекарственного средства. Такие составы могут содержаться в жидкости, эмульсии, суспензии, сиропе или эликсире, или твердой форме; таблетке (с покрытием или без покрытия), капсуле (твердой или мягкой), порошке, гранулах, кристаллах или микрогранулах. Дополнительные активные соединения (например, консерванты, антибактериальные, противовирусные и противогрибковые вещества) могут также быть включены в композиции.

[0098] Фармацевтические композиции могут быть сформулированы, чтобы быть совместимыми с конкретным местным или системным путем введения. Таким образом, фармацевтические композиции включают носители, разбавители или наполнители, подходящие для введения конкретными маршрутами.

[0099] Специфические, не ограничивающие примеры путей введения для композиций изобретения представляют собой ингаляционную или интраназальную доставку. Дополнительные пути включают пероральное, назальное, парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное, трансдермальное (местное) и чресслизистое введение.

[0100] Фармацевтические композиции, включающие радиоиммуноконъюгаты, описанные в настоящем документе, могут быть приготовлены в соответствии со стандартными способами и дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Как правило, в качестве фармацевтически приемлемого носителя можно использовать физиологический раствор. Другие подходящие носители включают, например, воду, буферизованную воду, 0,4% солевой раствор, 0,3% глицин, и тому подобное, включая гликопротеины для повышения стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и др. Эти композиции могут быть простерилизованы обычными, хорошо известными способами стерилизации. Полученные водные растворы могут быть упакованы для пользования или профильтрованы в асептических условиях и лиофилизированы. Лيوфилизированный препарат соединяют со стерильным водным раствором перед введением. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для аппроксимации физиологических условий, такие как вещества, регулирующие уровень pH, и вещества буферизации, вещества, регулирующие тоничность, и им подобные, как, например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция и другие.

[0101] Концентрация радиоиммуноконъюгатов, описанных здесь, в фармацевтических препаратах может широко варьировать, т.е., от приблизительно 0,05% до приблизительно 1% масс., от приблизительно 1% до приблизительно 2% масс., от приблизительно 2% до приблизительно 5% масс., от приблизительно 5% до приблизительно 10% масс., от приблизительно 10% до приблизительно 30% масс., от приблизительно 30% до приблизительно 50% масс., от приблизительно 50% до приблизительно 75% масс., от приблизительно 75% до приблизительно 99% масс. Фармацевтические композиции могут быть выбраны в зависимости от их физических характеристик, в том числе, но не ограничиваясь этим, от объема жидкости, вязкости и других параметров в соответствии с конкретным способом введения, который выбран. Например, концентрация может быть увеличена, чтобы снизить нагрузку жидкостью, связанную с лечением. Количество введенных радиоиммуноконъюгатов будет зависеть

от конкретного таргетирующего фрагмента, который используется, состояния заболевания, которое подвергается лечению, терапевтического средства, которое

доставляется, и решения врача-клинициста. Как правило, количество радиоиммуноконъюгата, которое вводят, будет достаточным, чтобы доставить

терапевтически эффективные дозы конкретного фармакологического вещества. Терапевтически эффективные дозы для различных фармакологических веществ хорошо известны специалистам в данной области техники, и типичные диапазоны для ряда лекарственных средств приведены выше. Типичные дозы радиоиммуноконъюгата могут составлять от приблизительно 0,001 мг до приблизительно 50 мг на килограмм

массы тела, или между приблизительно 0,1 мг и приблизительно 10 мг/кг массы тела. Терапевтически эффективные дозы также могут быть определены на усмотрение врача.

[0102] Радиоиммуноконъюгатные фармацевтические композиции могут быть введены парентерально, то есть, внутрисуставно, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно, перорально или назально. Конкретные составы, которые подходят

для такого использования, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985). Составы могут включать растворы радиоиммуноконъюгата, суспендированные в приемлемом носителе, или в водном носителе. Могут быть использованы различные водные носители, например, вода, буферизированная вода, 0,9% изотонический солевой раствор и им подобные. Эти

композиции можно стерилизовать обычными хорошо известными способами стерилизации, или они могут быть стерильно профильтрованы. Полученные водные растворы могут быть упакованы для использования как есть, или лиофилизированы. Лيوфилизированный препарат перед введением соединяют со стерильным водным раствором. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые

вспомогательные вещества, необходимые для аппроксимации физиологических условий, таких как регуляторы pH и буферные агенты, агенты тонус настройки, увлажняющие агенты и им подобные, как, например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат и т.д.

[0103] Растворы или суспензии для парентерального, внутрикожного или подкожного применения могут включать стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные вещества,

такие как бензиловый спирт или метилпарабены, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

Уровень pH может быть скорректирован кислотами или основаниями, такими как соляная кислота или гидроксид натрия.

[0104] Для чресслизистого или трансдермального введения пенетранты, соответствующие барьеру, через который они будут проникать, могут быть использованы в лекарственном средстве. Такие пенетранты, как правило, известны в данной области техники и включают, например для введения через слизистую, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидиевой кислоты. Введение через слизистую может быть совершено с помощью использования назальных спреев, ингаляционных устройств (например, аспираторов) или суппозитория. Для трансдермального введения активные соединения могут быть введены в рецептуру мазей, бальзамов, гелей или кремов, как обычно известно в данной области техники.

[0105] Дополнительные фармацевтические препараты, подходящие для композиций

для введения в способах изобретения, известны в данной области техники (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa.; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, N.J.; and Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)).

[0106] Фармацевтические препараты могут быть упакованы в стандартной лекарственной форме для легкости введения и единообразия дозировки. Термин "стандартная лекарственная форма", используемый здесь, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению, причем каждая доза содержит заданное количество активного вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с фармацевтическим носителем или наполнителем.

[0107] Наборы

[0108] Настоящее изобретение также предоставляет наборы, содержащие, радиоиммуноконъюгаты, полученные в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. Таргетирующие фрагменты радиоиммуноконъюгатов в наборе могут быть по природе моноклональными или поликлональными. Одна или обе руки таргетирующего фрагмента из набора могут быть химерной, человеческой, гуманизированной или деиммунизированной.

[0109] Набор, как это предусмотрено в настоящем описании, может также включать очищающую композицию, которая очистит несвязанные радиоиммуноконъюгаты из ткани. Одним из подходящих очищающих веществ является гликозилированный антиидиотипический Fab' фрагмент, направленный против таргетирующего-руку(и) заболевания таргетирующего фрагмента радиоиммуноконъюгата. В этом варианте радиоиммуноконъюгат предоставлен и разрешен для сращения в мишенях до максимальной степени. Для очистки остаточного радиоиммуноконъюгата антиидиотипические Ab к целевым Ab предоставляются в виде гликозилированного Fab' фрагмента. Очищающее вещество связывается с радиоиммуноконъюгатом моновалентным образом, в то время как присоединенные гликозидовые остатки направляют весь комплекс в печень, где происходит быстрый метаболизм. Очищающие вещества обсуждаются более подробно в патентах США № 09/314135 и 09/337756.

[0110] Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение, и изложены, чтобы помочь в понимании изобретения, и не должны быть истолкованы для ограничения каким-либо образом объема изобретения, как определено в формуле изобретения, которая следует после них.

ПРИМЕРЫ

[0111] Пример 1: Номенклатура и определения

[0112] Пара-SCN-Bn-ДОТУК: S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7,10-тетраазациклододекантетрауксусная кислота (Macrocyclics, Dallas, TX).

[0113] БФХ: Бифункциональные хелатообразующие агенты.

[0114] ДОТУК-БФХ: ДОТУК бифункциональные хелатообразующие агенты: например, NHS-ДОТУК; пара-SCN-Bn-ДОТУК.

[0115] Na (NH₄) Ac: натрия (аммония) ацетат.

[0116] mAb: Моноклональное антитело: HuM-195.

[0117] HuM-195: Конструкция anti-CD33 антитела для лечения миелолейкоза. HuM-195 представляет собой рекомбинантный IgG1 mAb объединяющий РОК регионы мышинового M-195 с рамками/константными регионами человека.

[0118] ГПХ: Гель-проникающая (эксклюзионная) хроматография.

[0119] ВЭЖХ: Высокоэффективная жидкостная хроматография.

[0120] ГП-ВЭЖХ/УФ: ГП-ВЭЖХ в сочетании с УФ-детектором.

[0121] ГП-ВЭЖХ/рад.: ГП-ВЭЖХ в сочетании с радиоактивным детектором.

[0122] МТСХ: Моментальная тонкослойная хроматография.

[0123] $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$: Ацетат аммония, NH_4Ac .

[0124] NaCH_3CO_2 : Ацетат натрия, NaAc .

[0125] Df: Фактор разведения.

[0126] ЦГКК: Альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота.

[0127] МАЛДИ: Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация масс спектрометрия.

[0128] ПЭВП: Полиэтилен высокой плотности.

[0129] ГЭПЭС: N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота.

[0130] Пример 2: Конъюгация NuM195 с пара-SCN-Bn-ДОТУК

[0131] 2.3.1 Материалы и химические вещества. См. Таблицу 2 для спецификаций

[0132] 2.3.2 Подготовка химических веществ и условий для реакции конъюгации

[0133] 2.3.2.1 Подготавливают заранее следующие растворы:

[0134] Нативный NuM195, 5 мг/мл, хранят при температуре 4-8°C

[0135] Пара-SCN-Bn-ДОТУК хранят при температуре -20°C.

[0136] NaCl , 0,9%: взвешивают 0,45 г NaCl и растворяют его в воде, свободной от металлов, затем доводят объем до 50 мл. Смешивают раствор и после гомогенизации фильтруют его через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в ПЭВП контейнерах объемом 50 мл.

[0137] 0,2 М натрия фосфата одноосновного (раствор А): взвешивают 0,48 г NaH_2PO_4 и добавляют до 20 мл дистиллированной H_2O . Перемешивают раствор до полного растворения.

[0138] 0,2 М натрия фосфата двухосновного (раствор В): Взвешивают 2,83 г NaHPO_4 и добавляют 100 мл дистиллированной H_2O .

[0139] 0,1 М фосфатный буфер, pH = 8: Соединяют и смешивают 5,3 мл раствора А с 94,7 мл раствора В. Чтобы определить уровень pH, используют бумагу для определения pH. Разводят буфер добавлением равного объема дистиллированной H_2O ~100 мл.

Фильтруют раствор через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в ПЭВП (HDPE) контейнерах объемом 50 мл.

[0140] 2 М NaOH : Берут приблизительно 5 мл 30% раствора NaOH и смешивают его с водой, свободной от металлов, дают раствору остыть, а затем доводят объем до 25 мл. Хранят раствор в ПЭВП (FEP) контейнерах объемом 50 мл.

[0141] 4 М NaOH : В ПЭВП контейнер объемом 50 мл добавляют 50 мл воды, свободной от металлов, и 8,0 г NaOH и встряхивают для полного растворения.

[0142] 3 М NH_4Ac (или NaAc): Взвешивают 6,15 г NaAc и растворяют в воде, свободной от металлов. После растворения соли доводят объем до 25 мл. Перемешивают раствор и после гомогенизации фильтруют его через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в ПЭВП контейнерах объемом 25 мл.

[0143] 0,25 М NH_4Ac (или NaAc): Берут 2,1 мл 3 М NaAc и смешивают с водой, свободной от металлов, доводят объем до 25 мл. Смешивают раствор, и после гомогенизации фильтруют его через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в ПЭВП контейнерах объемом 25 мл.

[0144] 0,1 М NH_4Ac (NaCH_3CO_2), pH 7. Берут 3,3 мл 3 М NaAc и смешивают с водой, свободной от металлов, доводят объем до 100 мл. Хранят раствор в ПЭВП контейнерах

объемом 100 мл.

[0145] 0,1 М HCl: Берут 2,5 мл 10 М HCl и смешивают с водой, свободной от металлов, в ПЭ мерной колбе объемом 25 мл. Ожидают до тех пор, пока раствор охладится, и доводят объем до 25 мл. Смешивают раствор и после гомогенизации фильтруют его через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в ПЭВП контейнерах объемом 25 мл.

[0146] 0,05 М HCl: Берут 1,25 мл 10 М HCl и смешивают с водой, свободной от металлов, в ПЭ мерной колбе объемом 25 мл. Ожидают до тех пор, пока раствор охладится, и доводят объем до 25 мл. Смешивают раствор и после гомогенизации фильтруют его через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в ПЭВП контейнерах объемом 25 мл.

[0147] NaN_3 0,05%. Взвешивают 0,5 г NaN_3 и растворяют его в воде Millipore. Доводят объем до 1 л.

[0148] 1,0 М NaHCO_3 . В ПЭВП контейнер объемом 50 мл добавляют 50,0 мл воды, свободной от металлов, и 8,4 г NaHCO_3 и встряхивают до полного растворения. (Это дает выход 2 М NaHCO_3 раствора). Смешивают 17,8 мл 4 М NaOH раствора и 50 мл 2 М NaHCO_3 раствора во флаконах для хранения компании Coning Costar объемом 250 мл (или эквивалентных). Хорошо перемешивают.

[0149] В качестве альтернативы:

[0150] 1,0 М NaHCO_3 . В ПЭВП контейнер объемом 100 мл добавляют 50,0 мл воды, свободной от металлов, и 8,4 г NaHCO_3 и смешивают с 17,8 мл 4 М NaOH раствором. Встряхивают до полного растворения и доводят объем до 100 мл. Хранят раствор во флаконах для хранения объемом 250 мл, компании Coning Costar (или эквивалентных). Хорошо перемешивают.

[0151] 0,1 М ГЭПЭС раствор. Помещают 3,0 мл 1 М ГЭПЭС буфера (Fisher BioReagents, номер продукта BP299-500) в ПЭВП флаконы объемом 50 мл и добавляют 27 мл воды для инъекций.

[0152] 2.3.2.2 Материалы

Таблица 2			
Список химических веществ и материалов для конъюгации			
Химическое вещество/материал	Название заказа	Спецификации/Композиция	Поставщик
HCl, 30 %	1.00318.1000	Высокоочищенный	VWR
NaOH, 30 %	1.05589.0250	Высокоочищенный	VWR
Na ацетат	1.062640050	> 99,99%	VWR
NH_4 ацетат	372331-10 04030KH	> 99,999%	Sigma Aldrich
Уксусная кислота Ледниковая, 100%	100264 1000660250	Высокоочищенный	VW
ДОТУК -NHS - эфир	B-280		Macro cyclics, Dallas, TX
ДОТУК-пара-SCN - Вп	B-205		Macro cyclics, Dallas, TX
NaCl	1.064060050	> 99,99%	VWR
Hum195		5 мг/мл	Isotex
ДТПК	1083900250	> 99%	VWR
Вода, свободная от металлов	1.01262.1000	Ультранимая	VWR
Na_2HPO_4	106566.0050	Высокоочищенный 99,99	VWR
NaH_2PO_4	106370.0100	Высокоочищенный 99,99	VWR

5	Одноразовая колонка для обессоливания PD-10	17-0851-01		GE Health Care Europe GmbH
	pH бумага	1.09533.0001 1.09542.0001	pH=5,0-10 pH=4,0-7	VWR
	ПП пробирки типа Эппендорф	211-2130	ПП	VWR
	Нагревающий блок	460-3249	203x315X89	VWR
	ПЭ пробирки	6008117	ПЭ	Perkin Elmer GmbH
10	Колонка Protein Pack 300SW	WRT080013	Колонка Protein Pack 300SW	Waters
	Колонка Protein Pack 125 centrifugard	WRT1866000926	Колонка Protein Pack 125 centrifugard	Waters
	Na азид Na ₃ N	8.22335.0111	Чистота ≥99 %	VWR
	ГЭПЭС	BP299-100		Fisher BioReagents
	NaHCO ₃	106329.0500		VWR
15	Пипетки Эппендорф	613-3646 613-3649 613-3650	0,5-10 мкл (серый наконечник) 10-100 мкл (желтый наконечник) 100-1000 мкл (синий наконечник)	VWR
	Наконечники для пипеток Эппендорф	612-1158 612-1160 612-1163	0,5-10 мкл (серый наконечник) 10-100 мкл (желтый наконечник) 100-1000 мкл (синий наконечник)	VWR
20	Millipore центрифужное устройство YM-10	4411 (для 8 единиц) 4421 (для 24 единиц)	С фильтром отсека для молекулярной массы 10 000 MM	Millipore
	Nalgene контейнеры	2002-0001 2002-0002 2002-0004	30, 60 и 125 мл для хранения растворов	VWR
25	Amicon Ультра центрифужное фильтровальное устройство для объема менее 4 мл			
	Amicon Ультра центрифужное фильтровальное устройство для объема менее 4 мл Ультра фильтр -10 K, из восстановленной целлюлозы 10 000 MM CO	Номер по каталогу UFC801096		Millipore

[0153] 2.3.2.3 Оснащение инструментами:

[0154] Ультracентрифуга с охлаждением (4°C) от компании “Biofuge primo R, Heraeus” или эквивалент от компании Thermo Scientific, либо аналогичная (вращение со скоростью 6500 об/мин)

[0155] Vortex или аналогичная система

[0156] УФ-видимый спектрофотометр Varian Cary Win-5000 оснащенный компьютером для хранения спектра и оценки, или аналогичная система (или эквивалент)

[0157] ВЭЖХ с УФ детектором и Waters Protein Pack 300SW в качестве стационарной фазы, оснащенный компьютером для хранения спектра и оценки (или эквивалент).

[0158] Холодильник (4-8°C) для хранения mAb и конъюгированных mAb

[0159] Морозильная камера (-20°C) для хранения БФХ-ДОТУК

[0160] Аналитические весы

[0161] Нагревающий блок или устройство для конического сканирования внутри термостата

[0162] 2.3.3 Калибровка ВЭЖХ - УФ детектора для квантификации NuM195. Контроль качества NuM195

[0163] 2.3.3.1 Из раствора 5 мг/мл NuM195 готовят по меньшей мере три разбавленных раствора, содержащих известные концентрации, которые определяются чувствительностью радиоактивных детекторов, соединенных с ГП-ВЭЖХ, и настраивают для использования. Обычно диапазон концентраций в пределах 125-625

мкг/мл является адекватным, если интересует чувствительность и линейность.

[0164] 2.3.3.2 Настройка ВЭЖХ для измерений с помощью УФ-детектора при длине волны 280 нм

[0165] 2.3.3.3 Кондиционирование ГП-ВЭЖХ колонки в 0,9% NaCl с использованием скорости 0,5 мл/мин

[0166] 2.3.3.4 Берут аликвоты из разбавленных растворов HuM-195 (или конъюгата) и пропускают их через ГП-ВЭЖХ/УФ. Например, для ВЭЖХ с системой впрыска 100 мкл - цикл величина белка, проходящего через колонку Protein Pack 300SW, будет колебаться от 12,5 мкг до 62,5 мкг. В качестве подвижной фазы используют 0,9% NaCl. См. фиг. 2 в качестве иллюстрации типичной хроматограммы.

[0167] 2.3.3.5 Устанавливают связь между сигналом I_c (площадь под пиком) и концентрацией. Генерируют калибровочную кривую (см. Фиг.3, которая демонстрирует типичные хроматограммы), что позволяет аналитику рассчитать концентрацию Hum195 в образце конъюгата*. Другой близкий подход основан на нахождении соотношения концентрация/сигнал, полученного из хроматограммы ГП-ВЭЖХ/УФ стандартного образца HUM-195. Если условие линейности выполняется, то соотношение концентрация/сигнал будет постоянным, K_{280nm} . Таким образом, концентрация Hum-195 в образце конъюгата вычисляется в соответствии с нижеприведенной формулой:

$$C(\text{HuM195, мг/мл}) = K_{280nm} * I_s * D_f,$$

K_{280nm}	соотношение концентрации HuM195 (мг/мл) в калибровочном образце к площади (I_c) под пиком на УФ (установлена на уровне 270 нм) хроматограмме калибровочного образца
I_c	площадь под пиком на ГП-ВЭЖХ/УФ (280 нм) хроматограмме калибровочного образца (Фиг. 2)
I_s	площадь под пиком на ГП-ВЭЖХ/УФ (280 нм) хроматограмме образца (Фиг. 4)
D_f	фактор разведения
C (HuM195, мг/мл)	концентрация HuM195 в неразбавленном образце в мг/мл
*Раствор конъюгата не должен содержать свободные БФХ или любое другое вещество, поглощающее при длине волны 280 нм (см. Фиг. 1B).	

[0168] 2.3.4 Необязательно: Концентрация mAb при помощи фильтрации-центрифугирования

[0169] Эта стадия важна, если должно быть приготовлено большое количество конъюгатов. Описанная ниже процедура применяется для обработки примерно 10 мг HUM-195 в одном эксперименте/флаконе.

[0170] 2.3.4.1 Берут новое центрифугирующее устройство от компании Millipore YM-10 с отсечением молекулярных масс 10000 MM (YM устройство с более высоким уровнем отсечения может быть использовано с соответствующим повышением времени вращения) и промывают его несколькими миллилитрами 0,05 M HCl и чистой H_2O .

[0171] 2.3.4.2 Заблаговременно регулируют температуру центрифужной пробирки до 4°C.

[0172] 2.3.4.3 Взвешивают 2 мл нативного раствора HuM195 5 мг/мл или очищенного Hum195 и перемещают его в центрифужную пробирку.

[0173] 2.3.4.4 Центрифугируют раствор при скорости 6500 об./мин и при температуре 4°C, пока объем раствора не составит 1 мл или меньше.

[0174] 2.3.4.5 После центрифугирования переворачивают центрифужную пробирку и центрифугируют снова при скорости вращения 500 об./мин для того, чтобы собрать концентрированный раствор mAb в ретентатном флаконе.

[0175] 2.3.4.6 Переносят концентрированный mAb (приблизительно 10 мг/мл) в пробирку типа Эппендорф. Собирают также фильтрат и анализируют содержание HuM195 при помощи ГП-ВЭЖХ в обоих растворах. Хранят растворы при температуре

4-8°C.

[0176] 2.3.5 Реакция конъюгации в бикарбонатном буфере

[0177] 2.3.5.1 Согревают пробирку типа Эппендорф, содержащую 2,5 мг ДОТУК/пара-SCN-Bn в 0,25 мл воды, свободной от металлов.

5 [0178] 2.3.5.2 Добавляют 1 мл раствора NuM-195 5 мг/мл (или 0,5 мл концентрации 10 мг/мл) и перемешивают раствор.

[0179] 2.3.5.3 Добавляют 0,05 мл 1,0 М NaHCO₃ и перемешивают раствор.

[0180] 2.3.5.4 После смешивания проверяют уровень pH путем удаления 0,001 мл аликвоты и нанесения ее пятен на pH бумагу с необходимым диапазоном pH. Уровень
10 pH должен находиться между 8 и 9, а целевой уровень pH равен 9. Продолжают добавлять 0,01 мл 0,1 М NaHCO₃ и измеряют уровень pH до того момента, пока pH не находится в диапазоне между 8,0 и 9,2.

[0181] 2.3.5.5 Инкубируют реакцию смесь в устройстве для конического сканирования при температуре 37°C в течение 1 часа и 30 минут.

15 [0182] 2.3.6 Необязательно: Реакция конъюгации в фосфатном буфере

[0183] 2.3.6.1 Взвешивают 5 мг/пара-SCN-Bn-ДОТУК в предварительно очищенных пробирках типа Эппендорф и растворяют его в 0,4 мл 0,1 М фосфатного буфера pH=8.

20 [0184] 2.3.6.2 Смешивают аккуратно концентрированный раствор mAb приблизительно 10 мг/мл с 400 мкл раствора фосфатного буфера.

[0185] 2.3.6.3 После смешивания проверяют уровень pH путем удаления 0,001 мл аликвоты и нанесения ее пятен на pH бумагу с необходимым диапазоном pH. Уровень pH должен находиться между 8,0 и 9,2.

25 [0186] 2.3.6.4 Если уровень pH слишком низкий, добавляют аликвоты 0,010 мл 2 М NaOH к раствору и аккуратно перемешивают раствор.

[0187] 2.3.6.5 Повторяют стадии 2.3.6.3 и 2.3.6.4 до тех пор, пока не достигают целевых значений pH. Приблизительно 0,03 мл 2 М NaOH раствора необходимо, чтобы достичь целевого уровня pH.

30 [0188] 2.3.6.6 Закрывают пробирку типа Эппендорф и используют систему Vortex для перемешивания, оставляют на 24 часа при комнатной температуре либо действуют, как описано на следующей стадии 2.3.6.7.

[0189] 2.3.6.7 Альтернативно инкубируют реакцию смесь в нагревающем блоке или в инкубационной встряхивающей камере при температуре 37°C в течение 1 часа и 30 минут.

35 [0190] 2.3.7 Очистка реакционной смеси путем фильтрации-центрифугирования. КК для ГП-ВЭЖХ/УФ

40 [0191] 2.3.7.1 Перемещают всю конструкцию реакционной смеси (разделы 2.3.5.5 и 2.3.6.7) в новое центробежное устройство YM-10 Millipore или его эквивалент (10000 ММ отсечение). Фильтры с отсечением молекулярной массы 20000 или 40000 также являются приемлемыми.

[0192] 2.3.7.2 Добавляют 1 мл 0,1 М ГЭПЭС или 0,1 М NaAc и центрифугируют образец при скорости вращения 6500* об/мин и температуре 4°C до тех пор, пока объем раствора не составит приблизительно 1 мл.* Может быть использована более низкая скорость вращения с последующим увеличением времени разделения. Следовать инструкции
45 производителя при использовании других фильтров.

[0193] 2.3.7.3 Повторяют стадию 2.3.7.2 еще три раза.

[0194] 2.3.7.4 Берут небольшую аликвоту из окончательно очищенной конъюгированной фракции и пропускают ее через ГП-ВЭЖХ, состоящую из колонки

Protein Pack 300SW (см. 2.3.3). В качестве подвижной фазы используют 0,9% раствор NaCl. Сравнивают с неконъюгированными mAb, конъюгированные mAb демонстрируют на хроматограмме пик, смещенный влево (см. Фиг.4).

[0195] 2.3.7.5 Анализируют хроматограмму ГП-ВЭЖХ/УФ (см. пример Фиг.4) и проверяют, что область сигнала, соответствующая свободным БФХ не наблюдается.

[0196] 2.3.7.6 Если на ГП-ВЭЖХ/УФ хроматограмме наблюдаются свободные БФХ, то повторяют стадию 2.3.7.2, в противном случае переходят к следующей стадии.

[0197] 2.3.7.7 Количественно определяют содержание конъюгированных mAb в образце, как описано в разделах 2.3.3.4-2.3.3.5 для эксперимента калибровки или как указано в разделе 2.3.9.

[0198] 2.3.7.8 Очищенную конъюгированную фракцию хранят при температуре 4-8°C: образец готов для введения радиоактивной метки.

[0199] 2.3.8 Необязательно: Очистка реакционной смеси при помощи гравитационной SE-хроматографии и фильтрации-центрифугирования

[0200] Описанная ниже процедура является альтернативой способу, описанному в разделе 2.3.7.

[0201] 2.3.8.1 См. стадию 2.3.7.1.

[0202] 2.3.8.2 Кондиционируют новую PD-10 смолу в растворе 0,1 М NaAc, пропуская через колонку 5 мл 0,1 М NaAc. Утилизируют промывной раствор.

[0203] 2.3.8.3 Вносят всю конструкцию реакционной смеси (после разделов 2.3.6.7 или 2.3.5.5) в резервуар колонки и собирают элюат в пробирки Эппендорфа или ПЭ пробирки (фракция 1).

[0204] 2.3.8.4 Промывают реакционные пробирки 0,5 мл раствора 0,1 М NaAc и заливают промывные растворы в резервуар PD-10 колонки.

[0205] 2.3.8.5 Элюат собирают отдельно в пробирки типа Эппендорф (фракция 2).

[0206] 2.3.8.6 Повторяют стадии 2.3.8.4-2.3.8.5 дважды (фракции 3, 4).

[0207] 2.3.8.7 Продолжают внесение 0,5 мл 0,1 М NaAc в резервуар PD-10 колонки и повторяют это действие до тех пор, пока не будет достигнут общий объем элюирования, равный 6 мл (фракции 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

[0208] 2.3.8.8 Промывают колонку еще два раза, каждый с 2 мл 0,1 М NaAc (фракции 13 и 14). Собирают элюенты.

[0209] 2.3.8.9 Объединяют фракции 5-12 (4 мл), поскольку они содержат большую часть конъюгированных mAb. Фракции 13-14 содержат большую часть несвязанных или свободных БФХ.

[0210] 2.3.8.10 Выполняют стадии, указанные в разделах 2.3.7.2-2.3.7.8.

[0211] 2.3.9 Определение концентрации белка в конъюгате с помощью УФ-спектрофотометрии

[0212] 2.3.9.1 Устанавливают УФ-спектрофотометр на длину волны 280 нм (чтобы увидеть типичный УФ спектр нативного и конъюгированного Hum-195, см. Фиг.1).

[0213] 2.3.9.2 Готовят один разбавленный стандартный образец или, по желанию, для генерирования калибровочной кривой по меньшей мере три разбавленных стандартных раствора с известными концентрациями Hum195 в 0,9% NaCl и находят область линейности между оптической плотностью (обычно 0,1-0,8) и концентрацией (обычно 60-600600 мкг/мл). См. Фиг.5 для примера из калибровочной кривой. Для растворов Hum195 с концентрацией 0,1% (1 мг/мл в 0,9% NaCl) в кювете с длиной оптического пути 1 см, оптическая плотность составляет приблизительно 1,4.

[0214] 2.3.9.3 Вычисляют концентрацию белка в образце либо с помощью калибровочной кривой на графике "зависимость оптической плотности от концентрации"

(например, на Фиг.5) или, менее точно, на основе следующей формулы:

$$C(\text{HuM195, мг/мл}) = A_{280\text{нм}} * D_f * f_c / \epsilon_{280\text{нм}} * L,$$

5	$A_{280\text{нм}}$	оптическая плотность при длине волны 280 нм
	$\epsilon_{280\text{нм}}$	коэффициент экстинкции при длине волны 280 нм для 0,1% = 1,4
	L	длина оптического пути кюветы, 1 см
	D_f	фактор разведения
	f_c	фактор, который корректирует разницу в коэффициентах экстинкции нативных и конъюгированных IgG. Этот фактор приблизительно равен 1 при длине волны 280 нм (см. Фиг.1)
10	C (HuM195 конъюг., мг/мл)	Концентрация HuM-195 в неразведенном образце в мг/мл

[0215] Пример 3: Описание процедуры введения радиоактивной метки:

Одностадийный способ

[0216] 3.1 Область действия

15 [0217] Для того чтобы пометить ^{225}As с HUM-195 предварительно конъюгированным с ДОТУК бифункциональными хелатообразующими агентами.

[0218] 3.2 Номенклатура и определения

[0219] См. также Пример 1.

[0220] ДТПК: диэтилентриаминпентауксусная кислота.

[0221] Гентизиновая кислота: 2,5-дигидроксibenзойная кислота.

20 [0222] АК: Аскорбиновая кислота.

[0223] 3.3 Протокол введения радиоактивной метки

[0224] 3.3.1 Материалы и химические вещества

[0225] См. Таблицу 3

25	Таблица 3			
	Список химических веществ и материалов для введения метки			
30	Химическое вещество/материал	Название заказа	Спецификации/Композиция	Поставщик
	30% HCl	1.00318.1000	Высокоочищенный	VW
	NaOH, 30%	1.05589.0250	Высокоочищенный	VW
	Na ацетат	1.062640050	> 99,99%	VW
	NH ₄ ацетат	372331-109 04030KH	> 99,999%	Aldrich
	Уксусная кислота	100264	Высокоочищенный	VW
	Гентизиновая кислота	841745	> 99%	VW
	Аскорбиновая кислота для биологических применений	101566.0100	> 99%	VW
	ДОТУК-NHS-эфир	B-280		Macro cyclics, Dallas, TX
	ДОТУК-пара-SCN-Bn	B-205		Macro cyclics, Dallas, TX
40	NaCl	1.064060050	> 99,99%	VW
	HuM195		5 мг/мл	PDL/PacificGMP
	ДТПК	1083900250	> 99%	VW
	Вода, свободная от металлов	1.01262.1000	Ультраочищенный	VW

45	Одноразовая колонка для обессоливания PD-10	17-0851-01		GE Health Care Europe GmbH
	pH бумага	1.09543.0001 1.09542.0001	pH= 6,5-10 pH= 4,0-7	VW
	ПП пробирки типа Эппендорф	211-2130 211-2160	PP	VW
	Нагревающий блок	460-3249	203x315X89	VW
	ПЭ пробирки	6008117	ПЭ	Perkin Elmer GmbH
	Колонка Protein Pack 300SW	WRT080013	Колонка Protein Pack 300SW	Waters

5	Колонка Protein Pack 125 centriguard	WRT1866000926	Колонка Protein Pack 125 centriguard	Waters
	фильтры	514-7014	0,45 мкм размер пор 25 мм диаметр	VW
	ПипеткиЭппендорф	613-3646 613-3649 613-3650	0,5-10 мкл (серый наконечник) 10-100 мкл (желтый наконечник) 100-1000 мкл (синий наконечник)	VW
	Наконечники для пипеток Эппендорф	612-1158 612-1160 612-1163	0,5-10 мкл (серый наконечник) 10-100 мкл (желтый наконечник) 100-1000 мкл (синий наконечник)	VW
	MTCX SG 5X20 см	516-7805		VW
10	Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) -----		1%	Swiss Red Cross, Bern, Switz. Behring
		PZN-0504775	20%	
	Стерильные пробирки, наконечники для пипеток, пластиковые изделия			
	Пробирки 50 мл Corning			Sigma-Aldrich
	Пробирки Nunc			Sigma-Aldrich
15	10 DG гель проникающие колонки для обессоливания	732-2010	отсечение MM 6000	Biorad Inc.

[0226] 3.3.2 Подготовка химических веществ и условий для реакции

[0227] Реакционная пробирка и нагревающий блок

[0228] 3.3.2.1 Берут новую реакционную пробирку (например, пробирку типа Эппендорф вместимостью 2 мл) и промывают ее несколькими миллилитрами 0,1 М HCl, воды для инъекций H₂O и окончательно с буфером 0,5 М NaAc (0,5 М NH₄Ac).

[0229] 3.3.2.2 Калибруют нагревающий блок, используя тот же тип реакционной пробирки, как и для введения метки. Температура в жидкости (воде) внутри пробирки должна быть 37±2°C.

[0230] Подготовка Ac-225

[0231] 3.3.2.3 Квантифицируют активность ²²⁵Ac в пробирке, полученной от производителя.

[0232] 3.3.2.4 Растворяют остаток в пробирке (если образец высушенный) в 0,05 мл раствора 0,2 М HCl. Для введения радиоактивной метки, отобранная аликвота должна быть не менее чем 0,3 мл.

[0233] 3.3.2.5 Проверяют наличие нерастворимого материала. Остаток должен быть полностью растворен, а полученный раствор должен быть однородным, прозрачным и свободным от частиц и инородных материалов.

[0234] Другие химические вещества и материалы

[0235] 3.3.2.6 Для введения меток приготавливают заранее следующие растворы:

[0236] Пара-SCN-Bn-ДОТУК-mAb конъюгированный раствор белка в концентрации 5-10 мг/мл в 0,9% NaCl, как описано в разделе 2.

[0237] 0,5 М NH₄Ac (или NaAc): Берут 4,2 мл 3 М NaAc, смешивают с водой, свободной от металлов, и доводят объем до 25 мл. Перемешивают раствор, и после гомогенизации фильтруют его через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в ПЭВП контейнерах объемом 25 мл.

[0238] Раствор гентизиновой кислоты в 3 М NaAc: Взвешивают 0,033 г гентизиновой кислоты и растворяют в 1 мл 3 М NaAc. Перед использованием фильтруют раствор через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в пробирках типа Эппендорф вместимостью 2 мл в прохладном и темном месте.

[0239] 150 г/л I-AK раствор: Взвешивают 1,5 г АК и растворяют в 10 мл воды, свободной от металлов. Фильтруют раствор через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в ПЭВП контейнерах объемом

25 мл в прохладном и темном месте.

[0240] 50 мМ ДТПК раствор: Взвешивают 0,49 г ДТПК и растворяют в 25 мл воды, свободной от металлов. Фильтруют раствор через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в ПЭВП контейнерах объемом

5 25 мл.

[0241] 20 мМ ДТПК раствор: Взвешивают 0,20 г ДТПК и растворяют в 25 мл воды, свободной от металлов. Фильтруют раствор через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Хранят раствор в ПЭВП контейнерах объемом

25 мл.

10 [0242] Подготавливают следующие материалы:

[0243] PD-10 колонка

[0244] pH бумага: тонкие полоски pH бумаги с диапазоном определения уровня pH 4-10

[0245] пробирки типа Эппендорф

15 [0246] ПЭ пробирки

[0247] 0,45 мкм фильтры диаметром 25 мм из ацетата целлюлозы и стерильные шприцы для фильтрации

[0248] MTCX SG 5×20 см

[0249] 3.3.2.7 Фильтруют через 0,45 мкм 25 мм фильтры из ацетата целлюлозы нерадиоактивные растворы до введения метки.

20 [0250] 3.3.2.8 Оснащение инструментами:

[0251] Vortex или аналогичная система

[0252] ВЭЖХ с УФ детектором и ГПХ колонкой Protein Pack 300SW в качестве стационарной фазы

25 [0253] Холодильник (4-8°C) для хранения mAb и конъюгированных образцов mAb

[0254] Морозильная камера (-20°C) для хранения БФХ

[0255] Гамма-спектрометрическая система с германиевым детектором высокой чистоты. Необязательно, и в частности для оценки баланса активности, детектор должен быть также ISOCS охарактеризован компанией Canberra Industries и с программным пакетом ISOCS/LABSOCS, который работает под управлением стандартной конфигурации программного обеспечения GENIE 2000 для того, чтобы сделать

30 возможными абсолютные измерения для каждой специфической конфигурации подсчета, например, пробирки, колонки и т.д.

[0256] Радиоизотопный калибратор Squibb CRC-17 (или эквивалентная модель)

35 [0257] 3.3.3 Введение радиоактивной метки

[0258] 3.3.3.1 Берут аликвоту не более 0,3 мл 0,05 М HCl, которая содержит требуемую активность ²²⁵Ac (например, приблизительно 1 МКи на день введения метки), и капают ее пипеткой в реакционную пробирку (обновленная таблица в разделе 3.3.7.3).

40 [0259] 3.3.3.2 Необязательно, измеряют активность ²²⁵Ac в реакционной пробирке при помощи гамма-спектрометрии высокого разрешения.

[0260] 3.3.3.3 Добавляют 0,1 мл 3 М NaAc (или NH₄Ac) и смешивают аккуратно и непродолжительно с использованием системы Vortex.

[0261] 3.3.3.4 Проверяют уровень pH путем удаления 0,001 мл аликвоты и нанесения ее пятен на pH бумагу с необходимым диапазоном pH. Уровень pH должен находиться между 5 и 8,5. Не выбрасывать наконечник и pH бумагу: их собирают в небольшой полиэтиленовый пакет для оценки баланса радиоактивности.

45 [0262] 3.3.3.5 В зависимости от концентрации NuM195 в растворе конъюгата

добавляют 0,1 мл (при 10 мг/мл) или расчетный объем пара-SCN-Bn-ДОТУК-mAb конъюгированного раствора, который содержит приблизительно 1 мг mAb. Объем не должен превышать 0,2 мл.

[0263] Примечание: В контрольном эксперименте эта стадия пропускается.

5 [0264] 3.3.3.6 Добавляют 0,020 мл из свежеприготовленного насыщенного раствора гентизиновой кислоты и смешивают аккуратно и непродолжительно с использованием системы Vortex.

[0265] 3.3.3.7 Повторяют стадию 3.3.3.4. Целевой уровень pH должен находиться в диапазоне между 5,5-7,0.

10 [0266] 3.3.3.8 Если уровень pH находится выше 7,0, добавляют 0,010 мл 0,1 М HCl. Если уровень pH находится ниже 5,5, добавляют 0,025 мл 3 М NaAc.

[0267] 3.3.3.9 При необходимости повторяют стадию 3.3.3.8.

[0268] 3.3.3.10 Закрывают реакционную пробирку вместимостью 2 мл, содержащую реакционную смесь, и помещают ее в нагревающий блок (3.3.2.2) при температуре 37°C
15 на промежуток времени, равный 80-90 минут.

[0269] 3.3.4 Введение ДТПК и определение выхода реакции при помощи МТСХ

[0270] 3.3.4.1 По прошествии 90 минут реакцию останавливают и добавляют 0,010 мл 10 мМ ДТПК раствора, смешивают аккуратно и непродолжительно с использованием системы Vortex.

20 [0271] 3.3.4.2 Помещают реакционную пробирку обратно в нагревающий блок и инкубируют в течение 30 минут.

[0272] 3.3.4.3 По прошествии 20 минут выключают нагревающий блок, удаляют из реакционной смеси аликвоту 0,002 мл и наносят ее пятна на центр линии отсчета МТСХ полоски (линия, отмеченная приблизительно на расстоянии 15 мм от одной стороны).

25 Пустой наконечник помещают в емкость для отходов (см. 3.3.3.4). Соблюдают технику безопасности, работая с пробиркой, содержащей реакционную смесь.

[0273] 3.3.4.4 Помещают МТСХ в стеклянную пробирку, содержащую подвижную фазу: несколько миллилитров раствора 20 мМ ДТПК (в зависимости от размеров контейнера, используемого для МТСХ).

30 [0274] 3.3.4.5 Ожидают 7-8 минут до тех пор, пока фронт подвижной фазы достигает второй линии отсчета, отмеченной приблизительно на расстоянии 15 мм от другого конца полоски.

[0275] 3.3.4.6 Удаляют полоску из МТСХ пробирки и дают ей высохнуть. Затем нарезают полоску на небольшие части, каждую на расстоянии 15 мм.

35 [0276] 3.3.4.7 Помещают каждую часть в предварительно пронумерованные полиэтиленовые пробирки (например, для жидкого сцинтилляционного счета обычно используют ПЭ пробирки объемом 20 мл).

[0277] 3.3.4.8 Ожидают 1 час и подсчитывают активность ^{225}Ac путем измерения ^{221}Fr на гамма спектрометре высокого разрешения в каждой части хроматограммы для
40 первичной оценки (необязательно).

[0278] 3.3.4.9 Ожидают более чем 6 часов для радиоактивного равновесия между ^{225}Ac и всеми дочерними радиоактивными нуклидами и измеряют активность ^{225}Ac через ^{221}Fr и ^{213}Bi для окончательной оценки.

45 [0279] 3.3.4.10 Подсчитывают результат введения радиоактивных меток при помощи следующей формулы:

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

где

Y =	результат введения радиоактивных меток, %
A ₁ =	активность ²²⁵ Ac, измеренная в части 1 хроматограммы (пронумеровано начиная от нижней части), Вq (мкКи)

A ₂ =	активность ²²⁵ Ac, измеренная в части 2 хроматограммы, Вq (мкКи)
A _t =	сумма активности ²²⁵ Ac, измеренная во всех частях хроматограммы, Вq (мкКи)

Если образцы измеряются с использованием той же геометрической конфигурации (расстояние от источника до детектора, такие же пробирки, детектор и т.д.), то выход может быть рассчитан по следующей формуле:

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

где

Y =	радиохимический выход, %
I ₁ =	скорость счета ²²⁵ Ac, измеряется в части 1 хроматограммы (пронумерованы снизу), герц.
I ₂ =	скорость счета ²²⁵ Ac, измеряется в части 2 хроматограммы, герц.
I _t =	скорость счета ²²⁵ Ac, измеряется во всех частях хроматограммы, герц.

[0280] 3.3.5 Очистка реакционной смеси с помощью гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии с использованием колонки 10DG

[0281] 3.3.5.1 Получают следующие компоненты: 10 мл 10 DG-SE смолы; компоненты колонки, а также 3-ходовой кран для стадий очистки, которые описаны ниже.

[0282] 3.3.5.2 Наливают 10 DG смолу объемом 10 мл в пластиковую одноразовую колонку, позволяющие урегулировать и применять топ фритты. Все эти материалы получают от компании Biorad Inc., Hercules CA. Промывают упакованную смолу двумя объемами по 10 мл 0,9% NaCl. Утилизируют промывные растворы.

[0283] 3.3.5.3 Приводят смолу в равновесие с помощью двух объемов 10 мл 1% ЧСА. Утилизируют промывные растворы.

[0284] 3.3.5.4 Определяют массу тары, новых стерильных пробирок Corning объемом 50 мл для сбора лекарственного продукта, и вносят всю конструкцию реакционной смеси (см. 3.3.4) в колонку, и собирают элюент в сливную пробирку.

[0285] 3.3.5.5 Промывают конструкцию реакционной пробирки с 0,20 мл 1% ЧСА и добавляют эти промывные растворы в колонку и снова собирают элюат в сливную пробирку. Добавляют 2,0 мл 1% ЧСА в качестве подвижной фазы и снова собирают элюат в сливную пробирку. Добавляют 2 мл 1% ЧСА в гель проникающую колонку и собирают конечный продукт.

[0286] 3.3.5.5 Взвешивают собранный лекарственный продукт и регистрируют массу раствора, содержащего продукт.

[0287] 3.3.5.6 Предположим, что 80% из 1,0 мг антител было восстановлено с помощью схемы очищения. Рассчитывают удельную активность продукта путем деления активности на общее количество восстановленного HuM195 (0,8 мг). Уровень активности продукта может быть определен после 6-часового периода, следующего за очисткой. Это время необходимо для секулярного равновесия Ac-225, которое будет установлено и измерено в калибраторе дозы или эквивалентном, чтобы определить выход продукта и уровень активности

[0288] 3.3.6 Необязательно: Очистка реакционной смеси с помощью гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии, используя колонку PD-10

[0289] Это является альтернативой процедуре, описанной в разделе 3.3.5.

[0290] 3.3.6.1 Кондиционируют PD-10 смолу в 0,9% растворе NaCl, пропуская через колонку 5 мл 0,9% NaCl. Отбросы удаляют.

[0291] 3.3.6.2 Вносят всю конструкцию реакционной смеси (раздел 3.3.4.3) в резервуар

колонки и собирают элюат (f1) в пробирки типа Эппендорф или ПЭ пробирки.

[0292] 3.3.6.3 Промывают реакционную пробирку с 0,5 мл 0,9% раствора NaCl и вливают промывные растворы в резервуар PD-10 колонки. Помещают пустую реакционную пробирку в небольшой ПЭ мешок для отходов с целью оценки баланса активности (см. 3.3.3.4)

[0293] 3.3.6.4 Собирают элюат отдельно в пробирки типа Эппендорф или ПЭ пробирки.

[0294] 3.3.6.5 Повторяют стадии 3.3.6.3-3.3.6.4 дважды и собирают указанные элюаты вместе (fw).

[0295] 3.3.6.6 Продолжают внесение 0,5 мл 0,9% раствора NaCl в резервуар PD-10 колонки до тех пор, пока не достигается общий объем элюирования, составляющий 6 мл. Собирают элюаты по 4 мл вместе. Эти фракции должны содержать большую часть меченого конъюгата (fr).

[0296] 3.3.6.7 Промывают колонку с дополнительными 8 мл 0,9% раствора NaCl.

[0297] 3.3.6.8 Собирают элюат отдельно в новый контейнер. Это фракция, которая содержит As-225, свободный или связанный с ДТПК (ff).

[0297] 3.3.6.8 Ожидают один (1) час и подсчитывают активность ^{225}As при помощи измерения ^{221}Fr на гамма-спектрометре высокого разрешения в каждой пробирке для первой оценки (необязательно).

[0298] 3.3.6.9 Ожидают более 6 часов для радиоактивного равновесия между ^{225}As и всеми дочерними радиоактивными нуклидами и измеряют активность ^{225}As через ^{221}Fr и ^{213}Bi для окончательной оценки.

[0299] 3.3.6.10 Если требуется концентрация, переносят фракцию f_r (4 мл) в новое центрифужное устройство YM-10 Millipore с отсечением для молекулярной массы 10000 ММ (могут быть использованы YM пробирки с мембранами с более высоким уровнем отсечения с соответствующим увеличением времени вращения). В противном случае переходят непосредственно к разделу 3.3.5.5.

[0300] 3.3.6.11 Центрифугируют конъюгированный объединенный раствор при скорости вращения 6500 об./мин и температуре 4°C до тех пор, пока объем раствора не будет равен приблизительно 1 мл.

[0301] 3.3.6.12 Добавляют 1 моль 0,9% NaCl и повторяют стадию 3.3.6.11.

[0302] 3.3.6.13 Определяют массу тары, новых стерильных пробирок Corning объемом 50 мл для сбора продукта.

[0303] 3.3.6.14 Переносят продукт в новую стерильную пробирку Corning объемом 50 мл.

[0304] 3.3.6.15 Промывают пустую YM-10 пробирку до 1 мл 1% ЧСА и переносят промывные растворы в пробирку, содержащую продукт.

[0305] 3.3.6.16 Продолжают, как указано в разделе 3.3.5.5.

[0306] 3.3.7 Необязательно: Оценка баланса активности

[0307] 3.3.7.1 Измеряют PD-10 колонку на гамма-спектрометре высокого разрешения, чтобы количественно определить активность ^{225}As , которая осталась на колонке.

[0308] 3.3.7.2 Измеряют пакет, содержащий пустые реакционные пробирки, наконечники и pH бумагу, используемые для контроля качества в процессе эксперимента введения метки.

[0309] 3.3.7.3 Резюмируют результаты в приведенной ниже таблице

Таблица 4		
Компартмент	Активность ^{225}Ac , мКи	% активности
Начальная активность Ac-225		
В очищенной/концентрированной фракции, связанной с mAb		Восстановление
В других жидких фракциях, не связанных с mAb		
Оставшийся на колонке PD-10		
Оставшийся на реакционных пробирках, наконечниках и pH бумаге, используемой для КК, тканях и т.д.		

[0310] 3.4 Контроль качества радиоактивно меченного конъюгата

[0311] 3.4.1 Внешний вид/Визуальный тест:

[0312] 3.4.1.1 Осматривают продукт с использованием белого и черного фона для определения прозрачности, цвета и отсутствия посторонних веществ.

[0313] 3.4.2 Идентификация радионуклида

[0314] 3.4.2.1 Собирают гамма-спектр на калиброванный гамма-спектрометр. См. на Фиг. 9 в качестве примера.

[0315] 3.4.2.2 Используя стандартные библиотеки нуклидов (см. Таблицу 1), ищут наличие основных пиков при 218 кэВ от Fr-221 и 441 кэВ от Bi-213. Ищут также для подтверждения пики Ac-225 и Tl-209.

Таблица 1

Библиотека нуклидов*: Ac-225 и дочерние радиоактивные нуклиды
 На фото: Лабораторный отчет перечень 26.03.2009 15:22:20 Страница 1

5

 ***** ЛАБОРАТОРНЫЙ ОТЧЕТ-ПЕРЕЧЕНЬ *****

Название файла: C:\GENIE2K\CAMFILES\Ac.NLB

Описание нуклидной лаборатории:

10

Название нуклида	Период полувыведения (секунды)	Энергия (кэВ)	Энергия сомнит.(кэВ)	Выход (%)	Выход сомнит. (абс. +/-)
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
BI-213	8.640E+005	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
FR-221	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
AC-225	8.640E+005	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
AC-225	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
AC-225	8.640E+005	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	0.030	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
AC-225	8.640E+005	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
AC-225	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

40

*Nuclide Library Editor. Genie 2000, Canberra Industries.

[0316] 3.4.3 Радиохимическая чистота при помощи МТСХ

[0317] 3.4.3.1 Описывается выше в разделе 3.3.4

[0318] 3.4.4 Радиохимическая чистота при помощи гель-проникающей ВЭЖХ

45

[0319] 3.4.4.1 Берут аликвоту из конструкции так, чтобы скорости счета в пике были значительно выше фона детектора радиоактивности.

[0320] 3.4.4.2 Пропускают образец через ГП-ВЭЖХ с использованием тех же условий, как в калибровочных экспериментах: 0,9% NaCl, скорость 1 мл/мин и т.д.

[0321] 3.4.4.3 Сравнивают и рассчитывают активность, ассоциированную с конъюгатом, в сравнении с суммарной активностью, обнаруженной детектором. В качестве иллюстрации см. Фиг.6.

[0322] 3.4.4.4 Рассчитывают радиохимическую чистоту конъюгата "Rc", используя

$$R_c(\%) = (I_c) * 100\% / I_t,$$

где

R_c = радиохимическая чистота меченого конъюгата, %

I_c = площадь, измеренная под пиком конъюгации на ГП-ВЭЖХ/рад. хроматограмме (Фиг.6).

I_t = общая площадь, измеренная на ГП-ВЭЖХ/рад. хроматограмме (Фиг.6)

Рассчитывают процентное содержание Ас-225, ассоциированного с агрегатами с высокой молекулярной массой, используя следующую формулу:

$$A_H(\%) = (I_h) * 100\% / I_t,$$

где

A_H = процентное содержание Ас-225, ассоциированного с агрегатами с высокой молекулярной массой, %

I_h = площадь, измеренная на левой стороне пика конъюгата на ГП-ВЭЖХ/хроматограмме радиоактивности.

Рассчитывают процентное содержание Ас-225, ассоциированного с агрегатами с низкой молекулярной массой, используя следующую формулу:

$$A_L(\%) = (I_l) * 100\% / I_t,$$

где

A_L = процентное содержание Ас-225, ассоциированного с агрегатами с низкой молекулярной массой, %

I_t = площадь, измеренная на правой стороне пика конъюгата до тех пор, пока начало пика соответствует свободному Ас-225, Фиг. 6

[0323] 3.4.5 Иммунореактивность

[0324] 3.4.5.1 Иммунореактивность ²²⁵Ас-HUM 195 определяют путем инкубации приблизительно 2 нг радиоактивно меченных антител в 0,030 мл общего объема с 500-1000-кратным избытком антигена (приблизительно 10×10⁶ CD33-позитивных клеток AL67).

[0325] Эти клетки экспрессируют приблизительно 400000 CD33-позитивных сайтов связывания на клетку и находятся в антиген избытке к добавленному HUM-195. После 30 минут инкубации при температуре 0°C клетки собирают при помощи центрифугирования, а супернатант удаляют, клетки один раз промывают фосфатным солевым буфером (ФСБ) и эти промывные растворы удаляют. Осадок клеток, супернатант и промывные растворы измеряют на радиоактивность с помощью сцинтилляционного счета. Процент иммунореактивности рассчитывают как равный {(²²⁵Ас-HuM195 связанный с клетками)/(общая активность связанная и несвязанная (супернатант и промывные растворы))}, умноженный на 100.

[0326] 3.4.6 Активность Ас-225 в пробирке

[0327] 3.4.6.1 Ожидают более 6 часов для радиоактивного равновесия между ²²⁵Ас и всеми дочерними радиоактивными нуклидами и для окончательной оценки измеряют активность ²²⁵Ас через ²²¹Fr и ²¹³Bi.

[0328] 3.4.7 Общий объем конструкции

[0329] 3.4.7.1 Общий объем продукта измеряют гравиметрически.

[0330] 3.4.8 Расчет активности концентрации Ас-225

[0331] 3.4.8.1 Рассчитывают активность концентрации (мКи/мл) путем деления активности, полученной в разделе 3.4.6.1 на объем, полученный в разделе 3.4.7.1

[0332] 3.4.9 Расчет специфической активности

[0333] 3.4.9.1 Следуют указаниям раздела 3.3.5.5

[0334] 3.4.10 Необязательно: Определение белка при помощи УФ-спектрофотометрии и расчет специфической активности

[0335] Этот способ следует использовать только в том случае, если в очищенной белковой фракции не присутствует ЧСА (см. Фиг.1, 2)

[0336] 3.4.10.1 Из объединенной белковой фракции "fp" (раздел 3.3.6.6) берут аликвоту 0,02 мл и доводят объем до 0,5 мл ($D_f=25$) с 0,9% NaCl. Фактор разведения D_f , равный 25, рекомендуется тогда, когда для введения метки используют 1 мг конъюгата.

[0337] 3.4.10.2 Измеряют концентрацию белка (срi) в объединенном и концентрированном образце, как описано в разделе 2.3.7 или 2.3.9.

[0338] Пример 4

[0339]		Таблица 5	
Сравнение производственных процедур для получения Линтузумаб - Ас225, "одностадийный" процесс в сравнении с существующим процессом			
Тест	Спецификация	"Одностадийный" процесс	Существующий процесс
Выход	н/д	84±17,9%	7,7±2,05%
МТСХ	≥95% Линтузумаб -Ас225	Проходит	[0340] Проходит
ВЭЖХ	≥90% НуМ195	Проходит	[0341] Проходит
	≤5% агрегаты с высокой ММ	Проходит	[0342] Проходит
	≤10% агрегаты с низкой ММ	Проходит	[0343] Проходит
Иммунореактивность	≥60% активности	Проходит	Проходит

[0345] МАТЕРИАЛЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ПРИ ЭКСПЕРТИЗЕ ЗАЯВКИ

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.

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.

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.

D.R. Beckford, A. Xiques, R. Leyva, M. Perez-Malo; E. Casanova, M. Barrabi (2007) Nuevo radioimmunoconjugado ^{90}Y -DOTA-HR3 Sintesis y radiomarcaje. Nucleus 2007, 41, 3-8.

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-гидрохисулфосиссинимидил DOTA. Bioconjugate Chem. 12, 320-324.

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.

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.

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

Amicon Centricon Centrifugal Filter Devices. Data sheet Millipore.

- 5 [Ac-225]-DOTA-Hum195 Manufacturing Protocol (Two step labelling procedure), MSKCC.
Labelling of Hum-195/DOTA conjugates with Ac-225 using the one step method, TUM report, February 2009.

(57) Формула изобретения

- 10 1. Способ получения радиоконъюгата актиния-225 (Ac-225), включающий стадии:
(а) конъюгирования хелатообразующего агента с биологической молекулой в конъюгирующей реакционной смеси для получения конъюгированной биологической молекулы, где конъюгирующая реакционная смесь содержит буфер и имеет pH от 8,0 до 9,2;
15 (б) очистки реакционной смеси для удаления неконъюгированных хелатообразующих агентов и
(с) хелатирования одного или нескольких Ac-225 радионуклидов с конъюгированной биологической молекулой в хелатообразующей реакционной смеси при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ для получения Ac-225 радиоконъюгата, где хелатообразующая реакционная
20 смесь содержит кислоту и имеет pH от 5,5 до 7,0; и
где биологическая молекула представляет собой HuM195;
где хелатирующий агент представляет собой p-SCN-Bn-DOTA;
где радиоактивность Ac-225 составляет $1 \pm 0,2$ мКи и содержание HuM195 составляет $1 \pm 0,2$ мг; и
25 где выход радиоиммуноконъюгата Ac-225 составляет по меньшей мере 80%.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что конъюгирование на стадии (а) включает инкубацию конъюгирующей реакционной смеси в течение 1,5 часов при температуре 37°C .
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что конъюгирование на стадии (а) включает
30 инкубацию конъюгирующей реакционной смеси в течение 24 часов при температуре от 16 до 20°C .
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что очистка включает фильтрацию конъюгирующей реакционной смеси через фильтр таким образом, чтобы очистить конъюгированную биологическую молекулу.
- 35 5. Способ по п.1, отличающийся тем, что конъюгирующая реакционная смесь содержит бикарбонатный буфер.
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что конъюгирующая реакционная смесь содержит фосфатный буфер.
7. Способ по п.4, отличающийся тем, что фильтрация выполняется в ГЭПЭС (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота) буфере.
40 8. Способ по п.4, отличающийся тем, что фильтрация выполняется в NaAc буфере.
9. Способ по п.4, отличающийся тем, что фильтрация включает отсечение молекулярной массы, по меньшей мере равной 10000 Да, по меньшей мере 20000 Да, или по меньшей мере 40000 Да.
- 45 10. Способ по п.1, отличающийся тем, что кислота в хелатообразующей реакционной смеси представляет собой гентизиновую кислоту или аскорбиновую кислоту.
11. Способ по п.1, отличающийся тем, что хелатирование на стадии (с) включает инкубирование одного или более радионуклидов Ac-225 с конъюгированной

биологической молекулой в течение 1,5 часов при температуре, равной 37°C.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает стадию добавления терминирующего хелатора к хелатообразующей реакционной смеси.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что терминирующий хелатор представляет собой диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТПК).

14. Способ по п.12, отличающийся тем, что дополнительно включает стадию инкубирования хелатообразующей реакционной смеси в течение 30 минут при температуре, равной 37°C, следующую за стадией добавления терминирующего хелатора.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что радиоконъюгат является радиоиммуноконъюгатом.

16. Способ получения [Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 радиоиммуноконъюгата, включающий стадии

(a) конъюгирования p-SCN-Bn-DOTA с антителом HuM195 в конъюгирующей реакционной смеси, содержащей бикарбонатный буфер и имеющей уровень pH, равный от 8,0 до 9,2, в течение 1,5 часов при температуре 37°C для получения p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 иммуноконъюгата,

(b) фильтрации конъюгирующей реакционной смеси через фильтр, имеющий отсечение молекулярной массы по меньшей мере 10000 Да, по меньшей мере 20000 Да, или по меньшей мере 40000 Да таким образом, чтобы очистить p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 иммуноконъюгат, где фильтрация осуществляется с помощью ГЭПЭС (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота) буфера или NaAc буфера,

(c) хелатирования одного или нескольких радионуклидов актиния-225 с иммуноконъюгатом p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 в хелатообразующей реакционной смеси, включающей гентизиновую кислоту и имеющую уровень pH, равный от 5,5 до 7,0, в течение 1,5 часов при температуре 37°C для получения [Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 радиоиммуноконъюгата,

(d) добавления ДТПК (диэтилентриаминпентауксусной кислоты) к хелатообразующей реакционной смеси и

(e) инкубации хелатообразующей реакционной смеси в течение 30 минут при температуре 37°C;

где радиоактивность Ac-225 составляет $1 \pm 0,2$ мКи и содержание HuM195 составляет $1 \pm 0,2$ мг; и

где выход радиоиммуноконъюгата Ac-225 составляет по меньшей мере 80%.

17. Способ по п.1 или 16, отличающийся тем, что дополнительно включает стадию гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии через эксклюзионную смолу перед фильтрацией стадии (b).

18. Способ по п.16, отличающийся тем, что эксклюзионная смола имеет ограничение размера эксклюзии, равное 5000 Да.

19. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает очистку радиоконъюгата путем гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии через эксклюзионную смолу.

20. Способ по п.16, отличающийся тем, что дополнительно включает очистку [Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 радиоиммуноконъюгата путем гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии через эксклюзионную смолу.

21. Способ по п.19 или 20, отличающийся тем, что эксклюзионная смола имеет ограничение размера эксклюзии, равное 6000 Да.

22. Способ по п.19 или 20, отличающийся тем, что эксклюзионная смола имеет ограничение размера эксклюзии, равное 5000 Да.

23. Радиоиммуноконъюгат Ac-225, полученный согласно способу по п.1 или 16.

5

10

15

20

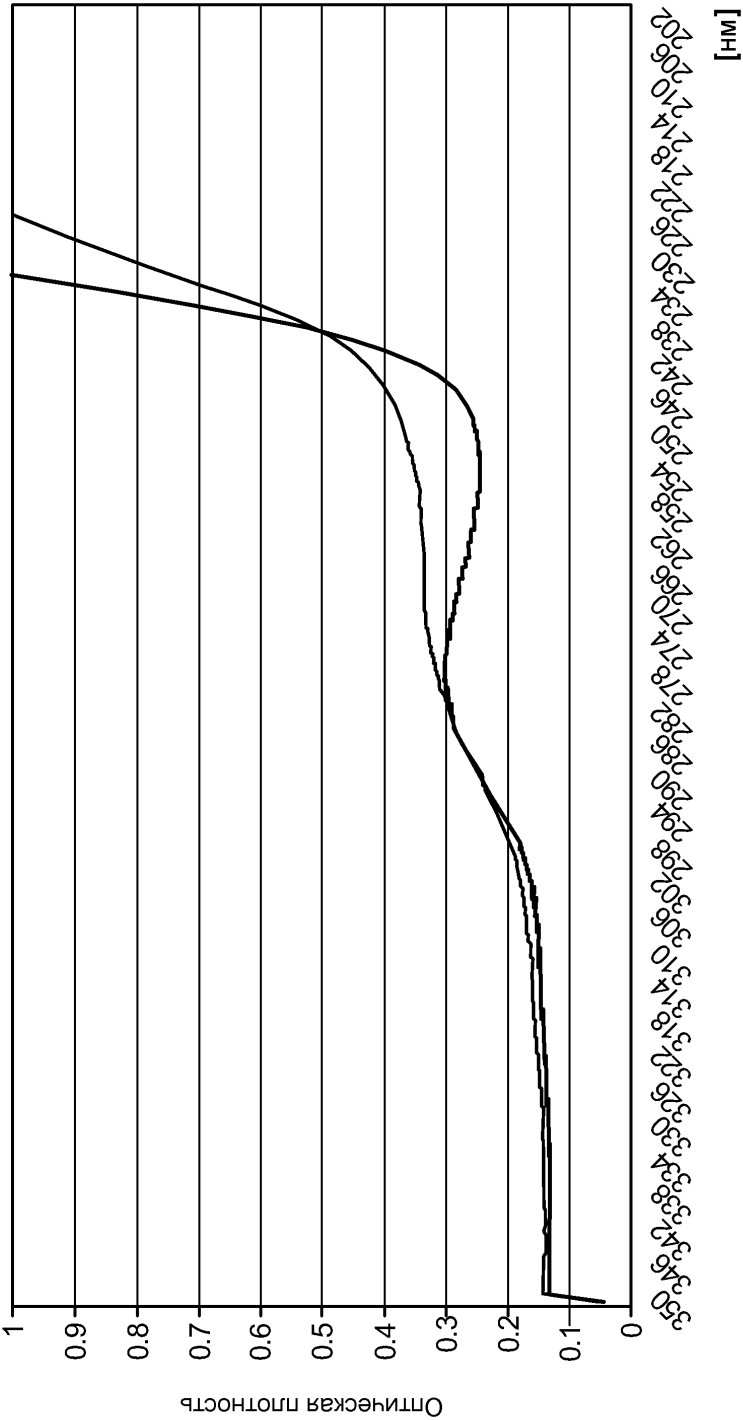
25

30

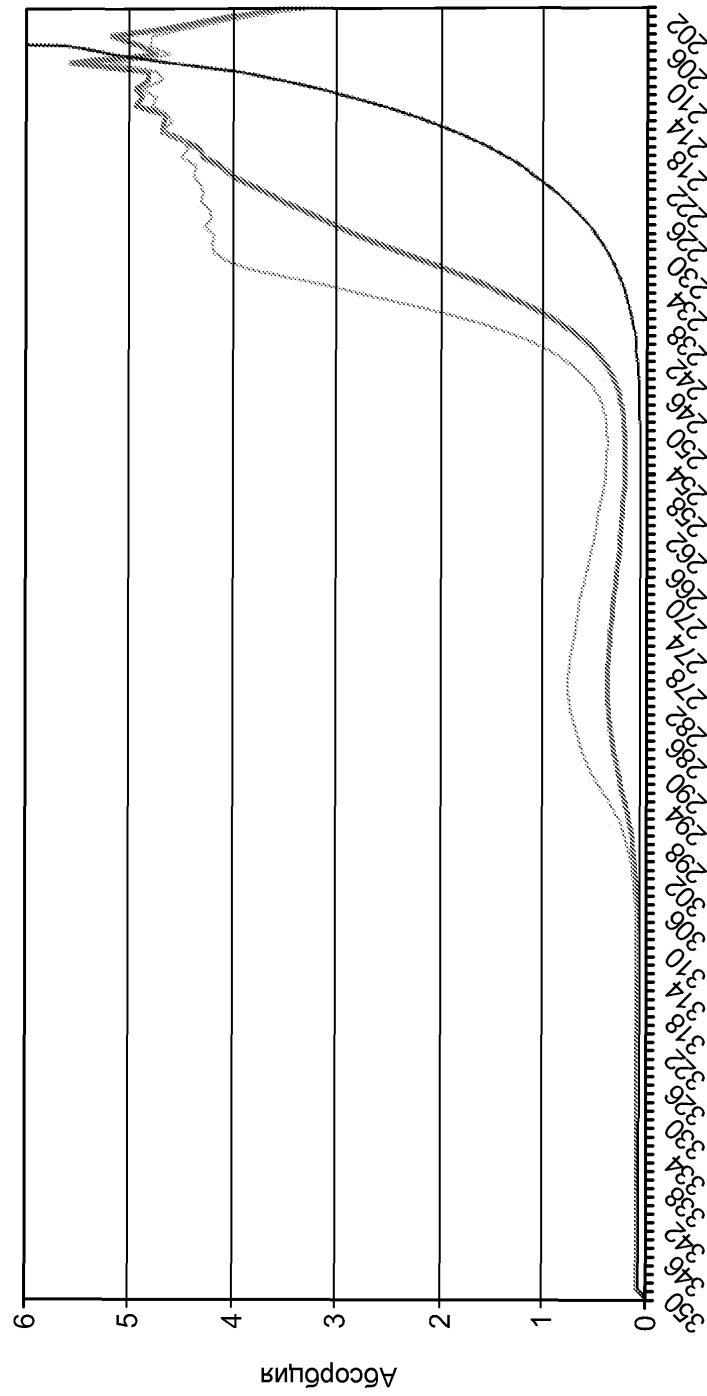
35

40

45



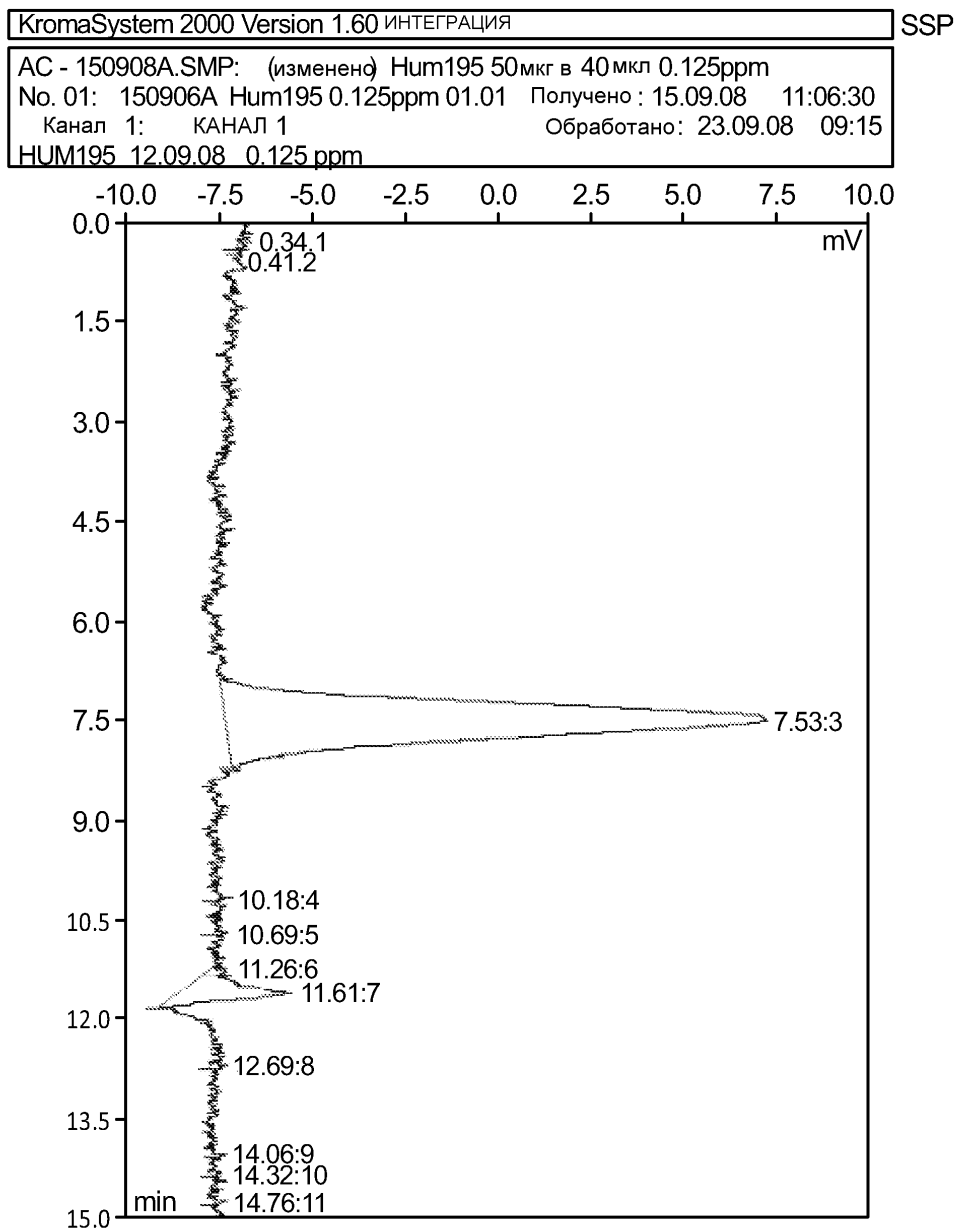
Фиг. 1А



Длина волны [нм]

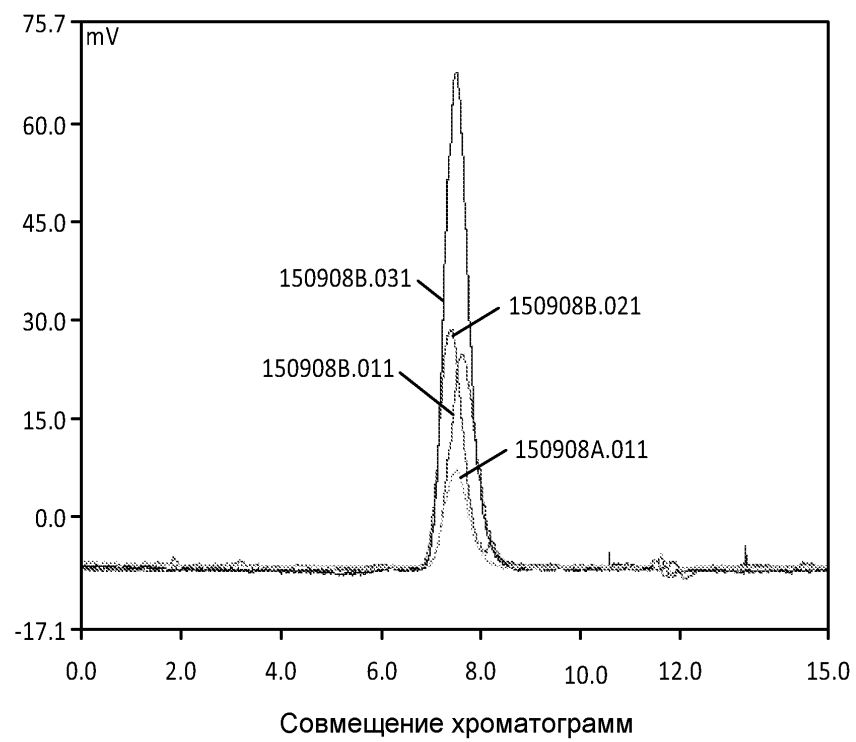
Фиг. 1В

3/15



Фиг. 2

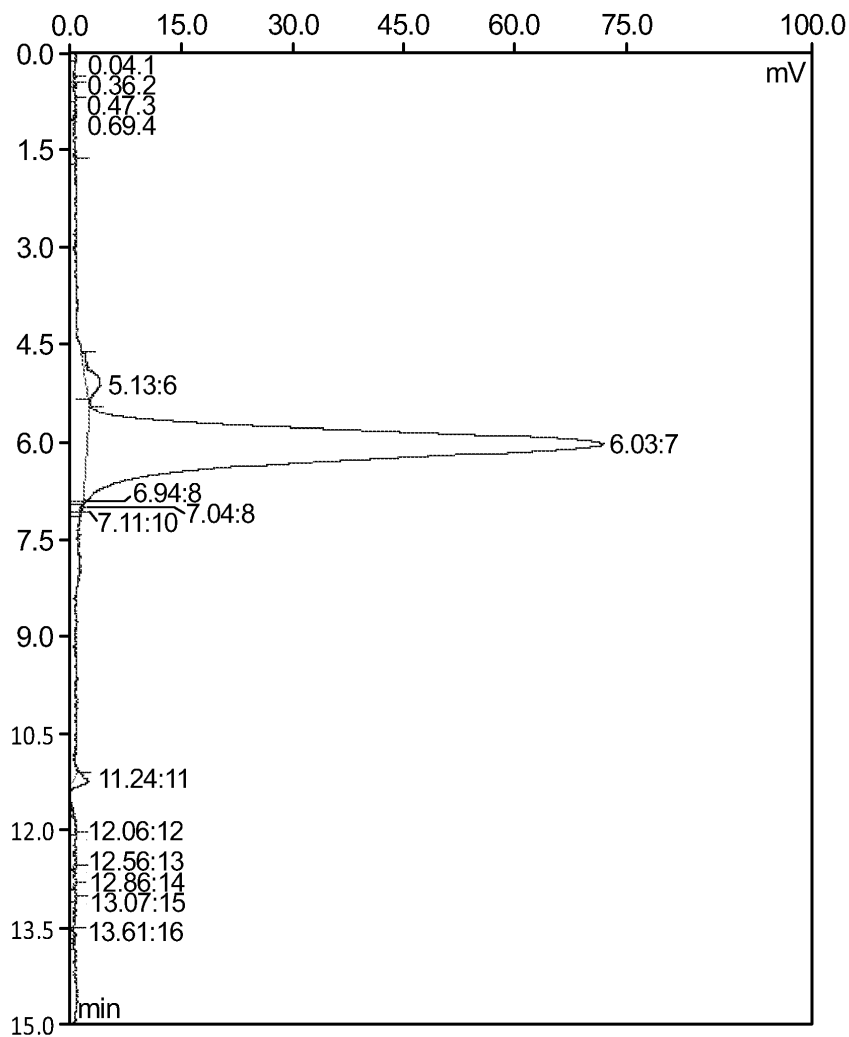
4/15



Фиг. 3

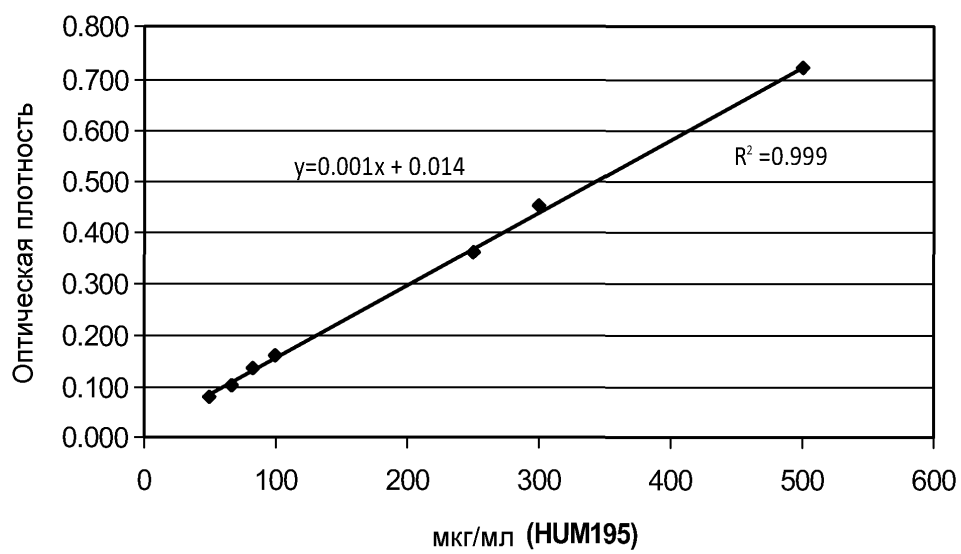
5/15

KromaSystem 2000 Version 1.60 ИНТЕГРАЦИЯ			SSP
AC - 120908B.SMP:			
No. 01: 120908B 01.01		Получено : 12.09.08	15:14:35
Канал 1:	КАНАЛ 1	Обработано : 23.09.08	09:08
C3-P2-6			



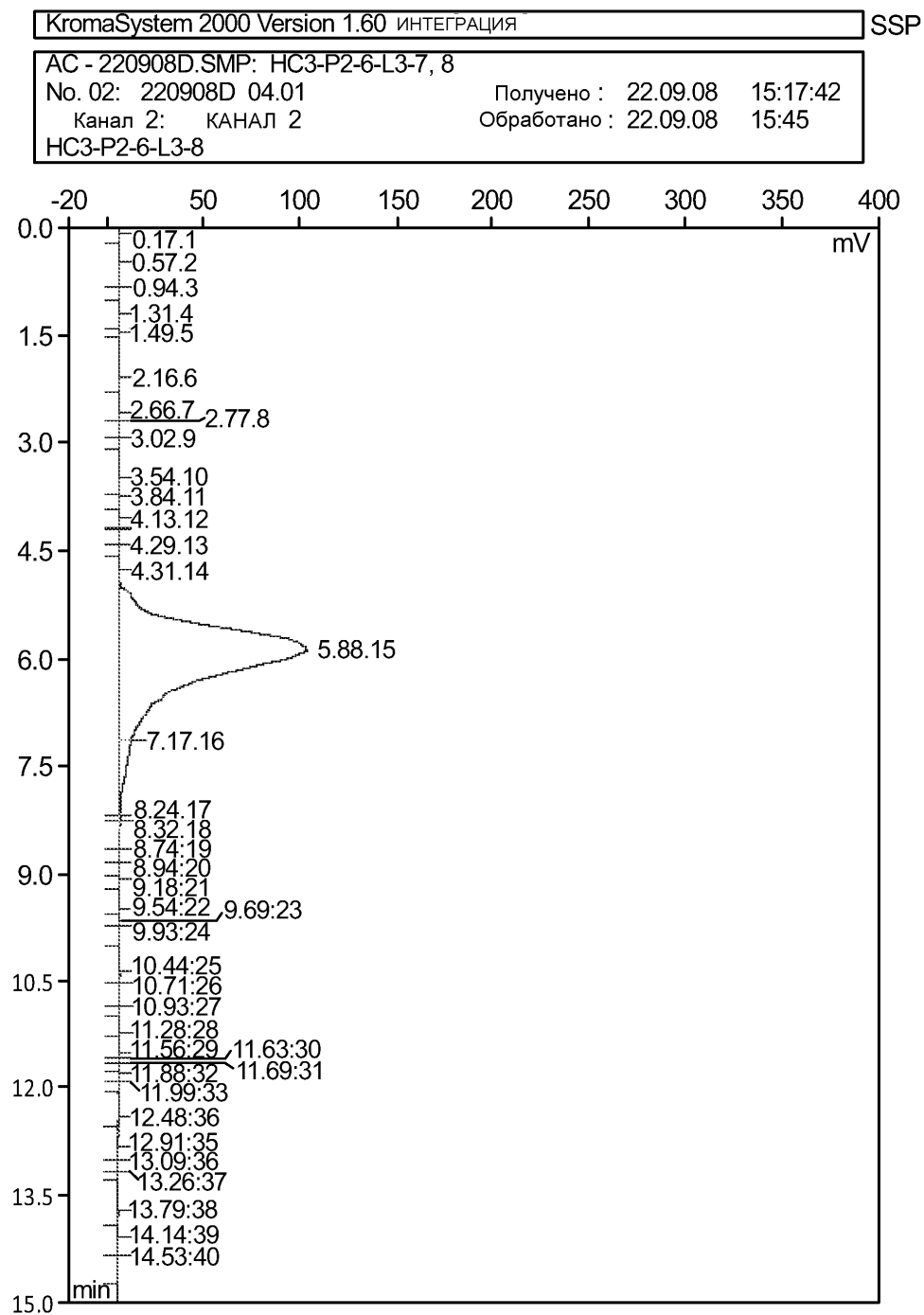
Фиг. 4

6/15



Фиг. 5

7/15



Фиг. 6

8/15

KromaSystem 2000 Version 1.60 ИНТЕГРАЦИЯ

SSP

AC - 220908G.SMP: HC3-P2-6-L3-14 Df1

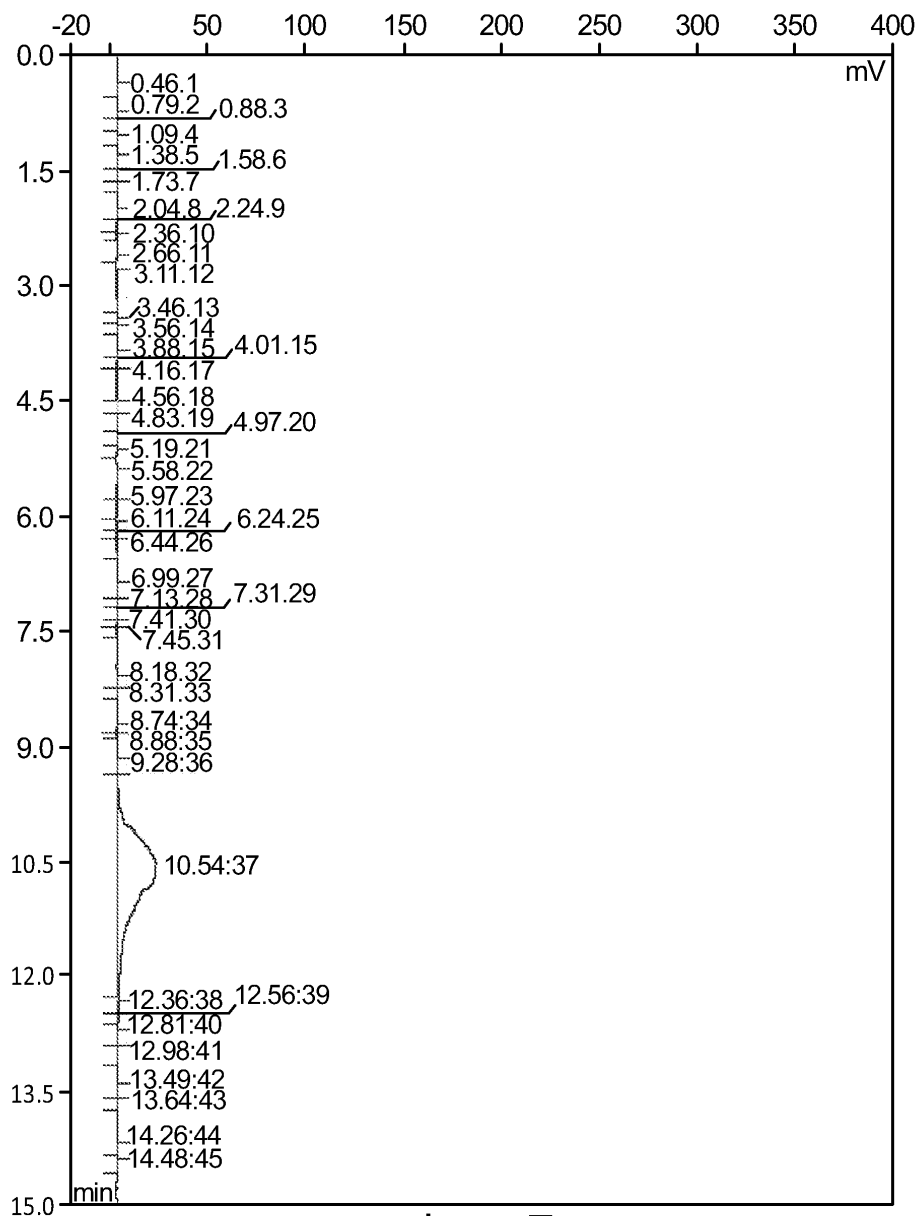
No. 01: 220908G 08.01

Получено : 22.09.08 17:03:22

Канал 2: КАНАЛ 2

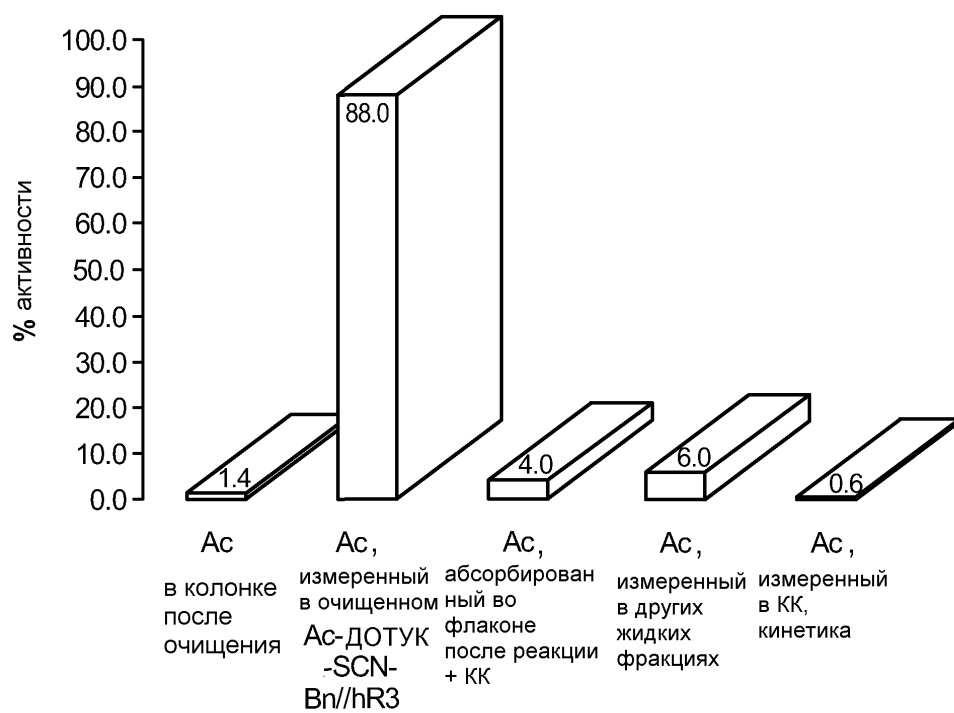
Обработано : 22.09.08 17:31

HC3-P2-6-L3-14 Df1



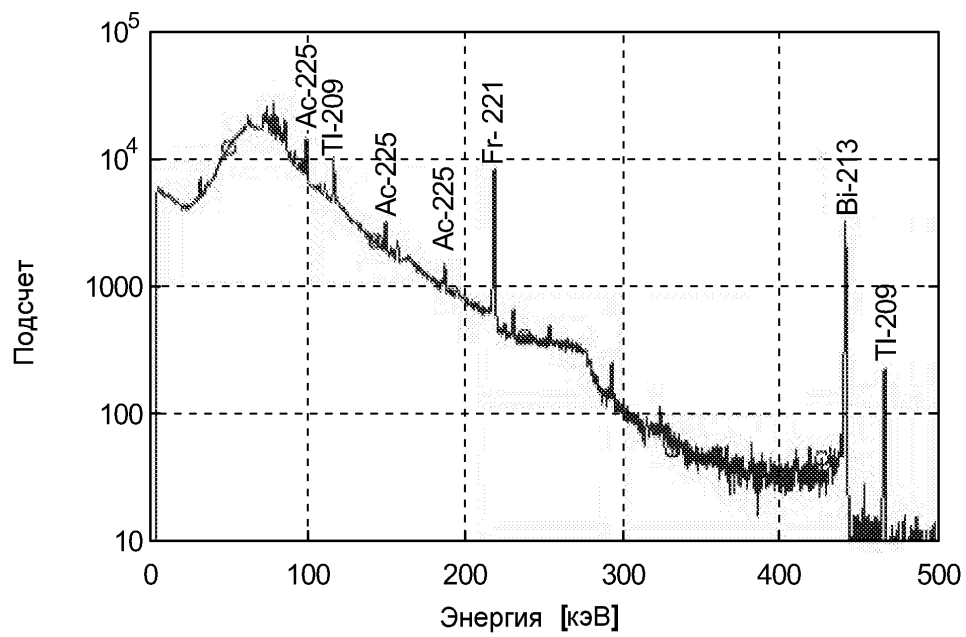
Фиг. 7

9/15

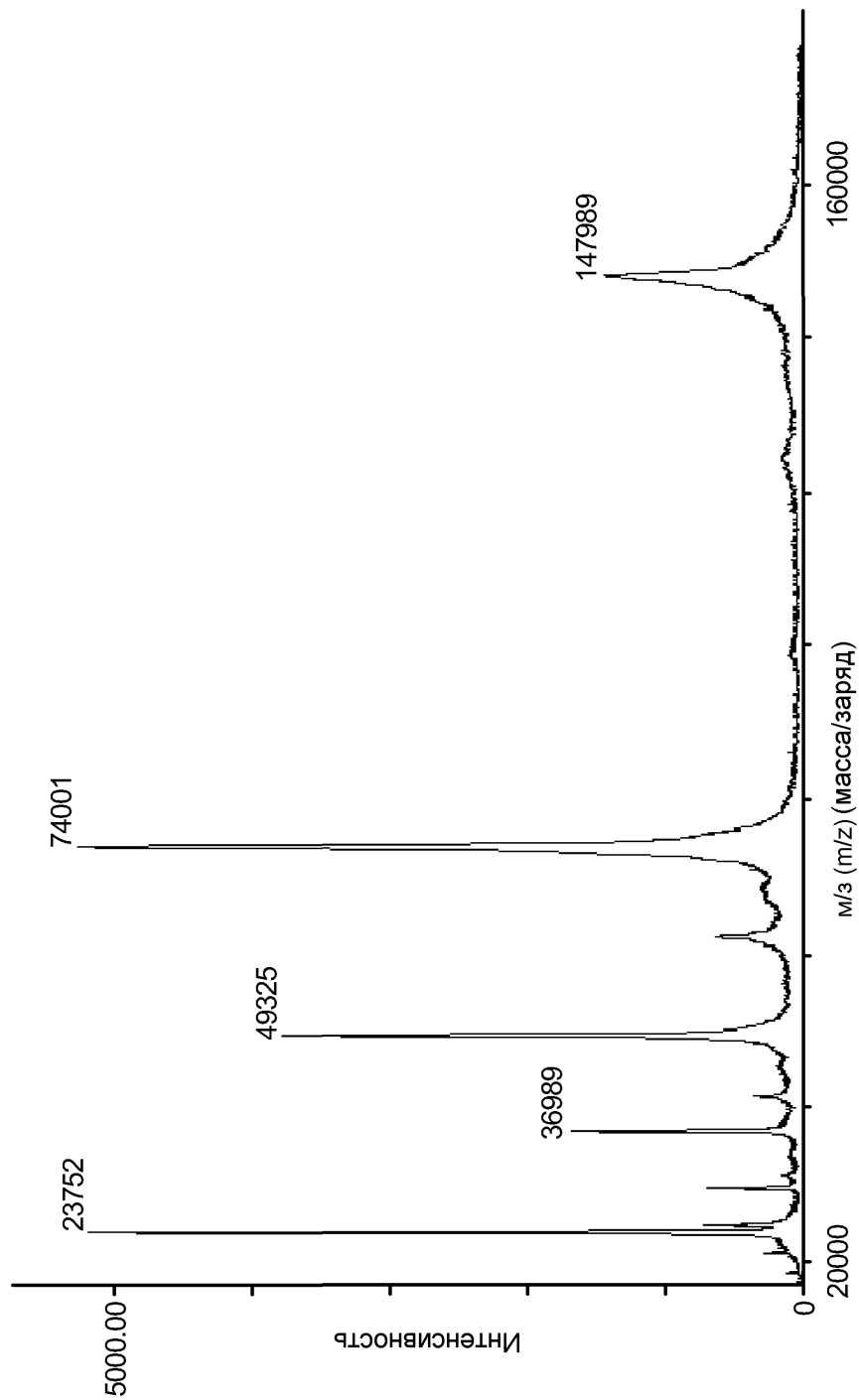


Фиг. 8

10/15

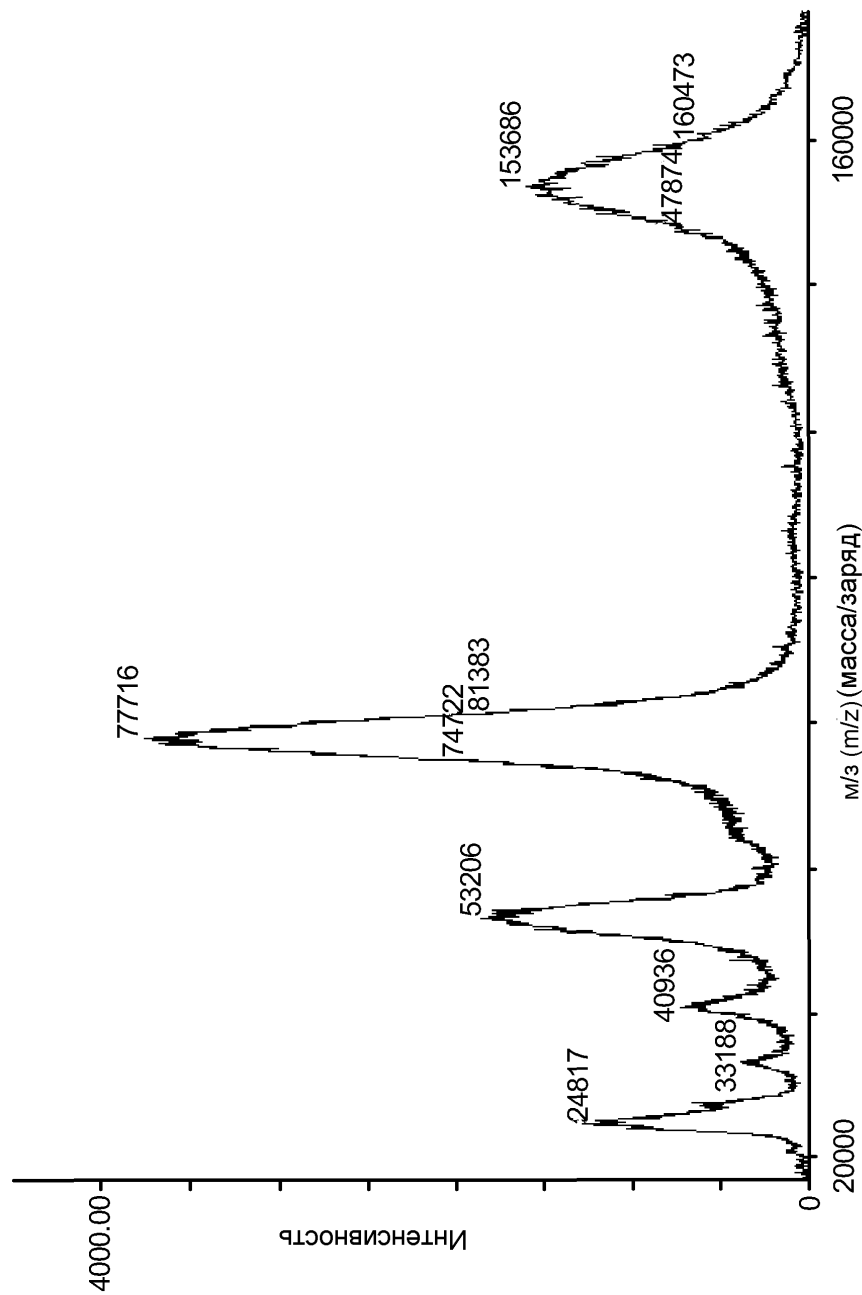


Фиг. 9



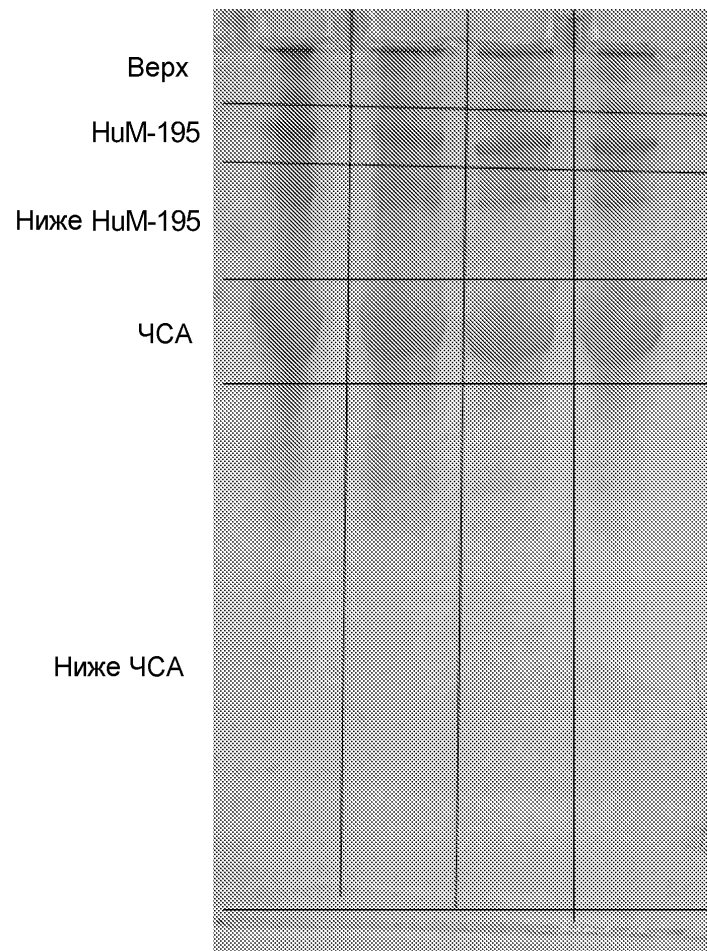
Фиг. 10

12/15



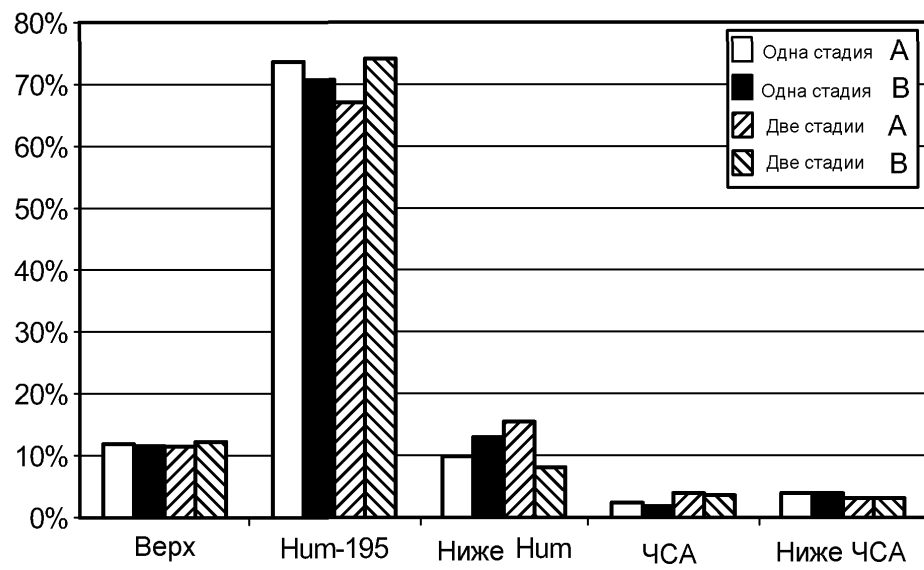
Фиг. 11

13/15



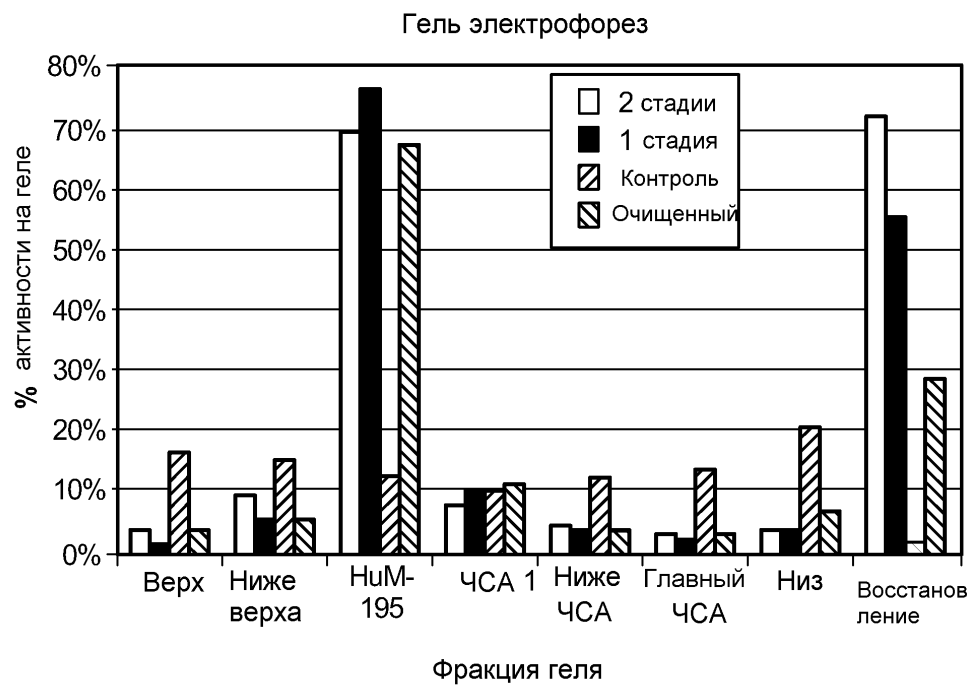
Фиг. 12

14/15



Фиг. 13

15/15



Фиг. 14