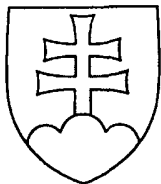


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **1217-2001**
(22) Dátum podania prihlášky: **29. 2. 2000**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **6. 5. 2011**
Vestník ÚPV SR č.: **5/2011**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **09/259 338**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **1. 3. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **9. 5. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **05/2002**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **11. 4. 2011**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US00/05078**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/52031**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(11) Číslo dokumentu:

287650

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2011.01):

A61K 51/00

(73) Majiteľ: **IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, San Diego, CA, US;**

(72) Pôvodca: **Chinn Paul, Vista, Ca, US;**

(74) Zástupca: **Tomeš Pavol, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob rádioizotopového značenia chelatačným činidlom konjugovaného proteínu alebo peptidu s ⁹⁰Y**

(57) Anotácia:

Je opísaný spôsob rádioizotopového značenia chelatačným činidlom konjugovaného proteínu alebo peptidu s ⁹⁰Y, kde ⁹⁰Y označený proteín alebo peptid má úroveň rádiozačlenenia vyššiu ako 95 %, špecifickú aktivitu väčšiu ako 5 mCi/mg a väzbovú špecifickosť aspoň 50 % a je vhodný na podávanie pacientovi bez ďalšieho čistenia.

SK 287650 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka súprav (kitov) na rádioizotopové značenie proteínov a peptidov terapeutickými rádioizotopmi tak, že značené proteíny môžu byť podávané priamo pacientom bez potreby dodatočného čistenia a spôsobov na uskutočňovanie takéhoto značenia. Takého súpravy a spôsoby sú zvlášť použiteľné na značenie proteínov a peptidov ytriom-90 (^{90}Y). Optimalizácia rádioizotopového značenia tak, že nie je potrebné dodatočné čistenie značených proteínov, uspokojuje dlho pocítovanú potrebu riešenia pretrvávajúceho problému, ako jednoducho pripravovať a podávať ytriom značené drogy pacientom v nemocniciach a mimo nemocnice.

Doterajší stav techniky

Všetky publikácie a prihlášky vynálezov sú tu uvedené ako odkazy v rovnakom rozsahu, ako keby každá jednotlivá publikácia alebo prihláška vynálezu bola špecificky alebo individuálne označená ako odkaz.

Značené proteíny, predovšetkým protilátky sa rad rokov považujú za potenciálne diagnostické a terapeutické reakčné činidlá. Takéto reakčné činidlá sú zvlášť užitočné ako rakovinové terapeutiká, pretože sa na základe výskumov začínajú identifikovať nádorovo špecifické antigény a rozoznávajú ligandy alebo protilátky, ktoré sa viažu k takýmto antigénom. Podávanie značeného ligandu alebo protilátky, ktorá sa špecificky viaže na antigén špecifický pre nádor, kopulovaných s rádioizotopom, ktorý má krátky rozsah, vysokú energiu a veľkú emisiu častíc, ponúka možnosť dodávania letálnej dávky radiácie priamo na nádorovú bunku.

V závislosti od rozsahu častíc príslušného izotopu, môže byť značenie vyberané na základe ich stálosti na zacielenie na príslušný typ buniek. Napríklad gama-žiariče sú zvyčajne používané na diagnostické účely, napríklad na zviditeľnenie nádoru, všeobecne však nie sú účinné ako zabíjacie činidlá. Na rozdiel od toho alfa- a beta-žiariče môžu byť použité na zabíjanie buniek. Alfa-žiariče môžu byť zvlášť užitočné na krvné choroby alebo cievne nádory, kde môžu dosiahnuť dobré prenikanie: aj keď v niektorých prípadoch môže stačiť jedna emisia častíc na zabitie buniek, musí byť alfa-žiarič umiestnený priamo na povrchu buniek. Na rozdiel od toho sú beta-žiariče, napríklad ^{90}Y špeciálne vhodné ako celkové zabíjače viac lokalizovaných chorôb, pretože majú spravidla dlhší rozsah žiarenia.

Ytriom značené protilátky a peptidy ukázali predovšetkým povzbudivé výsledky v protokoloch klinickej terapie (Thomas a kol., Gamma-interferon administration after ^{90}Y radiolabeled antibody therapy: survival and hematopoietic studies, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 31: str. 529 až 534, 1995; DeNardo a kol. Yttrium-90/Indium-111 DOTA peptide chimeric L6: pharmacokinetics, dosimetry and initial therapeutic studies in patients with breast cancer, J. Nucl. Med. 36, str. 97P, 1995). Takéto konjugáty sa zvyčajne používajú napojením bifunkčného chelatačného činidla na proteín alebo protilátku, potom napojením rádioznačenia na proteínový konštrukt cestou bifunkčného chelatačného činidla. Napríklad súčasne podávané prihlášky vynálezov číslo 08/475813, 08/475815 a 08/478967 opisujú značené terapeutické protilátky na zacielenie na/a na deštrukciu lymfómov B-buniek a nádorových buniek. Zvlášť objaveným je konjugát Y2B8, ktorý obsahuje protiludskú CD20 myšaciu monoklonálnu protilátku 2B8, napojenú na ^{90}Y cez bifunkčné chelatačné činidlo MX-DTPA.

Patentové spisy, týkajúce sa chelatačných činidiel a ich konjugátov, sú v odbore známe. Napríklad americký patentový spis číslo US 4 831175 (Gansow) je zameraný na polysubstituovanú dietyléntriámipentaotovú kyselinu (DTPA) ako chelatačné činidlo, na proteínové konjugáty, ktoré ju obsahujú a na spôsoby ich prípravy. Americké patentové spisy číslo US 5 099069, 5 246692, 5 286850 a 5 124471 (Gansow) sa tiež týkajú polysubstituovaných chelatačných činidiel DTPA. Ako opisuje Kozak a kol., ukázalo sa, že niektoré DTPA chelatačné činidlá vrátane MYDTPA, sú vhodné na ytriom-monoklonálnu protilátkovú rádioimunoterapiu (Nature of the bifunctional chelating agent used for radioimmunotherapy with yttrium-90 monoclonal antibodies: Critical factors in determining *in vivo* survival and organ toxicity. Cancer Res. 49, str. 2639 až 2644, 1989). Tieto odkazy sú tu citované vo svojej úplnosti.

Ytriom 90 je zvlášť vhodné na rádioimunoterapiu a terapiu rádiopeptidom z niekoľkých dôvodov. 64-hodinový polčas rozpadu ^{90}Y je dostatočne dlhý na nahromadenie protilátok nádorom a na rozdiel napríklad od ^{131}I je čistým β -žiaričom s vysokou energiou (E_{\max} 2,27 MeV) bez akéhokoľvek sprievodného gama-žiarenia pri rozpade. Jeho emisia častíc je 100 až 1000 priemerov buniek, čo je postačujúce minimálne množstvo prenikavého žiarenia, ktoré by umožňovalo ošetrovanie ambulantných pacientov. Okrem toho nie je potrebná internalizácia značených protilátok na zabíjanie buniek a lokálna emisia ionizačného žiarenia má byť smrtiaca pre susedné nádorové bunky, ktorým môže chýbať cieľový antigén.

Ale, aj keď je uznávaná užitočnosť ytriom značených protilátok a klinické výsledky niektorých ytriom značených liečiv sú povzbudivé, mnohí pacienti nemôžu využiť prednosti týchto liečiv pre inherentné ťažkosti pri uskutočňovaní tak rádioizotopového značenia, ako aj podávania v jednotlivých miestach. Tento významný problém je zrejmy v takmer úplne chýbajúcich súpravách a produktoch, ktoré sú schopné na mieste značiť reakčné činidlá α - a β -žiariacimi rádioizotopmi, ktoré sú potrebné pre komerčnú použiteľnosť takejto

technológie.

Problém s poskytnutím súprav na rádioové značenie a následné podávanie liečiv značených rozpadavými izotopmi sa javí ako dlhodobý v odbore a skôr, ako by mohlo byť takéto liečivo podané pacientovi, bol potrebný dlhodobý čistiaci proces na odstránenie neviazaného značenia, aby nebol pacient vystavený pôsobeniu voľného rádioizotopu, ktorý by sa mohol akumulovať v kostiach a v iných necieľových orgánoch. Aj takéto súpravy bežne dostupné na značenie protilátok ytriom vyžadujú zložitý čistiaci stupeň, kým je liečivo pripravené na podanie.

Napríklad Antisoma trvalo ponúka súpravu na rádioové značenie monoklonálnej protilátky HMFG1 (Theragyn^R) s ⁹⁰Y na následné podávanie pacientkam s diagnózou rakoviny vaječníkov. Štúdia rozšírenej fázy I-II ukázala, že toto liečenie môže byť zvlášť výhodné u pacientok ako následné po chirurgickom zákroku a chemoterapii (Hird a kol., Adjuvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal antibody, Br. J. Cancer 68, str. 403 až 406, 1993). Spôsob značenia Antisoma však vyžaduje odstraňovanie neviazaného značenia filtráciou cez gélový filter Sephadex G50, čo je významný odstrašujúci prostriedok pred značkovacou súpravou Theragyn^R, obchodne úspešnou, rovnako ako prekážka na zaručenie, že táto terapia je vhodná pre všetky pacientky s rakovinou vaječníkov, pre ktoré by mala účinne slúžiť.

Skutočnosť, že takéto reakčné činidlá bežne vyžadujú stĺpcové čistenie pred podaním, je a trvale bude odstrašujúca so zreteľom na vhodnosť pre všetkých pacientov, ktorí by mohli mať prospech z takejto technológie, pokiaľ nie je ponúkaný zjednodušený spôsob, ktorý dovoľuje lekárom rýchlo, účinne a bezpečne podávať takéto reakčné činidlá. Napríklad lekár u cezpoľne sídliaceho pacienta nemá čas alebo zariadenie na čistenie chromatografiou HPLC alebo gélovou filtračnou chromatografiou pred podaním reakčného činidla pacientovi. To znamená, že musia byť k dispozícii dodatočné zariadenia na mieste na súbežnú prípravu reakčného činidla a okamžité dodanie lekárovi, čo drasticky predraží terapiu a v niektorých prípadoch by mohlo znamenať, že pacient musí cestovať na pomerne vzdialené miesto, aby bol podrobený liečbe. Alternatívne by droga mohla byť značená mimo miesta, čo by vyžadovalo predbežnú prípravu a aspoň krátkodobé skladovanie liečiva. To spôsobuje nielen zníženie účinku rádioizotopu rozpadom rádioaktivity počas skladovania, alebo vedie to tiež k významnému poškodeniu štrukturálnej integrity proteínu nadmerným vystavením rádioizotopu.

Mnohé správy hovoria napríklad o rádiolytickej povahe ⁹⁰Y a podobných rádioizotopoch (napríklad Salako a kol., Effects of radiolysis on yttrium-90-labeled Lym-1 antibody preparations. J. Nucl. Med. 39, str. 667 až 670, 1998; Chakrabarti a kol., Prevention of radiolysis of monoclonal antibody during labeling. J. Nucl. Med. 37, str. 1384 až 1388, 1996). Ako uvádza Chakrabarti a kol., rádionuklidy, ako je ⁹⁰Y uvoľňujú veľké množstvo žiarenia na protilátku počas procesu značenia, rovnako ako pri skladovaní. Podľa správ vedie žiarenie k okolnostiam významného poškodenia protilátky, čo môže vylúčiť výhodné zacielenie na nádorové bunky a vystaviť nezamerané tkanivá značnej úrovni toxicity.

Mechanizmus radiačného poškodenia bol priradený vytváraniu voľných radikálov (Pizzarello: Direct and indirect action. Pizzarello a Witcofski Basic Radiation Biology, 2. vydanie Philadelphia 1975: Lea & Febger str. 20 až 29). Ale, ako uvádzajú Salako a kol., pri energii 2,2 MeV by mohli β-častice vyžiarené z ⁹⁰Y jednoducho prerušiť chemické väzby vrátane disulfidových mostíkov protilátky, ktoré majú väzbovú pevnosť iba 4,4 eV (Skoog: Principles of Instrumental Analysis, 3. vydanie 1985, San Francisco: Saunders). Čím je teda kratší čas, počas ktorého je značovaný proteín vystavený deštruktívnym rádioizotopom, ako je ⁹⁰Y, tým väčšia je šanca, že si proteín podrží štrukturálnu integritu a väzbovú špecificitu, ktorú potrebuje na interakciu s cieľovou protilátkou až do času, kedy je podaný a dosiahne cieľové miesto.

Rádiolytická povaha ⁹⁰Y bola v odbore známa mnoho rokov a mnohí sa pokúsili o vyriešenie problému, ktorý predstavuje ⁹⁰Y v komerčných aplikáciách týchto liečiv. Napríklad Salako a kol. a Chakrabarti a kol. hodnotia použitie rádioprotektantov pri príprave protilátkových prostriedkov značených ⁹⁰Y ako prostriedok na znížovanie poškodenia protilátkou. Salako a kol. zvlášť uvádzajú, že ľudský sérumalbumín umožňuje udržanie ⁹⁰Y značenú protilátkovú imunoreaktivitu až na 72 hodín. Ale špecifická aktivita vykazovaná Salakovými prostriedkami bola dosť nízka (menšia ako 2 mCi/ml). Okrem toho ani Salako, ani Chakrabarti neuvádzajú žiadne snahy predísť procesu rozsiahleho čistenia potrebného po značení protilátky. Salako a kol. značí počas 45 minút až 1 hodinu, potom vyčistí protilátku chromatografiou molekulárnym sitom, zatiaľ čo Chakrabarti značí takmer 3 hodiny a čistí gélovou filtračnou chromatografiou. Žiadny z týchto spôsobov nie je využiteľný na poskytnutie ⁹⁰Y-značených liekov ambulantnému pacientovi.

Chinol a Hnatowich boli schopní dosiahnuť 90 % rádióchemickej čistoty pre proteíny značené ⁹⁰Y so špecifickou aktivitou 1-3 mCi/mg bez čistenia po značení, pomocou vlastného generátora produkujúceho ⁹⁰Y (Generator-produced yttrium-90 for radioimmunotherapy, J. Nucl. Med. 28(9), str. 1465 až 1470, 1987). Autori však nemali odvahu podávať pacientom prostriedky, ktoré majú menšiu ako 95 % čistotu a nazdávali sa, že HPLC by mohla byť „možným potrebným“ stupňom.

Autori, ktorí uznali, že HPLC a ostatné typy čistenia musia byť vylúčené u ambulantných pacientov a pacientov v nemocnici, neuspeli pri vývoji postačujúceho značkovacieho protokolu pre ⁹⁰Y tak, aby sa dosiahla vysoká hladina začleneného značenia a aby bola dosiahnutá prijateľná hladina stability protilátky. Ak nie je

konzistentne dosahovaná vysoká úroveň začlenenia rádioaktivity, mohol by byť pacient vystavený nepriateľným úrovňam voľného neviazaného rádioaktívneho značenia, ak nie sú odstránené reakčné činidlá. Okrem toho, ak je poškodená štrukturálna integrita tak, že protilátka stratí cieľovú špecificitu, takéto reakčné činidlá sa špecificky neviažu na svoje príbuzné ligandy.

Mather a kol. prišiel s úmyslom značiť protilátky špecifické pre nádory ^{90}Y tým spôsobom, že by sa mohlo od čistenia po značení upustiť (Labeling monoclonal antibodies with yttrium 90. Eur. J. Nucl. Med. 15, str. 307 až 312, 1989). Mather však zistil, že vysoké úrovne značenia (cez 95 %) mohli byť dosiahnuté pri miernych špecifických aktivitách (1 mCi/mg). Okrem toho Mather a kol. uvádzajú, že ich protilátkové prostriedky vykazujú známky rozpadu (v dôsledku rádiolýzy) už po niekoľkých hodinách. Môže to byť tým, že Mather a kol., rovnako ako mnohí iní pracovníci v odbore, uskutočňovali reakciu značenia dlhšie ako 1 hodinu.

Navrhnuté boli napríklad spôsoby značenia proteínových reakčných činidiel menej deštruktívnym značením, ako je ^{111}In , ktoré vylúči dodatočné čistiace stupne. Richardson a kol. navrhuje taký postup značenia protilátok ^{111}In s cieľom vyvinúť súpravu na diagnostické použitie (Richardson a kol., Optimization and batch production of DTPA-labeled antibody kits for routine use in ^{111}In immunoscintigraphy, Nucl. Med. Comm. 8, str. 347 až 356, 1987). Spôsob podľa Richardsona a kol. trvá však dlhšie ako jednu hodinu, čo môže byť uskutočniteľné u ^{111}In , ktoré nie je príliš rádiolytické, nezdá sa však, že by mohlo nahradiť značenie použitím ^{90}Y , ako to vyplýva z ťažkostí, ktoré opísal Mather a kol.

To autorov privádza ku prekvapivej a neočakávanej prednosti vynálezu, ktorý prináša neoceniteľný pohľad do procesu rádioizotopového značenia proteínov ^{90}Y , ktorý nebol dosiaľ známy ostatným pracovníkom v odbore. Vynález je založený na prekvapivom objave, že proces HPLC alebo iné stupne čistenia, ktoré dosiaľ ostatní považovali za nevyhnutné na dosiahnutie čistých reakčných činidiel, a zdĺhavé inkubačné časy, ktoré ostatní prijali v úsilí o zvýšenie špecifickej aktivity svojich reakčných činidiel, sú v skutočnosti škodlivé pre proces prípravy reakčných činidiel značených ^{90}Y . Takéto časovo náročné spôsoby slúžia iba k zvýšenému poškodeniu proteínov v dôsledku rádiolýzy, čo vedie k menšej špecifickosti a zvýšeniu rýchlosti znehodnotenia proteínu časom skôr, než je proteín značený rádioizotopom pripravený na injektovanie. Teraz sa teda s prekvapením zistilo, že účinné značenie ^{90}Y (> 95 % začlenenie a aspoň 15 mCi/mg špecifickej aktivity) je možné uskutočniť počas 2 až 5 minút a skutočne takéto značenie stráca svoju účinnosť, keď sa reakčné časy predlžujú na čas dlhší ako 8 minút.

Skutočnosť, že značenie ^{90}Y je možné teraz dosiahnuť spôsobom podľa vynálezu za sotva dve minúty, úplne vyrieši bežný skepticizmus panujúci v odbore o použiteľnosti súprav a rádioizotopového značenia yttriom v nemocnici aj mimo nej. Súpravy podľa vynálezu teda uspokojujú dlho pociťovanú potrebu, ktorú možno poznajú mnohí pacienti postihnutí rakovinou a lekári s ohľadom na komerčnú prijateľnosť a dostupnosť liečiv rakoviny na báze proteínov značených rádioizotopmi.

Podstata vynálezu

Spôsob rádioizotopového značenia s chelatačným činidlom konjugovaného proteínu alebo peptidu terapeutickým izotopom na ošetrovanie pacienta spočíva podľa vynálezu v tom, že sa

(I) zmieša s chelatačným činidlom konjugovaný proteín alebo peptid s roztokom obsahujúcim rádioizotop alebo jeho soľ,

(II) inkubuje zmes dostatočne dlhý čas za takých priaznivých podmienok, že sa získa rádioizotopom značený proteín alebo peptid dostatočnej čistoty, špecifickej aktivity a väzbovej špecifickosti tak, že rádioizotopom značená protilátka môže byť podaná priamo pacientovi bez ďalšieho čistenia.

Vynález sa teda týka spôsobov a súprav na rádioizotopové značenie s chelatačným činidlom konjugovaného proteínu alebo peptidu terapeutickým rádioizotopom na liečenie pacienta.

Súprava podľa vynálezu obsahuje (I) liekovku s proteínom alebo peptidom konjugovaným s chelatačným činidlom, (II) liekovku obsahujúcu formulačný pufer na stabilizáciu a podávanie rádioizotopom značenej protilátky pacientovi a (III) také inštrukcie na uskutočňovanie rádioizotopového značenia, že keď je s chelatačným činidlom konjugovaný proteín alebo peptid vystavený rádioizotopu alebo jeho soli dostatočne dlhý čas za priaznivých podmienok odporúčaných v inštrukcii, získa sa rádioizotopom značený proteín alebo peptid, ktorý má dostatočnú čistotu, špecifickú aktivitu a väzbovú špecifickosť, takže rádioaktívne značená protilátka môže byť zriedená na príslušnú koncentráciu vo formulačnom puffri a podávaná priamo pacientovi bez ďalšieho čistenia.

Pokiaľ nie je uvedené inak, majú všetky použité technické a vedecké názvy pre pracovníkov v odbore známy význam. Aj keď je možné použiť spôsoby a materiály podobné alebo rovnaké, ako sú tu opísané na uskutočňovanie a testovanie vynálezu, sú opísané výhodné spôsoby a materiály.

Vynález sa týka spôsobov rádioizotopového značenia, s chelatačným činidlom konjugovaného proteínu alebo peptidu, terapeutickým izotopom na ošetrovanie pacienta, pri ktorom

(I) sa zmieša s chelatačným činidlom konjugovaný proteín alebo peptid, s roztokom obsahujúcim rádioizotop

alebo jeho soľ,

(II) sa inkubuje zmes dostatočne dlhý čas za priaznivých podmienok takých, že sa získa rádioizotopom značený proteín alebo peptid dostatočnej čistoty, špecifickej aktivity a väzbovej špecifickosti tak, že rádioizotopom značená protilátka môže byť podaná priamo pacientovi bez ďalšieho čistenia.

5 Pojem „ďalšie čistenie“ zahrnuje chromatografiu HPLC, gélovú filtráciu, iné typy stĺpcovej chromatografie a ostatné ďalšie separačné spôsoby, ktoré sa používajú na odstránenie voľného alebo nekonjugovaného radiačného značenia.

Spôsoby podľa vynálezu sú zvlášť použiteľné pri terapeutických rádioizotopoch, ktoré sú typicky rádiolytické, a preto potenciálne nebezpečné pre štruktúrnu celistvosť proteínu. Takéto terapeutické rádioizotopy sú všeobecne vyberané zo súboru zahrnujúceho α - a β -žiarice. Ako súčasné terapeutické rádionuklidy sa uvádzajú ^{203}Pb , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{109}Pd , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{77}Br , ^{211}At , ^{97}Ru , ^{105}Rh , ^{195}Au a ^{199}Ag alebo ^{177}Lu . Iné rádionuklidy, ktoré majú terapeutické použitie sú opísané v americkom patentovom spise číslo US 5 541287. Obzvlášť výhodnými rádionuklidmi sú silné β -žiarice, ktoré môžu spôsobovať intramolekulárny rozpad, ako sú ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{131}I , ^{186}Re a ^{188}Re . Aj keď označenie „terapeutické“ rádioizotopy znamená všeobecne rádioizotopy, ako sú α - a β -žiarice, ktoré majú cytotoxický účinok do tej miery, že je možné takéto rádioizotopy používať na diagnostické účely, nevynimajú tieto rádioizotopy takéto ciele z rozsahu tohto vynálezu, pretože je to rádiolytická povaha týchto izotopov, ktorá ich robí výhodnými pre spôsob a pre súpravy podľa vynálezu.

Spôsob podľa vynálezu je možné použiť na značenie proteínov alebo peptidov predovšetkým takých, ktorých štruktúrna celistvosť musí byť zachovaná pre cieľovú špecifickosť. Výhodnými proteínmi sú protilátky alebo protilátkové fragmenty, ako sú Fab, (Fab)₂ a Fv-fragmenty, ktoré rozoznávajú nádorovo špecifické alebo s nádorom súvisiace antigény. Ako výhodné peptidy sa uvádzajú somatostatín, vazointestinálny peptid (VIP), látka P a ostatné, ktoré sa viažu na bunkové receptory. Takéto peptidy a s chelatačným činidlom konjugované deriváty, sú opísané v americkom patentovom spise číslo US 5 830431.

Označenie „postačujúci inkubačný čas“ uvádzané v spôsobe podľa vynálezu, znamená prijateľný časový úsek, počas ktorého sa dosiahne dostatočné rádiozačlenenie a rádiochemická čistota, takže reakčné činidlo môže byť podávané pacientovi priamo bez potreby ďalšieho čistenia. Za dostatočné rádiozačlenenie a čistotu sa v odbore považuje všeobecne aspoň 95 %, ale môže to kolísť v závislosti od toxicity značenia. Pracovníkom v odbore je tiež zrejmé, že miera rádiozačlenenia, považovaná za dostatočnú, je tiež funkciou požadovanej úrovne účinnosti. Pre ^{90}Y a hlavne pre protilátky značené ^{90}Y môže byť takýto postačujúci čas všeobecne kratší ako približne 8 minút a výhodnejšie približne 2 až 5 minút pri danom prípustnom molárnom pomere chelatačného činidla k proteínu v s chelatačným činidlom konjugovanom proteíne, určenom na značenie.

Pracovníkom v odbore je tiež zrejmé, že optimálny čas, potrebný na označenie špecifického proteínu, môže kolísť v závislosti od proteínu, od príslušného rádioznačenia a od použitého konjugátu. Základným faktorom v optimalizácii času na rádioznačenie je pomer chelatačného činidla k proteínu reakčného činidla určeného na značenie. Napríklad na dosiahnutie terapeuticky užitočnej úrovne začlenenia musí byť pomer chelatačného činidla k proteínu dostatočne vysoký, teda 95 %, nesmie byť ale príliš vysoký, aby sa nestala štruktúrna celistvosť a imunoreaktivita proteínu pochybnou. To vyžaduje určité vyváženie, ktoré v mnohých prípadoch môže viesť k nižšej úrovni konjugovaného chelatačného činidla a k dlhšiemu času značenia.

Napríklad sa zistilo, že značenie ^{90}Y na požadovanú úroveň čistoty sa môže uskutočniť pod 5 minút s použitím MX-DTPA ako chelatačného činidla a iba približne 1/2 až 1 molárneho pomeru chelatačného činidla k protilátke. Aj keď môže byť pomer chelatačného činidla k protilátke aktuálne zvýšený, nie je to potrebné, pretože požadovaná miera rádiozačlenenia a špecifickej aktivity sa dosiahne po krátkom čase značenia. Vďaka tomuto objavu môžu byť ľahko určené parametre, ako sú koncentrácia chelatačného činidla k proteínu, empirickými prostriedkami pracovníkov v odbore pre iné proteíny a peptidy, v závislosti od voľby terapeutického značenia, od voľby chelatačného činidla, od počtu voľných miest na pripojenie chelatačného činidla, od spôsobilosti proteínu k rádiolyze a od žiadanej úrovne účinnosti.

V spôsobe podľa vynálezu môže byť použité akékoľvek chelatačné činidlo, pokiaľ je schopné väzby na proteín a zámerný rádioizotop. Výhodné chelatačné činidlá sa môžu vyberať zo súboru zahrnujúceho MX-DTPA, fenyl-DTPA, benzyl-DTPA, CHX-DTPA, DOTA a ich deriváty. Zvlášť výhodným chelatačným činidlom je MX-DTPA.

Medzi „priaznivé podmienky“ („amiable conditions“), uvádzané v spôsobe podľa vynálezu, patrí prijateľná teplota, hodnota pH a stav pufru. Pracovníkom v odbore je zrejmé, že reakčné podmienky nemajú byť volené tak, aby zabraňovali alebo nejakým iným spôsobom nevedli k značkovacej reakcii. Lewis a kol. hovoria o reakčných podmienkach, ktoré majú byť vzaté do úvahy pri rádiovom značení imunokonjugátov (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 immunconjugates. [Jednoduchý vodou rozpustný spôsob modifikácie proteínov s DOTA. Použitie zvýšených teplôt a optimalizované hodnoty pH na dosiahnutie vysokej špecifickej aktivity a vysokej stálosti chelátu v rádioznačených imunokonjugátoch] Bioconjugate Chem. 5, str. 565 až 576, 1994).

Prijateľná teplota pre reakciu sa môže meniť v závislosti od značeného proteínu, je však približne 25 až

43 °C. Lewis a kol. zistili, že zvyšovanie teploty rádioznačiacej reakcie z 25 na 43 °C zvyšuje tak účinnosť začleneného značiaceho kovu, ako aj kinetickú stabilitu skúmaných DOTA rádiokonjugátov.

Hodnota pH sa môže podstatne meniť v závislosti od použitého značiaceho rádioizotopu. Odporúčané hodnoty pH na značenie rôznymi rádionuklidmi sú v odbore všeobecne známe a môžu byť vybrané podľa vybratého rádioizotopu. Napríklad pre ^{90}Y môže byť hodnota pH približne 3 až približne 6, ale výhodnejšie je približne 4,2.

Prijateľné pufré tiež kolia v závislosti od príslušného značenia. Napríklad Lewis a kol. zistili, že prítomnosť citrátů inhibuje značiace reakcie s ^{90}Y . Citrátový pufer by teda nebol vhodný na reakcie značenia izotopom ^{90}Y . Pri značení izotopom ^{90}Y je vhodným pufróm acetátový pufer a výhodnejšie nátriumacetátový pufer s koncentráciou približne 10 až približne 1000 mM.

Pokiaľ to nebráni alebo inak nepriaznivo neovplyvňuje reakciu značenia, môže sa tiež zaradiť do reakčného pufru benigna (neadverzná) ochrana proti žiareniu (rádioprotektant). Podľa Chakrabartiho je jedným takýmto rádioprotektantom kyselina askorbová, ktorá nezasahuje do procesu značenia. Opatrnosť je však potrebná, ak sa použije albumín ľudského séra v reakcii značenia vplyvom prítomnosti kovov, ktoré by mohli interferovať s procesom značenia.

Pretože sa vynález týka radiačného značenia proteínov s čiastočne rádiolytickými izotopmi, môže existovať určitá rovnováha medzi väzbovou špecifickosťou a špecifickou aktivitou, s ktorou sa môže skúsený odborník stretnúť pri uskutočňovaní spôsobu podľa vynálezu. Ak je napríklad špecifická aktivita veľmi vysoká (napríklad vhodne cez 5 mCi/mg, výhodne 10 mCi/mg a najvýhodnejšie cez 15 mCi/mg), bude mať proteínový konštrukt, ktorý má žiadanú väzbovú špecifickosť, významnú zabíjajúcu schopnosť v oblasti nádoru. Ale časť proteínov v populácii ako celku, ktoré si uchovávajú svoju imunoreaktivitu, môže byť nižšia ako populácia, ktorá má nižšiu špecifickú aktivitu vplyvom rádiolýzy radiačného značenia. V závislosti od žiadanej úrovne špecifickej aktivity, môže pracovník v odbore zvoliť kompromisne určitú úroveň imunoreaktivity.

Napríklad podľa vynálezu sa zistilo, že s ^{90}Y , ak je protilátka značená na špecifickú aktivitu 15 mCi/mg, je väzbová špecifickosť alebo imunoreaktivita proteínu zvyčajne aspoň približne 70 %, môže však kolísť v závislosti od citlivosti protilátky a od rádiolytickej povahy použitého rádioizotopu a môže byť manipulovaná pracovníkom v odbore, ak je požadovaná vyššia úroveň imunoreaktivity alebo špecifickej aktivity. Podľa vynálezu sa dosiahli špecifické aktivity s ^{90}Y až približne 20 mCi/mg. Pre terapeutické aplikácie sa požaduje väzbová špecifickosť najmenej 50 %.

Na posúdenie percenta väzbovej aktivity a imunoreaktivity konjugátu po prípadnom značení podávané súvisiace prihlášky vynálezu. Je potrebné zdôrazniť, že aj keď nie je ďalšie čistenie potrebné po spôsobe značenia podľa vynálezu, mala by sa vždy urobiť skúška chromatografiou na tenkej vrstve TLC na overenie úrovne rádiozačlenenia, aby nebolo ohrozené zdravie pacienta. Takúto skúšku je možné uskutočniť v približne 3 až 4 minútach a nemala by významne ovplyvniť stabilitu alebo účinnosť rádioterapeutika.

Vynález sa týka tiež súprav na radiačné značenie s chelatačným činidlom konjugovaného proteínu alebo peptidu, s terapeutickým rádioizotopom na podanie pacientovi obsahujúce (I) liekovku s chelatačným činidlom konjugovaným s proteínom alebo peptidom, (II) liekovku obsahujúcu formulačný pufer na stabilizáciu a podávanie rádioizotopom značenej protilátky pacientovi a (III) také inštrukcie na uskutočňovanie procesu rádioizotopového značenia, že keď je chelatačným činidlom konjugovaný proteín alebo peptid, vystavený rádioizotopu alebo jeho soli na dostatočne dlhý čas za priaznivých podmienok odporúčaných v inštrukcii, získa sa rádioizotopom značený proteín alebo peptid, ktorý má dostatočnú čistotu, špecifickú aktivitu a väzbovú špecifickosť tak, že rádioaktívne značená protilátka môže byť zriadená na príslušnú koncentráciu vo formulačnom pufrí a podávaná priamo pacientovi bez ďalšieho čistenia. S chelatačným činidlom konjugovaný proteín alebo peptid, môže byť dodávaný v lyofilizovanej forme.

Súpravy podľa vynálezu sú určené na uskutočňovanie spôsobu podľa vynálezu a môžu sa používať na tento cieľ. Tiež je zrejmé, že inštrukcie k súprave sú založené na opísanom spôsobe, a že úvahy uvedené majú rovnakú závažnosť a význam, ak sú uvažované z hľadiska uskutočnenia súpravy. Okrem toho je zrejmé, že vynález zahrnuje tiež alternatívne uskutočnenie súprav podľa vynálezu, ktorú môžu obsahovať zložky ako acetátový pufer na nastavenie hodnoty pH radiačného značenia, ako je skôr uvedené.

Obzvlášť výhodnou zložkou súpravy je formulácia pufru na stabilizovanie proti účinkom rádiolýzy a na podávanie radiačne značených konjugovaných protilátok pacientovi. Formulačný pufer je farmaceuticky prijateľný nosič, ktorý slúži buď ako riedidlo pre značenú protilátku, alebo tiež ako podávací pufer. Aj keď sa môže na podávanie terapeutických alebo diagnostických protilátok pacientovi použiť akékoľvek farmaceuticky prijateľné riedidlo, formulácia pufru podľa vynálezu je obzvlášť vhodná na podávanie radiačne značených protilátok.

Formulačný pufer podľa vynálezu obsahuje ochranu proti žiareniu (rádioprotektant), ako je ľudský sérový albumín (HSA) alebo askorbát, ktorý minimalizuje rádiolýzu spôsobovanú ytrióm alebo inými silnými rádionuklidmi. V odbore sú známe ešte iné rádioprotektanty a mohli by sa tiež použiť vo formulácii pufru podľa vynálezu, napríklad lapače voľných radikálov (fenol, sulfity, glutatióm, cystein, kyselina gentizová, kyselina nikotínová, askorbylpalmitát, HOP(O)H₂, glycerol, nátriumformaldehysulfoxylát, nátriumdisiričitan, ná-

triumtiosulfát, a oxid siričitý).

Formulácia pufru podľa vynálezu tiež obsahuje prebytok nekonjugovaného chelatačného činidla. Účelom zariadenia nekonjugovaného chelatačného činidla je, že toto chelatačné činidlo slúži na lapanie všetkých neproteínových viazaných radiačných značení v pacientovi a spôsobí exkréciu radiačného značenia, čím znižuje vylúčenie izotopov vyhľadávajúcich kosti („bone seeking“), napríklad ^{90}Y kosťami pacienta. Ak je napríklad protilátka súpravy konjugovaná na chelatačné činidlo DTPA, nadbytok DTPA alebo akéhokoľvek iného chelatačného činidla môže byť začlenený do formulačného pufru. Formátový pufer je tiež výhodne dodaný v objeme tak, že všetok obsah je prevedený do reakčnej liekovky. Ako je uvedené, sú tieto výsledky zväčšované jednoduchosťou použitia a reprodukovateľnosťou, pretože presné objemy nemajú byť merané a odovzdávané.

Vhodne formulovaný pufer obsahuje pufrovaný fosfát alebo fyziologickú soľanku, ľudský sérový albumín a DTPA. Ľudský sérový albumín má výhodne koncentráciu približne 5 až 25 % (hmotnosť k objemu) a výhodnejšie koncentráciu približne 7,5 % (hmotnosť k objemu). Koncentrácia DTPA je výhodne približne 1 mM. Askorbát je možné použiť ako alternatívu k ľudskému sérovému albumínu a typicky sa používa v koncentrácii približne 1 až 100 mg/ml. Môže však byť použitý široký rozsah koncentrácií bez toho, aby bola ohrozená pacientova bezpečnosť.

Súprava môže byť dodávaná v iných alternatívnych uskutočneniach v závislosti od preferencií dodávateľa. Napríklad súprava môže ďalej obsahovať sterilnú reakčnú liekovku, v ktorej môže byť uskutočnená značiacia reakcia a zriedenie do formulačného pufru. Počíta sa s ďalšími uskutočneniami, kde pufer na nastavenie hodnoty pH radiačného značenia je dodaný v aktuálnej reakčnej liekovke na zníženie strát. Počíta sa tiež so súpravami, ktoré ďalej obsahujú liekovku s rádioizotopom, aj keď môže byť výhodnejšie objednať značkovaciu súpravu vopred a objednať rádioizotop oddelene na neskoršie tesne pred podaním. Ďalej sa počíta tiež so súpravami, ktoré obsahujú liekovku sekundárneho proteínu alebo peptidu, aby slúžila buď ako kontrola pri posudzovaní väzbovej afinity radiačne značeného produktu, alebo v niektorých prípadoch na použitie v kombinovaných terapeutických režimoch s radiačne značeným proteínom alebo peptidom.

Podrobný opis výhodných uskutočnení

Monoklonálna myšacia anti-CD20 protilátka (Y2B8) značená ^{90}Y sa bežne vyhodnocuje v klinických pokusoch na ošetrovanie recidivujúceho lymfómu B-buniek. Protilátka 2B8 je zmes myšacích protilátok, ktoré rozoznávajú ľudskú CD20. Vmiešaná verzia tejto protilátky (Rituxan^R) získala nedávno FDA súhlas na liečenie neHodgkinovho lymfómu. V americkej prihláške vynálezu číslo 08/475 813 sa opisuje postupné podávanie Rituxanu^R s ytriom značenou myšacou monoklonálnou protilátkou v kombinovaných terapeutických režimoch, pričom podávanie ytriom značenej anti-CD20 protilátky nasledovanej podávaním Rituxanu^R je postačujúce (a) na vyčistenie všetkých zvyšujúcich B buniek periférálnej krvi, ktoré neboli vyčistené chimérnou protilátkou anti-CD20; (b) na začiatok ochudobňovania B-buniek z lymfatických uzlín; (c) na začiatok ochudobňovania B-buniek z ostatných tkanív.

S danou dokázanou účinnosťou anti-CD20 protilátky pri liečení neHodgkinovho lymfómu a so známou citlivosťou lymfocytov na rádioaktivitu, bolo by vysoko výhodné pre takého terapeutické protilátky, keby sa stali obchodne dostupnými v súprave, z ktorej môžu byť pohodovo modifikované radiačným značením a podávané priamo pacientovi v klinickom prostredí.

Súprava na radiačné značenie pre protilátku 2B8 obsahuje výhodne štyri zložky: 1. 2B8-MX-DTPA v nízkokovovej normálnej soľanke pri 2 mg/ml, 2. 50 mM octanu sodného používaného na nastavenie pH rádioizotopového roztoku na vhodnú hodnotu pre značenie, 3. formulačný pufer (IX PBS, pH 7,4 obsahujúci 7,5 % ľudského sérového albumínu a 1 mM DTPA a prípadne 4. prázdne 10 ml sklenené liekovky (reaktívne liekovky) („10 ml“ pohodlne postačí na 10 ml a je technicky trochu väčšia ako „10 ml“). Všetky zložky sú testované na sterilitu a neprítomnosť pyrogénu.

V tomto texte je súhrn výhod tejto radiačne značkovej súpravy, ktorá je jednoduchá a ľahko sa používa a ktorá poskytuje radiačne značené protilátky s $\geq 95\%$ vnesením žiariča a s prijateľným zachovaním väzby na antigén pozitívnej bunky.

Vynález objasňujú, nijako však neobmedzujú, nasledujúce príklady výhodných uskutočnení.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1A) Väzba X2B8 na CD20-pozitívne bunky. Na osi x je koncentrácia buniek ($\times 10^6$ buniek/ml). Na osi y je percento väzby. Bunky SB sa premyjú a resuspendujú na 90×10^6 buniek/ml riediacim pufrom (pufer=pufer+tlmivý roztok) (1x PBS, pH 7,4 obsahujúce 1 % (hmotnosť k objemu) albumínu hovädzieho séra. Vzrastajúce koncentrácie buniek sa inkubujú tri hodiny v 2 ng/ml Y2B8 pripravenom s použitím 2B8-MX-DTPA dávky #0165A.

Obr. 1B) Vázba X2B8 na CD20-pozitívne bunky. Na osi x je 1/objem koncentrácia buniek. Na osi y je pomer AT/B. Dvojitá inverzná vynesená závislosť koncentrácie buniek od pomeru viazaná rádioaktivity/celková rádioaktivita (B/AT). Imunoreaktivita je vypočítaná ako 1/y- priesečník x 100. Imunoreaktivita je 72,2 % a korelačný súčiniteľ (R) je 0,999.

5

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

10 Radiačne značkovacia súprava a spôsob značenia 2B8 ⁹⁰Y

A. Reakčné činidlá v radiačne značkovacej súprave

1. 2B8-MX-DTPA, IDEC; Lot#082395RM2
2. 50 mM octanu sodného, nízkokovového, IDEC; Lot#082395RM3
- 15 3. formulačný pufer (IX PBS, pH 7,4 obsahujúci 7,5 % (hmotnosť k objemu) ľudského sérového albumínu a 1 mM DTPA), IDEC, Lot#082395RM1
4. reakčná liekovka, 10 ml, IDEC.

B. Materiál a vybavenie

1. Biodex Tec-Control Radioincorporation Kit, Cat.#151-770
- 20 2. rukavice, bez prášku
3. sterilné polypropylénové injekčné striekačky
4. sterilné injekčné ihly
5. malé skúmavky s uzáverom: 1,5 ml

25 C. Spôsob

1. Príprava Y2B8 pomocou radiačne značkovacej súpravy

- Pripravujú sa reakčné činidlá pre súpravu a naplnia sa do sklenených zazátkovaných liekoviek. Borosilikátové liekovky typu I (2 alebo 10 ml) sa prepláchnu sterilnou vodou na injektovanie (WFI) a pred použitím sa uložia do autoklávu. Butylkaučukové zátky sa opláchnu sterilnou vodou WFI a pred použitím sa uložia do autoklávu. Reakčné činidlá sa ručne naplnia a uzavru sa v miestnosti triedy 100 a testujú sa na pyrogenicitu použitím spôsobu podľa USP.

30

Pridávne reakčné činidlá:

1. Ytrium [90]:chloridová soľ, bez nosiča, v kyseline chlorovodíkovej.

35

Opatrenia:

1. Všetky stupne sa uskutočňujú s použitím aseptickkej techniky.
2. Zložky radiačne značkovacej súpravy sa pred použitím nechajú, aby dosiahli teplotu miestnosti.

40 Protokol radiačného značenia

1. Objem ⁹⁰YCl₃ na plnenie reakčných liekoviek sa vypočíta takto:

a. Koncentrácia rádioaktivity v čase radiačného značenia:

C₀ = koncentrácia rádioaktivity v čase ciachovania (pozri výrobcov atest pre analýzu).

Delta t = zmena v čase (kladné číslo je po ciachovaní, záporné číslo je pred ciachovaním).

45

$$\text{Koncentrácia rádioaktivity v čase značenia} = \frac{C_0}{e^{0,0108 (\text{delta } t)}}$$

b. Objem ⁹⁰YCl₃ na naplnenie do reakčnej liekovky:

$$\frac{45 \text{ mCi}}{\text{koncentrácia rádioaktivity v čase značenia}} = \text{objem vnášaný do reagenčnej liekovky}$$

50

2. Objem 50 mM octanu sodného na pridanie do reakčnej liekovky sa vypočíta takto:

a. pre ⁹⁰YCl₃ v 0,040 M HCl (Amersham):

55 objem ⁹⁰YCl₃ (krok 1b) x (0,8) = objem pridávaného octanu sodného

b. pre ⁹⁰YCl₃ v 0,050 M HCl (Nordion):

objem ⁹⁰YCl₃ (krok 1b) x (1,0) = objem pridávaného octanu sodného

3. Zátky reakčnej liekovky a octanu sodného sa vytrú alkoholom. Pomocou 1 cc injekčnej striekačky sa do reakčnej liekovky vnesie vypočítaný objem (krok 1a alebo 1b) 50 mM octanu sodného (krok 2). Liekovka sa mieša za opakovaného obracania.

60

4. Zátka liekovky zdroja $^{90}\text{YCl}_3$ sa vytrie alkoholom. Liekovka sa ihlou vybaví sterilným filtrom 0,2 μm . Pomocou 1 cc injekčnej striekačky sa nasaje požadovaný objem (krok 1b) $^{90}\text{YCl}_3$ a prenesie sa do reakčnej liekovky. Liekovka sa mieša opakovaným obracianím.
5. Zátka liekovky zdroja 2B8-MX-DTPA sa vytrie alkoholom. Pomocou 3 cc injekčnej striekačky sa do reakčnej liekovky vnesie 1,5 ml 2B8-MX-DTPA. Liekovka sa mieša opakovaným obracianím.
6. Celkový objem reakčnej zmesi sa vypočíta sčítaním objemu pridaného chloridu ^{90}Y (krok 4), plus množstvo 50 mM octanu sodného pridaného (krok 3), plus množstvo pridané 2B8-MX-DTPA (krok 5).
7. Objem formulačného pufru na pridanie do reakčnej liekovky na získanie celkového objemu 10 ml sa vypočíta odčítaním celkového reakčného objemu vypočítaného v kroku 6 od 10.
10. Zátka formulačného pufru sa vytrie alkoholom a liekovka sa prevetrá. Vzhľadom na viskozitu formulačného pufru sa reakčná liekovka použitím ihly vybaví filtrom 0,20 μm striekačky. Pomocou 10 cc sterilnej injekčnej striekačky, vybavenej vhodnou odmeriavacou ihlou sa prenesie objem formulačného pufru vypočítaný v kroku 7 do reakčnej liekovky. Ventilačná ihla sa z reakčnej liekovky vyberie a liekovka sa mieša opakovaným obracianím (konečný produkt). Liekovka sa inkubuje najmenej 5 minút pred uskutočnením testu rádiozačlenenia. Farba roztoku je žltá a reakčná liekovka je plná, čím je potvrdené pridanie reakčného pufru.
15. Celková rádioaktivita konečného produktu sa meria vhodnou aparatúrou na meranie ^{90}Y .
10. Konečný produkt sa okamžite uskladní pri teplote 2 až 8 $^{\circ}\text{C}$ až do podania pacientovi.

2. Skúška rádiozačlenenia

20. Percento rádiozačlenenia sa určí instantnou chromatografiou na tenkej vrstve (ITLC) s použitím súpravy Biodex Tec-Control Radiochromatographic Kit podľa nasledujúceho protokolu:

Prídavné materiály a vybavenie:

1. ^{90}Y radiačne značená 2B8-MX-DTPA
25. 2. skúmavky na načítanie rádioaktívnych prúžkov TLC
3. nožnice
4. sterilná injekčná striekačka 1 cc
5. sterilné ihly, 26G
6. Scintilačný čítač gama-žiarenia
30. 7. Pipeta

Postup:

1. Najskôr sa prečíta celý návod Biodex Operation Manual.
2. Každá radiačne značená vzorka sa trikrát testuje podľa inštrukcií súpravy; vyvinie sa jeden prúžok pre liekovku.
35. 3. Na nakvapkanie radiačne značenej vzorky na chromatografický prúžok sa použije pipeta na kvapnutie 1 μl na pôvodnú čiaru. Alternatívne môže byť kvapnutá malá kvapka z ihly 26G pripojenej na injekčnú striekačku 1 cc. Protílátka zostane na začiatku a nezačlenená ^{90}Y -DTPA sa pohybuje s čelom roztoku.
4. Každý úsek sa načíta na aktivitu pomocou vhodného čítača, napríklad scintilačného čítača pre ^{90}Y , nastavený pre pozadie.
40. 5. Postupuje sa podľa inštrukcií na vypočítanie percenta radiačnej značenej protílátky.

3. Väzbová skúška

Prídavné reakčné činidlá:

45. 1. ^{90}Y 2B8-MX-DTPA
2. Lyofilizované bunky

Ľudské bunkové línie SB (CD20-pozitívne) a HSB (CD20-negatívne) sa získajú od American Culture Collection a kultivujú sa v T-bankách s použitím RPMI-1640 obsahujúceho 10 % hovädzieho zárodočného séra doplneného 2 % glutamínu. Kultúry sa udržiavajú pri teplote 37 $^{\circ}\text{C}$ v prostredí s 5 % oxidu uhličitého. Bunky sa spravidla rozštiepia 1 : 2 každý druhý deň a odoberú sa pri 0,5 x 2,5 x 10⁶ buniek/ml a so životnosťou > 80 %.

Koncentrácia buniek sa stanoví hemacytometrom a životnosť sa stanoví vylučovaním trypanovej modrej.

Bunky sa odoberú pri teplote okolia a pri hustote 0,5 až 2 x 10⁶ buniek/ml odstredení (1300 otáčok za minútu v odstredivke Sorvall) a premyjú sa dvakrát 1X HBSS. Peletované bunky sa resuspendujú na 50 x 10⁶ buniek/ml v 1X HBSS obsahujúcom 1 % (hmotnosť k objemu) albumínu hovädzieho séra (BSA) a 10 % (hmotnosť k objemu) manitolu (lyofilizačný pufer), 0,5 ml vneseného do 1,5 ml polypropylénových mikroodstredivkových skúmaviek s okrúžkovými uzávermi, uložia sa cez noc pri teplote -70 $^{\circ}\text{C}$ a lyofilizujú sa pri 3999,66 až 7999,32 60 miliPa. Skúmavky s lyofilizovanými bunkami sa uložia v exsíkátore pri teplote 2 až 8 $^{\circ}\text{C}$ a rekonštitujú sa v sterilnej vode na skúšanie: skúmavky s bunkami lyofilizovanými v mikroodstredivkových skúmavkách sa uložia s exsíkátorem.

3. Sterilná voda na preplachovanie a na injektovanie
4. Riediaci pufer (1XPBS, pH 7,2 až 7,4 obsahujúci 1 % albumín hovädzieho séra (BSA) a 0,02 % azidu sodného.

5 Postup:

Príprava radiačne značenej vzorky protilátky

1. Získa sa radiačne značená protilátka skladovaná pri teplote 2 až 8 °C.
2. Objem 10 µl sa odtiahne P20 a pridá sa do 1,5 ml mikroodstredivkovej skúmavky obsahujúcej 990 µl riediaceho pufru (zriedenie 1 : 100). Koniec sa opláchne a skúmavka sa mierne mieša.
3. Získa sa 50 ml sterilná polypropylénová skúmavka s viečkom a vnesie sa do nej 10 ml riediaceho pufru, pomocou 10 ml sérologickej pipety.
4. Odtiahne sa 35 µl s P20 zo skúmavky so zriedením 1 : 100 a vnesie sa do kuželovitej skúmavky obsahujúcej 10 ml riediaceho pufru. Opatrne sa mieša.

15 Príprava lyofilizovaných buniek

1. Získajú sa tri skúmavky lyofilizovaných buniek SB.
2. Objem 0,5 ml SWFI sa pridá do každej skúmavky a skúmavky sa miešajú až do dosiahnutia suspenzie jednotlivých buniek.
3. Získajú sa prázdne mikroodstredivkové skúmavky 1,5 ml: do troch týchto skúmaviek sa pridá 0,5 ml riediaceho pufru, čo predstavuje kontrolu bez buniek.

Skúšobný protokol

1. Do každej skúmavky sa pridá 0,5 ml zriedenej ⁹⁰Y2B8-MX-DTPA.
2. Skúmavky sa umiestnia na konci nad mixérom na 45 minút s istotou, že uzávery sú tesné.
3. Po 45 minútovej inkubácii pri teplote okolia sa skúmavky peletujú 5-minútovým mikroodstređením.
4. Do scintilačných liekoviek sa preniesie objem 0,8 ml supernatantu.
5. Do každej liekovky sa pridá scintilačný kokteil.
6. Scintilačným čítačom nastaveným na pozadie sa zmeria reaktivita v každej liekovke.

30 D. Výsledky

Reprodukovateľnosť a výraznosť protokolu radiačného značenia pre X2B8 sa vyhodnotí uskutočnením niekoľkých hodnotiacich priebehov s použitím rôznych dávok každého rádioizotopu. Päť členov obsluhy pripraví 6 hodnotiacich dávok Y2B8. Tieto dávky sa označia, ako je ďalej uvedené, a použijú sa nasledujúce možnosti:

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

5. Výsledky testovania všetkých hodnotených dávok sú v tabuľke I
Tabuľka I - Výsledky uvoľňovacej skúšky na hodnotenie Y2B8

Dávka číslo	Rádiozačlenenie (%)	Väzba (%)
1	99,5	78,6
2	99,3	87,0
3	99,4	85,9
4	99,2	81,8
5	99,2	79,6
6	96,3	80,8
	priemer = 98,8 smerodajná odchýlka = 1,24 CV = 1,25 %	priemer = 82,3 smerodajná odchýlka = 3,4 CV = 4,2 %

- 45 V šiestich hodnotených pripravených dávkach je získané percento väzby 78,6 % až 87,0 % so stredom 82,3 %. Hodnota rádiozačlenenia pre Y2B8 je v priemere 98,8 % (96,3 % až 99,5 %). Tieto výsledky potvrdzujú reprodukovateľnosť a výraznosť súpravy na radiačné značenie pri príprave Y2B8 a spoločne dokladajú, že Y2B8 pripravené použitím súpravy na radiačné značenie sú vhodné na použitie v klinickom prostredí.

Príklad 2

Počiatkové hodnotenie reakčných parametrov - pH a reakčné časy

Najskôr sa uskutočnia kinetické štúdie na vyhodnotenie rádiozačlenenia a väzby protilátok značených ^{90}Y (Y2B8) nasledovaných po reakciách značenia uskutočnených za rôznych podmienok hodnoty pH a reakčného času. Pri reakcii radiačného značenia pri hodnote pH 3,9 až 4,7 a pri inkubačnom čase 5 minút bolo rádiozačlenenie > 96 % s retenciou > 80 % väzby na CD20-pozitívne bunky (tabuľka II). Podobné výsledky boli získané pre inkubačné časy 3,5 a 10 minút pri hodnote pH 2,9 až 4,6 (tabuľka III).

Tabuľka II - Kinetika radiačného značenia: Vplyv hodnoty pH na rádiozačlenenie a väzbu na CD20-pozitívne bunky¹

Hodnota pH	Rádiozačlenenie (%)	Väzba (%)
3,9	98,4	80,7
4,2	97,8	81,0
4,4	96,1	80,0
4,6	97,0	80,2
4,7	97,4	80,6

Tabuľka III - Kinetika radiačného značenia Y2B8: Účinok inkubačného času na rádiozačlenenie a väzbu na CD20-pozitívne bunky¹

Inkubačný čas (min)	Rádiozačlenenie (%)	Väzba (%)
pH 3,9: 3	97,0	82,0
5	98,9	82,1
10	99,2	82,3
pH 4,7: 3	97,2	82,5
5	96,7	81,8
10	97,6	81,5

¹Výsledky reakcií značenia a parametre vyhodnocovacích štúdií uvedené v tabuľke II a III sú uskutočnené s 2B8 odvodených z expresného systému buniek CHO. Konjugát MX-DTPA je pripravený použitím protokolu podobného, ako je použitý na charakterizovanie 2B8-49. Reakcie sa uskutočňovali s približne 3 mg protilátky a pri molárnom pomere 4 : 1 chelatačného činidla k protilátke, ako je to opísané v súčasne podávanej prihláške vynálezu č. 09.

Imunoreaktivity pre prípravu Y2B8 sú stanovené použitím spôsobu, ktorý opísal Lindmo a kol. Zvýšené množstvá čerstvo odobratých CD20-pozitívnych SB buniek s pevným množstvom Y2B8 za podmienok nadbytku antigénu. Analýza recipročného vynesenia väzbových údajov ukázala imunoreaktivitu 72,2 % pre Y2B8 po jednej skúšobnej príprave (obr. 1).

Príklad 3

Vyhodnotenie ďalších reakčných parametrov

I. Úvod

Opísované testy skúmajú vplyv odchýlok od protokolu väzby Y2B8 pripravenej použitím súpravy na radiačné značenie Y2B8. Väzba radiačne značenej protilátky môže byť ovplyvnená niekoľkými parametrami počas procesu radiačného značenia, ako ukazuje tabuľka IV.

Tabuľka IV

Odchýlka od súpravy pre radiačné značenie	Predpokladané účinky na podmienky značenia	Predpokladaný vplyv na väzbu
1) Pridanie nadmerného objemu ^{90}Y	pokles pH zvýšená rádiolýza	zvýšený
2) Pridanie menšieho objemu ^{90}Y	pH bez zmeny pokles rádiolýzy	znížený alebo žiadny
3) Pridanie nadmerného objemu NaAc	pH bez zmeny pokles rádiolýzy	zvýšený alebo žiadny
4) Pridanie menšieho objemu NaAc	pokles pH zvýšenie rádiolýzy	znížený
5) Pridanie nadmerného objemu 2B8-MX-DTPA	pH bez zmeny pokles rádiolýzy (nižšia špecifická aktivita)	zvýšený

Odchýlka od súpravy pre radiačné značenie	Predpokladané účinky na podmienky značenia	Predpokladaný vplyv na väzbu
6) Pridanie menšieho objemu 2B8-MX-DTPA	pH bez zmeny zvýšenie rádiolýzy (vyššia špecifická aktivita)	znížený
7) Inkubácia > 5 min.	zvýšenie rádiolýzy	znížený
8) Inkubácia < 5 min.	pokles rádiolýzy	zvýšený alebo žiadny

Nasledujúce odchýlky od protokolu radiačného značenia sú identifikované ako odchýlky, ktoré majú najpravdepodobnejšie negatívny dosah na väzbu a patria k nim: 1. prísada menšieho objemu octanu sodného, 2. prísada nadbytku roztoku chloridu ^{90}Y , 3. prísada menšieho objemu 2B8-MX-DTPA a 4. prekročenie maximálneho času inkubácie. Dosah týchto odchýlok sa hodnotí oddelene a súčasne.

Pri oddelenom hodnotení sa 20 % odchýlok položiek 1 až 3 neprejavilo v IDEC-Y2B8 prechádzanie uvoľňovacej špecifikácie stanovenej pre väzbu v klinických skúškach, aj keď inkubácia trvala 8 minút. V štúdiu, pri ktorej boli všetky tri objemové odchýlky (1 až 3) uskutočnené súčasne, boli iba dávky pripravené podľa pondelňajšieho značkovacieho protokolu (potenciálne najviac rádiolytického) a inkubované 8 minút (o 60 % dlhšie ako normálne) marginálne pod (< 3 %) klinickú uvoľňovaciu špecifikáciu. Na rozdiel od toho, dávky pripravené podľa piatkového značkovacieho protokolu zachovávali prijateľné väzbové výsledky cez kumulatívne účinky odchýlok vo všetkých štyroch parametroch (1 až 4). Pri všetkých odchýlkach, uskutočnených oddelene alebo kolektívne, bolo radiačné začlenenie nad klinickou uvoľňovacou špecifikáciou na 95 %.

II. Voľba parametrov

Rozhodnuté bolo, že 20 % odchýlka od požadovaného objemu reakčných činidiel alebo predlžujúca reakčný čas o viac ako 30 % maxima 6 minút používané normálne, predstavuje potenciálne extrémnu odchýlku od protokolu používaného v rádiofarmácii. V tejto štúdiu sa vyhodnocuje dosah týchto odchýlok na väzbu IDEC-Y2B8. Simuluje sa „pondelkové“ a „piatkové“ značenie na uistenie, že vyhodnotené podmienky predstavujú extrémny prípravu dávok na celý týždeň. Vyhodnotil sa tiež kombinovaný účinok na väzbu, keď sa všetky odchýlky vyskytnú v jednej dávke prípravy a dosah týchto odchýlok na začlenenie radiácie ^{90}Y .

„Pondelkové“ a „piatkové“ značenie predstavuje situáciu, že pretože roztok chloridu ^{90}Y má krátky polčas rozpadu (64 hodín), závisí objem použitého rádioizotopu odo dňa jeho prípravy v týždni. Z toho dôvodu je reakčný objem pre dávku pripravovanú v pondelok menší, čo vedie k vyššej koncentrácii ^{90}Y , možno vedúcej k väčšej rádiolýze. Preto sa simulovali pondelkové a piatkové značkovacie procedúry na uistenie, že vyhodnotené podmienky predstavujú extrémny prípravu dávok v celom týždni.

III. Materiál a metódy

A. Reakčné činidlá

- $^{90}\text{YCl}_3$ v 0,05 M HCl; Pacific Northwest National Laboratory, činidlo P.O. # 08016,08118
- Ultrex HCl; J. T. Baker, produkt # 6900, šarža # J22539
- Sterilná voda na omytie; Baxter, diel # 2F7114, šarža # G924092
- Riediaci pufer; obsah 10 mM soľanky fosfátového pufru, pH 7,4 1 % BSA; Sigma, diel # P-3688, šarža # 076H8913
- Dodaná súprava IDEC na radiačné značenie; IDEC diel # 130018, šarža # 0129 obsahujúca:
 - 2B8-MX-DTPA; IDEC diel # 129017, šarža # 0165
 - 50 mM octanu sodného; IDEC diel # 129017, šarža # 0209A
 - formulačný pufer; IDEC diel # 120015, šarža # 0202
 - reakčnú liekovku; IDEC diel # 122015, šarža # 0218
- Lyofilizované bunky SB; IDEC diel # 127, šarža # 127-001F

B. Materiál a zariadenie

- pipety (20, 200 a 1000 gL)
- miešadlo
- pipetovacie hroty bez kovu (Biorad; Metal-free)
- čítač gama-žiarenia (Isodata, model # 20-10)
- sklenené skúmavky (12 x 75 mm)
- polypropylénové skúmavky (Costar; 15 ml a 50 ml, kónické, sterilné)
- Tec-kontrolná rádiochromatografická súprava (Biodex; Cat # 151-770)
- Mikroodstredivka (Savant)
- polypropylénové mikroodstredivkové skúmavky; bez kovu (Biorad; Cat # 223-9480)

C. Spôsoby

1. Príprava Y2B8

Všeobecne sa pripraví ^{90}Y značená 2B8-MX-DTPA použitím verzie na prípravu v malom meradle súpravy na radiačné značenie, uvedeného protokolu modifikovaného ďalej opísanými zmenami. Radiačné značenie sa uskutoční zásobným roztokom chloridu ^{90}Y s koncentráciou 84 mCi/ml alebo 29,8 mCi/ml na simulovanie pondelkovej a piatkovej prípravy (založenej na stredjšom ciachovaní 50 mCi/ml).

Koncentrovaný roztok chloridu ^{90}Y sa zriedi použitím 50 mM kyseliny chlorovodíkovej (Ultrex, high-purity) v mikroadstredivkových plastových skúmavkách „bez kovu“. Kyselina chlorovodíková Ultrex (high-purity) HCl sa zriedi na 50 mM sterilnou vodou (Sterile Water for Irrigation -SWFI). Reakcia radiačného značenia sa uskutoční v mikroadstredivkových 15 ml kužeľových plastových skúmavkách „bez kovu“ alebo v sklenenej 10 ml reakčnej liekovke vybavenej zátkou zo súpravy na radiačné značenie Y2B8.

a. Značenie v malom meradle na predpoveď príprav vo veľkej dávke

Reakcie radiačného značenia 1, 3, 10 a 40 nCi sa uskutočnia za reakčných podmienok simulujúcich pondelkovú prípravu dávky. Objemy reakčného činidla v ml sú v tabuľke V.

Tabuľka V - Objemy reakčných činidiel (ml)

^{90}Y množstvo (mCi)	^{90}Y chlorid	Octan sodný	2B8-MX-DTPA
1	0,0119	0,0143	0,0333
3	0,0357	0,0429	0,0998
10	0,119	0,143	0,3330
40	0,476	0,571	1,3300

Po 5-minútovej inkubácii sa odoberú 20 μl vzorky a zriedia sa formulačným pufrom na konečnú koncentráciu protilátky 0,21 mg/ml a až do skúšky sa uložia pri teplote 2 až 8 °C. Väzbové hodnoty sa normujú na reakcii 1 mCi, pretože reakcie 1 mCi sa používajú ako kontroly vo všetkých nasledujúcich pokusoch opísaných v tomto teste. Uvádzané hodnoty sú normované na 1 mCi kontrolnej vzorky podelením väzbovej hodnoty pre každú reakciu väzbovou hodnotou kontroly, vyjadreným v percentách.

b. Následok prídania objemu octanu sodného

Pre pondelkové značenie sa zmieša 10 mCi chloridu ^{90}Y (0,119 ml) s 0,114 ml 50 mM octanu sodného. Tento objem 50 mM octanu sodného predstavuje 20 % zníženie množstva pufru normálne používaného na prípravu klinických dávok IDEC-Y2B8. Pridá sa konjugovaná protilátka (2B8-MX-DTPA) (0,333 ml), vzorka sa zamieša a inkubuje sa pri teplote miestnosti. Špecifická aktivita roztoku na radiačné značenie je 18,9 mCi/mg protilátky. Pri 2 minútach sa odoberie 0,020 ml, formuluje sa formulačným pufrom na 0,24 mg/ml a uloží sa pri teplote 2 až 8 °C. Zvyšok roztoku na radiačné značenie sa formuluje po 8 minútach na 0,24 mg/ml a uloží sa pri teplote 2 až 8 °C. Protokol sa opakuje na simulovanie piatkového značenia použitím 0,336 ml ^{90}Y chloridu, 0,323 ml octanu sodného a 0,333 ml 2B8-MX-DTPA. V oboch štúdiách sa uskutočňuje kontrolná reakcia 1 mCi použitím opísaných „štandardných“ podmienok (5-minútová reakcia).

c. Následok prídania nadmerného objemu ^{90}Y chloridu

Pre pondelkové značenie sa zmieša 12 mCi chloridu ^{90}Y (0,143 ml) s 0,143 ml 50 mM octanu sodného. Tento objem ^{90}Y predstavuje 20 % zvýšenie množstva ^{90}Y potrebného na prípravu typickej dávky Y2B8. Pridá sa konjugovaná protilátka a vzorkový roztok sa inkubuje pri teplote miestnosti. Konečná špecifická aktivita je 22,5 mCi/mg protilátky. Pri 2 minútach sa odoberie 0,020 ml, formuluje sa formulačným pufrom na 0,24 mg/ml a uloží sa pri teplote 2 až 8 °C. Zvyšok roztoku na radiačné značenie sa formuluje po 8 minútach na 0,24 mg/ml a uloží sa pri teplote 2 až 8 °C. Uskutoční sa protokol na simulovanie piatkového značenia použitím 0,403 ml ^{90}Y chloridu, 0,403 ml 50 nM octanu sodného a 0,333 ml 2B8-MX-DTPA. (špecifická aktivita 22,5 mCi/ml protilátky). V oboch štúdiách sa uskutočňuje kontrolná reakcia 1 mCi použitím opísaných „štandardných“ podmienok (5-minútová reakcia).

d. Následok prídania menšieho objemu protilátkového konjugátu

Pre pondelkové značenie sa zmieša 10 mCi chloridu ^{90}Y (0,119 ml) s 0,143 ml 50 mM octanu sodného. Pridá sa konjugovaná protilátka (0,267 ml), ktorá obsahuje o 20 % menej protilátky ako normálne používané a vzorkový roztok sa mieša a inkubuje sa, pri 2 až 8 minútach sa odoberie 0,020 ml, formuluje sa formulačným pufrom na 0,21 mg/ml a uloží sa pri teplote 2 až 8 °C až do skúšky. Podobne sa uskutoční protokol na simulovanie piatkového značenia použitím 0,336 ml ^{90}Y chloridu, 0,403 ml 50 nM octanu sodného a 0,27 konjugátu. V oboch štúdiách sa uskutoční kontrolná reakcia 1 mCi použitím opísaných „štandardných“ podmienok (5-minútová reakcia).

e. Následok odchýlky kombinovaného reakčného činidla

Následok 20 % odchýlky objemu octanu sodného ^{90}Y chloridu a konjugátu sa posudzuje súčasne pre pondelkový a piatkový protokol. Pre pondelkové značenie sa zmieša 12 mCi ^{90}Y (0,143 ml) s 0,114 ml 50 mM octanu sodného, čo predstavuje 20 % zvýšenie množstva ^{90}Y a o 20 % zníženie množstva normálne používaného octanu sodného. Pridá sa 2B8-MX-DTPA (0,267 ml) predstavujúci o 20 % menšie množstvo protilátky, ako je normálne používané a reakčná zmes sa inkubuje pri teplote miestnosti. Pri 2, 4, 6 a 8 minútach sa z reakčnej zmesi odoberie 0,020 ml, formuluje sa formulačným pufrom na konečnú koncentráciu protilátky 0,21 mg/ml a uloží sa pri teplote 2 až 8 °C až do skúšky. Piatkové značenie sa uskutoční podobne použitím 0,403 ml ^{90}Y chloridu, 0,387 ml octanu sodného a 0,267 ml konjugátu. Odoberú sa 40 μl vzorky vo vyznačených časoch a formulujú sa formulačným pufrom. V oboch štúdiách sa uskutočňuje kontrolná reakcia 1 mCi použitím opísaných „štandardných podmienok“ (5-minútová reakcia).

2. Stanovenie rádiozačlenenia

Množstvo rádioaktivity spojené s konjugátmi sa stanoví opísaným spôsobom, s použitím obchodne dostupnej súpravy (obchodný produkt spoločnosti Biodex (Tec-Control Radiochromatographic Kit). Zvyčajne sa nanese 0,5 až 1 μl na dvojité prúžky pomocou mikropipety a vyvolá sa podľa priloženej inštrukcie Biodex. Rádioaktivita polovice prúžkov v sklenených skúmavkách sa zistí použitím gama-čítača Isodata s okienkom 100 až 1000 KeV. Radiačne značiace začlenenie sa vypočíta delením množstva rádioaktivity v hornej polovici prúžku celkovou aktivitou zistenou v oboch horných a spodných poloviciach. Táto hodnota je vyjadrená v percentách a vypočíta sa stredná hodnota.

3. Zistenie väzby

Vzorky sa analyzujú na percento väzby k pozitívnym bunkám CD20 podľa opísaného protokolu. V týchto vzorkách však nie sú zahrnuté negatívne kontrolné vzorky buniek HSB a bunky SB sa lyofilizujú v 5 ml liekovkách namiesto v mikroodstredivkových skúmavkách.

Všetky konečné formulované vzorky Y2B8 sa zriedia 1 : 100 riediacim pufrom (10,0 μl protilátky + 990 μl pufru). Protilátka sa potom znova zriedi na približnú koncentráciu 8 ng/ml pridaním 35 μl 1 : 100 zriedenie do 10 ml riediaceho pufru v 50 ml polypropylénovej skúmavke.

Šesť až sedem skúmaviek lyofilizovaných buniek sa rekonštituuje s SWFI a zhromaždí sa v 50 ml kužeľovej skúmavke. Rekonštituované bunky (0,5 ml) sa potom rozdelia na 3 rovnaké množstvá do troch 15 ml mikroodstredivkových skúmaviek a testujú sa 3 skúmavky na vzorku. Do troch prázdnych mikroodstredivkových skúmaviek sa pridá 0,5 ml riediaceho pufru. Do každej skúmavky sa pridá 0,5 ml protilátky, tesne sa uzavre a inkubujú sa 45 minút pri teplote miestnosti za miešania prevracaním. Po inkubácii sa bunky peletujú 5-minútovým odstredením a usadia sa „6“ (4000 x g) odstredením v mikroodstredivke Savant. Supernatanty vzoriek (0,75 ml) sa premiestnia do sklenených skúmaviek 12 x 75 mm na načítanie rádioaktivity použitím gama-čítača Isodata s nastavením okienka na 100 až 1000 KeV.

Rádioaktivita (B), viazaná na bunky, sa vypočíta odčítaním neviazanej rádioaktivity (supernatant) od celkovej dodanej rádioaktivity. Celková rádioaktivita sa stanoví z rádioaktivity načítanej v skúmavkách bez buniek. Percento väzby sa vypočíta vyjadrením viazanej rádioaktivity v percentách celkovej rádioaktivity.

Na minimalizáciu účinku variability od dávky k dávke lyofilizovaných buniek na posúdenie väzby, sú väzbové hodnoty normované na 1 mCi Y2B8 kontroly pripravenej použitím „štandardných“ podmienok značenia. Kontrolné vzorky sa pripravujú, ako je uvedené, pre každú skupinu pokusov.

D. Výsledky

1. Značenie v malom meradle na predpoveď príprav vo veľkej dávke

Na overenie, že reakcia značenia v malom meradle umožňuje predvídať prípravy vo veľkej (40 mCi) dávke, sa pripravujú dávky 1, 3, 10 a 40 mCi Y2B8 pomocou opísaného protokolu radiačného značenia. Tieto výsledky obsahuje tabuľka VI, ktorá dokladá, že zväčšovanie dávky reakčnej zmesi z 1 mCi na 40 mCi nepovplyvní nepriaznivo väzbu alebo rádiozačlenenie.

Tabuľka VI

Množstvo ^{90}Y mCi (mCi)	Kontrolné väzby (%)	Rádiozačlenenie (%)
1	100,0	99,2
3	102,0	99,1
10	98,6	99,0
40	98,2	99,0

2. Následok pridania menšieho objemu octanu sodného

Ak sa pripraví Y2B8 s použitím o 20 % menšieho objemu 50 mM octanu sodného a predĺžením času in-

kubácie o 60 %, zostane podstata väzby zachovaná, v porovnaní s radiačne označenou protilátkou pripravenou „štandardnými“ podmienkami značenia (tabuľka VII). I keď je značiaca reakcia uskutočnená za podmienok pondelkového značenia, > 89 % kontrolnej väzby zostane zachované. Podobné výsledky sa dosiahli pri piatkovej príprave dávky. Tieto odchýlky nemajú dosah na radiačné začlenenie, bez ohľadu na deň, kedy bola dávka pripravená.

3. Následok pridania nadmerného objemu ^{90}Y chloridu

Ak sa pripraví Y2B8 s použitím o 20 % väčšieho objemu ^{90}Y chloridu v kombinácii s inkubačným časom o 60 % dlhším, ako je normálne používané, zostane podstata väzby zachovaná, v porovnaní s kontrolou pripravenou „štandardnými“ podmienkami značenia (tabuľka VII). Ak je značiaca reakcia predĺžená na 8 minút, > 90 % väzby zostane zachované v porovnaní s kontrolou pri pondelkovej a piatkovej príprave dávky. Pridanie o 20 % väčšieho objemu ^{90}Y chloridu nemá dosah na rádiozačlenenie, bez ohľadu na deň, kedy bola dávka pripravená.

4. Následok pridania menšieho objemu protilátkového konjugátu

Ak sa pripraví Y2B8 s použitím o 20 % menšieho objemu konjugátu (2B8-MX-DTPA) a predĺžením času inkubácie o 60 %, nie je väzba významne ovplyvnená, v porovnaní s Y2B8 pripravenou „štandardnými“ podmienkami značenia (tabuľka VII). Pridanie o 20 % menej konjugátu neovplyvní radiačné začlenenie, bez ohľadu na deň, kedy bola dávka pripravená.

Tabuľka VII

Odchýlka značenia	Pondelková príprava dávky ^a		Piatková príprava dávky ^b	
	% väzbová kontrola ^b	% radiačného začlenenia	% väzbová kontrola ^b	% radiačného začlenenia
1) o 20 % menší objem octanu sodného 2) 60 % predĺženie reakčného času (8 min.)	89,4	99,1	92,5	98,7
1) o 20 % nadbytok objemu ^{90}Y 2) 60 % predĺženie reakčného času (8 min.)	90,6	99,1	91,8	98,6
1) o 20 % menší objem protilátky 2) 60 % predĺženie reakčného času (8 min.)	98,9	99,0	98,7	98,6

^a Pre pondelkovú prípravu dávky je koncentrácia ^{90}Y v reakčnom roztoku 17 mCi/ml; koncentrácia ^{90}Y pre piatkové značenie je 8 mCi/ml.

^b Hodnoty väzby normované na značenie protilátky podľa klinického dávkovacieho protokolu (RSDR-005) pri „štandardných objemoch a 5 minútovom reakčnom čase“.

5. Dosah kombinovanej odchýlky reakčného činidla

Ak sa pripraví Y2B8 s použitím protokolu, v ktorom sú uskutočnené všetky štyri odchýlky súčasne, zostáva väzba stále v podstate zachovaná v porovnaní s protilátkou pripravenou za „štandardných“ podmienok značenia (tabuľka VIII). Väzba je stále > 83 %, i keď pondelková príprava bola inkubovaná o 30 % dlhšie ako maximum 6 minút používané normálne. Rádiozačlenenie nie je týmito kumulatívnymi odchýlkami významne ovplyvnené, ani po 8 minútach inkubačného času, nezávisle od dňa prípravy dávky.

Tabuľka VIII

Pondelková príprava dávky		
Čas značenia	% väzbovej kontroly	% rádiozačlenenia
2	97,6	98,7
4	93,7	98,8
6	89,5	98,8
8	83,2	98,6
Piatková príprava dávky		
Čas značenia	% väzbovej kontroly	% rádiozačlenenia
2	98,6	99,0
4	98,5	99,2

6	96,0	99,1
8	92,1	99,1

V. Diskusia

Na zníženie žiarenia, ktorému je vystavená obsluha, sa vyhodnocujú menšie značkovacie reakcie namiesto príprav s plnou dávkou. Overilo sa preto, že značenie 1 mCi a 10 mCi, vyhodnotené v tejto štúdií, predpokladá prípravy s plnou dávkou 40 mCi. Výsledky dokladujú, že nie sú žiadne významné rozdiely vo viazaní a rádiozačlenení v rámci 1 mCi až 40 mCi.

Usúdilo sa, že 20 % objemové odchýlky pre octan sodný, ^{90}Y chlorid a konjugovanú protilátku predstavujú potenciálne extrémne odchýlky v protokole radiačného značenia. Ďalej inkubácia 8 minút (o 3 minúty dlhšie ako normálne) je považovaná za významnú odchýlku od protokolu. Všeobecne vplyvom krátkeho polčasu rozpadu ^{90}Y chloridu, sa bude meniť objem rádioizotopu v závislosti odo dňa prípravy dávky. Tieto pokusy opísané v tomto teste, boli uskutočnené s ^{90}Y chloridom pri koncentráciách zodpovedajúcich pondelkovej a piatkovej príprave dávky reprezentujúcej celý rozsah možných príprav dávky.

Dávky Y2B8 pripravené s použitím o 20 % menšieho objemu octanu sodného a inkubované 8 minút si zachovali významnú väzbu (> 89 %) v porovnaní so štandardnými podmienkami značenia. Podobné výsledky boli získané pre dávky pripravené v pondelok a v piatok. Táto odchýlka v objeme octanu sodného začlenenie radiácie neovplyvnila.

Pridanie o 20 % väčšieho objemu ^{90}Y chloridu a inkubácia až 8 minút znížilo väzbu proti podmienkam štandardnej prípravy dávky, tak v pondelok, ako aj v piatok. Ale bola stále > 90 %, čo je nad normovanú špecifikáciu uvoľňovania. Väzba bola trochu lepšia pri piatkovej príprave dávky. Rádiozačlenenie nebolo významne ovplyvnené zvýšeným objemom ^{90}Y chloridu.

Na vyhodnotenie dosahu súčasného výskytu všetkých objemových odchýlok boli pondelkové a piatkové dávky pripravené na porovnanie 2, 4, 6 a 8 minútové inkubačné časy. Iba pri príprave Y2B8 v pondelok pri 8-minútovom inkubačnom čase väzba nebadane poklesne proti normovanej špecifikácii (83,2 % v porovnaní so špecifikáciou normovaného uvoľňovania 86,3 %).

Priemyselná využiteľnosť

Súprava na jednoduchú a rýchlu prípravu liečiva značeného rádioizotopmi, špeciálne ^{90}Y so zachovanými vlastnosťami značených drog počas týždňa.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob rádioizotopového označenia chelatačným činidlom konjugovaného proteínu alebo peptidu s ^{90}Y , kde ^{90}Y označený proteín alebo peptid má úroveň rádiozačlenenia vyššiu ako 95 %, špecifickú aktivitu väčšiu ako 5mCi/mg, a väzbovú špecifickosť aspoň 50 % a je vhodný na podávanie pacientovi bez ďalšieho čistenia, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že

(i) sa zmieša chelatačné činidlo konjugovaného proteínu alebo peptidu s roztokom obsahujúcim ^{90}Y alebo jeho soľ, a

(ii) zmes sa inkubuje po menej ako osem minút pri teplote medzi 25°C až 43°C, pH medzi 3,0 a 6,0, v necitrátovom pufri.

2. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že proteínom je protilátka alebo fragment protilátky.

3. Spôsob podľa nároku 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že fragment protilátky sa vyberie zo skupiny skladajúcej sa z fragmentov Fab, F(ab')₂ a Fv.

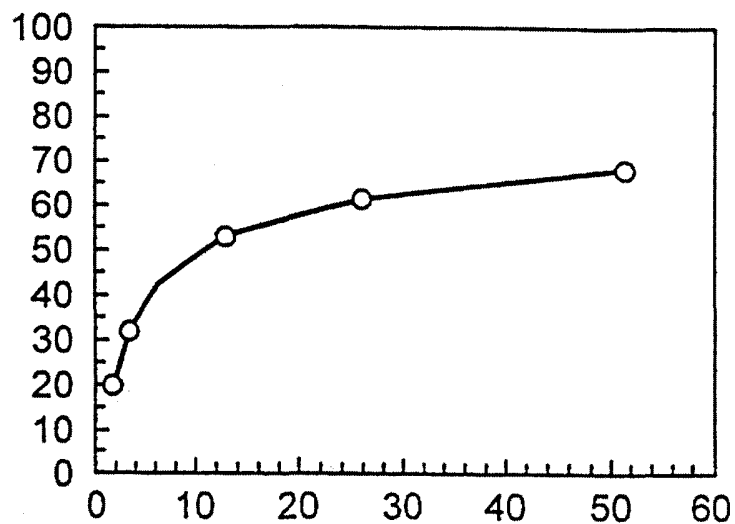
4. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že čas inkubácie je v rozmedzí 2 až 5 minút.

5. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že chelatačným činidlom je bifunkčné chelatačné činidlo vybrané zo súboru, ktorý sa skladá z kyseliny (p-izotiokyanotobenzyl)-6-metyldietyléntriamín-pentaoctovej (MX-DTPA), kyseliny fenyl-dietyléntriamín-pentaoctovej (fenyl-DTPA), kyseliny benzyl-dietyléntriamín-pentaoctovej (benzyl-DTPA), kyseliny cyklohexyl-dietyléntriamín-pentaoctovej (CHX-DTPA), kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklotetradekán-1,4,7,10-tetraoctovej (DOTA) a ich derivátov.

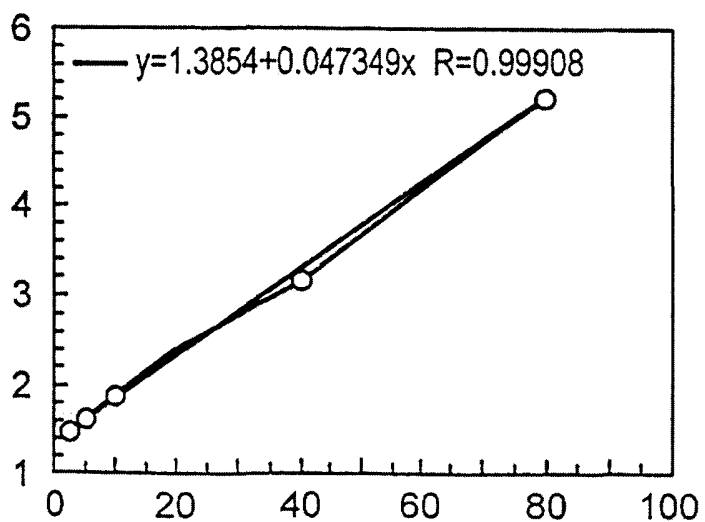
6. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že chelatačným činidlom je MX-DTPA.

7. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že prijateľná hodnota pH je 4,2.

8. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že prijateľným pufrom je acetánový pufer.
9. Spôsob podľa nároku 8, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že pufrom je octan sodný s koncentráciou v rozmedzí 10 až 1000 mM.
- 5 10. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že prijateľný pufer obsahuje benígny rádioprotektant.
11. Spôsob podľa nároku 10, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že benígny rádioprotektant je askorbát.
12. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že väzbová špecifickosť je aspoň 70 %.
- 10 13. Spôsob podľa nároku 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zmes podľa (ii) sa inkubuje pri pH 4,2.
14. Spôsob podľa nároku 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že molárny pomer chelatačného činidla k peptidu alebo proteínu je $1^{1/2} : 1$.
15. Spôsob podľa nároku 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že čas inkubácie je v rozmedzí 2 až 5 minút.
- 15 16. Spôsob podľa nároku 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že proteín je protilátka 2B8, protilátka, ktorá je produkovaná hybridomnými bunkami nanesenými ako ATTC depozit č. HB 11388.
17. Spôsob podľa nároku 16, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že chelatačným činidlom je MX-DTPA.
18. Spôsob podľa nároku 17, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa dosiahne úroveň rádiozačlenenia vyššieho ako 96 %.
- 20 19. Spôsob podľa nároku 17, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že čas inkubácie je v rozmedzí 2 až 8 minút.



Obr. 1A



Obr. 1B

Koniec dokumentu