(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102596258 B
(45)授权公告日 2015.01.28

(21)申请号 201080036704.4
(22)申请日 2010.07.22
(30)优先权数据
61/227,710 2009.07.22 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.02.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/042885 2010.07.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/011592 EN 2011.01.27
(73)专利权人 锕医药股份有限公司
地址 美国新泽西
(72)发明人 J·西蒙 A·G·金
J·M·莫兰诺贝穆德斯
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 罗菊华
(51)Int.Cl.
A61K 51/00(2006.01)

(56)对比文件
US 2002/0058007 A1,2002.05.16,
US 2002/0058007 A1,2002.05.16,
US 2003/0086868 A1,2003.05.08,

审查员 张丽芳

权利要求书2页 说明书30页 附图13页

(54)发明名称

用于制备放射性免疫缀合物的方法

(57)摘要

本发明公开制备包含单克隆抗体(mAb)(IgG)的放射性缀合物的方法。所述的Ac-225放射性免疫缀合物为[Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTAIHuM195放射性免疫缀合物。

CN 102596258 B

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

(a) 在缀合反应混合物中，使螯合试剂与生物分子缀合，从而制备缀合的生物分子，其中所述的缀合反应混合物包含磷酸盐缓冲剂，

(b) 纯化所述的反应混合物以便除去未缀合的螯合试剂，其中所述的纯化包括使所述的缀合反应混合物通过过滤器过滤以便纯化所述的缀合的生物分子，并且其中所述过滤是在 HEPES 缓冲剂或 NaAc 缓冲液中进行的，以及

(c) 在螯合反应混合物中，使一个或多个 Ac-225 放射性核与所述的缀合的生物分子螯合，从而制备 Ac-225 放射性缀合物，其中将终止螯合剂二乙烯三胺五乙酸 (DTPA) 加入到所述的螯合反应混合物中，并且在 37℃下将所述的螯合反应混合物温育 30 分钟，其中所述 Ac-225 放射性缀合物的产率为至少 84％，

其中所述螯合试剂为 S-2-(4- 异硫氰基苄基)-1,4,7,10 四氮杂环十二烷四乙酸 (p-SCN-Bn-DOTA)，所述生物分子为林妥珠单抗 HuM195。

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

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

4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的缀合反应混合物包含碳酸氢盐缓冲剂。

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

6. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的过滤包括分子量阻隔为至少 10,000Da。

7. 权利要求 6 所述的方法，其中所述的过滤包括分子量阻隔为至少 20,000Da。

8. 权利要求 7 所述的方法，其中所述的过滤包括分子量阻隔为至少 40,000Da。

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

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

11. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的在步骤 (c) 中的螯合包括在 37℃下将所述的一个或多个 Ac-225 放射性核与所述的缀合的生物分子温育 1.5 小时。

12. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的放射性缀合物为放射性免疫缀合物。

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

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

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

(c) 在 37℃下，在包含龙胆酸以及 pH 为 5.5 至 7.0 的螯合反应混合物中，使一个或多个锕 -225 放射性核与所述的 p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 免疫缀合物螯合 1.5 小时，从而制备 [Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 放射性免疫缀合物，其中所述 [Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 放射性免疫缀合物的产率为至少 84％，

(d) 将 DTPA 加入到所述的螯合反应混合物中，以及

(e) 在 37℃下将所述的螯合反应混合物温育 30 分钟。

14. 权利要求 13 所述的方法，其中步骤 (b) 中所述过滤器的分子量阻隔为至少 20,000Da。

15. 权利要求 14 所述的方法，其中步骤 (b) 中所述过滤器的分子量阻隔为至少 40,000Da。

16. 权利要求 1 或权利要求 13 所述的方法，进一步包括在所述的步骤 (b) 的过滤之前通过尺寸排阻树脂的尺寸排阻色谱的步骤。

17. 权利要求 16 所述的方法，其中所述的尺寸排阻树脂的体积排阻极限为 5000Da。

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

19. 权利要求 13 所述的方法，进一步包括通过尺寸排阻树脂的尺寸排阻色谱纯化所述的 [Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 放射性免疫缀合物。

20. 权利要求 18 或 19 所述的方法，其中所述的尺寸排阻树脂的尺寸排阻极限为 6000Da。

21. 权利要求 18 或 19 所述的方法，其中所述的尺寸排阻树脂的尺寸排阻极限为 5000Da。

22. 通过权利要求 1 或权利要求 13 所述的方法制备的 Ac-225 放射性免疫缀合物。

用于制备放射性免疫缀合物的方法

[0001] 本专利公开包含受到版权保护的材料。版权所有人不反对美国专利及商标局的专利文件或记录中出现的对专利文件或专利公开的传真复制，但除此之外任何情况下均保留任何及所有的版权。

[0002] 本文提及的所有公开、专利申请、专利和其他文献均以引用方式全文并入本文。本文所指出的专利和科学文献建立了本领域的技术人员可利用的知识。本文所引用的专利公开、申请和其他公开以引用方式并入本文，如同每一份文献均以引用方式具体且单独地指出并入本文。在矛盾的情况下，以专利公开为准。

背景技术

[0003] 在诊断和治疗医学过程中可以使用放射性免疫缀合物。放射性药物可以携带至少一种与载体结合的放射性核，例如靶向部分。放射性核可以产生可通过放射学诊断设备检测的信号。由于放射性核发出的辐射对组织具有毒性作用，所以放射学免疫缀合物可以用于取得一种或多种治疗作用。当定位于肌体中的特定结构或位点处的放射性免疫缀合物用作治疗试剂时，其可以用于将放射性免疫缀合物的作用集中在待治疗的结构或位点中，并且可以减少肌体中其他结构和位点处的有害作用。例如，放射性免疫缀合物可以用作杀死癌组织的化疗药品。需要用于制备放射性免疫缀合物的改善的方法。本发明解决了这种需要。

[0004] 发明概述

[0005] 在一个方面中，本文所述的方法涉及制备锕 -225(Ac-225) 放射性缀合物的方法，该方法包含以下步骤 :(a) 在缀合反应混合物中，使螯合试剂与生物分子缀合，从而制备缀合的生物分子 ;(b) 纯化所述的反应混合物从而除去未缀合的螯合试剂 ;以及 (c) 在螯合反应混合物中，使一个或多个 Ac-225 放射性核与缀合的生物分子螯合，从而制备 Ac-225 放射性缀合物。

[0006] 在一个实施方案中，步骤 (a) 中的缀合包含在大约 37℃下将缀合反应混合物温育 1.5 小时。在另一个实施方案中，步骤 (a) 中的缀合包含在大约 16℃至大约 20℃下将缀合反应混合物温育大约 24 小时。

[0007] 在另一个实施方案中，纯化包含使缀合反应混合物通过过滤器过滤以便纯化缀合的生物分子。

[0008] 在一个实施方案中，缀合反应混合物包含碳酸氢盐缓冲剂。在另一个实施方案中，缀合反应混合物包含磷酸盐缓冲剂。在另一个实施方案中，缀合反应混合物的 pH 为大约 8.0 至大约 9.2。

[0009] 在一个实施方案中，过滤是在 HEPES 缓冲剂中进行的。在另一个实施方案中，过滤是在 NaAc 缓冲剂中进行的。在另一个实施方案中，过滤包含阻隔的分子量为至少大约 10,000Da、至少大约 20,000Da 或者至少大约 40,000Da。

[0010] 在一个实施方案中，螯合反应混合物包含龙胆酸或抗坏血酸。

[0011] 在另一个实施方案中，螯合反应混合物的 pH 为大约 5.5 至大约 7.0。

[0012] 在另一个实施方案中，步骤 (a) 中的螯合包括在大约 37℃下将一个或多个 Ac-225 放射性核与缀合的生物分子温育大约 1.5 小时。

[0013] 在另一个实施方案中，所述的方法进一步包括将终止螯合剂加入到螯合反应混合物中的步骤。在一个实施方案中，终止螯合剂为二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)。在另一个实施方案中，所述的方法进一步包括在加入终止螯合剂的步骤之后在大约 37℃下将螯合反应混合物温育大约 30 分钟的步骤。

[0014] 在一个实施方案中，所述的生物分子包含蛋白质、肽、多核苷酸、它们的组合或者它们的衍生物。

[0015] 在一个实施方案中，所述的生物分子为抗体、其抗原结合片段、包含抗体的抗原结合多肽序列的单链蛋白质、单一结构域抗体、之前所述的任何一种物质的类似物或者之前所述的任何一种物质的衍生物。在另一个实施方案中，抗原结合片段为单克隆抗体的可变区。在另一个实施方案中，所述的生物分子为包含抗体的抗原结合序列的蛋白质。在另一个实施方案中，所述的生物分子为天然、合成或重组产生的蛋白质，该蛋白质包含与细胞表面上的抗原结合的抗体的抗原结合序列。在另一个实施方案中，靶向细胞的表面上的抗原为 CD-33。在另一个实施方案中，所述的生物分子为 HuM195。

[0016] 在一个实施方案中，所述的放射性缀合物为放射性免疫缀合物。

[0017] 在另一个实施方案中，所述的螯合试剂为双功能螯合试剂。在一个实施方案中，所述的双功能螯合试剂为 S-2-(4- 异硫氰基苄基)-1,4,7,10 四氮杂环十二烷四乙酸 (p-SCN-Bn-DOTA)。在另一个实施方案中，所述的螯合试剂选自二乙烯三胺五乙酸 (″ DTPA″)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -N,N′ ,N″ ,N′ ″ - 四乙酸 (″ DOTA″)；p- 异硫氰基苄基 -1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7,10- 四乙酸 (″ pSCN-Bz-DOTA″)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -N,N′ ,N″ - 三乙酸 (″ DO 3A″)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7,10- 四 (2- 丙酸)(″ DOTMA″)；3,6,9- 三氮杂 -12- 氧杂 -3,6,9- 三羧基亚甲基 -10- 羧基 -13- 苯基 - 十三 - 烷酸 (″ B-19036″)；1,4,7- 三氮杂环壬烷 -N,N′ ,N″ - 三乙酸 (″ NOTA″)；1,4,8,11- 四氮杂环十四烷 -N,N′ ,N″ ,N′ ″ - 四乙酸 (″ TETA″)；三乙烯四胺六乙酸 (″ TTHA″)；反式 -1,2- 已二胺四乙酸 (″ CYDTA″)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1-(2- 羟基丙基)4,7,10- 三乙酸 (″ HP-DO 3A″)；反式 - 环己烷 - 二胺四乙酸 (″ CDTA″)；反式 -(1,2)- 环己烷二乙烯三胺五乙酸 (″ CDTPA″)；1- 氧杂 -4,7,10- 三氮杂环十二烷 -N,N′ ,N″ - 三乙酸 (″ OTTA″)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7,10- 四 {3-(4- 羧基 1)- 丁酸 }；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7,10- 四 (乙酸 - 甲基胺)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7,10- 四 (亚甲基膦酸)；2,2′ ,2″ -(10-(2-(2,5- 二氧代吡咯烷 -1- 基氧基)-2- 氧代乙基)-1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7- 三基) 三乙酸 (DOTA-NHS 酯)；以及它们的衍生物、类似物和混合物。

[0018] 在另一个方面中，本文所述的方法涉及用于制备 [Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 放射性免疫缀合物的方法，该方法包含以下步骤：(a) 在大约 37℃下，在包含碳酸氢盐缓冲剂和 pH 为大约 8.0 至大约 9.2 的缀合反应混合物中，使 p-SCN-Bn-DOTA 与 HuM195 抗体缀合大约 1.5 小时，从而制备 p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 免疫缀合物；(b) 使缀合反应混合物通过过滤器过滤，该过滤器阻隔的分子量为至少大约 10,000Da、至少大约 20,000Da 或者至少大约 40,000Da，以便纯化 p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 免疫缀合物，其中所述的过滤是使

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

[0019] 在某些实施方案中，本文所述的方法进一步包含在步骤 (b) 的过滤之后通过体积排阻树脂进行的体积排阻色谱的步骤。在一个实施方案中，体积排阻树脂的体积排阻极限为大约 5000Da。

[0020] 在某些实施方案中，本文所述的方法进一步包含使用体积排阻树脂通过体积排阻色谱纯化放射性缀合物或 [Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/HuM195 放射性免疫缀合物。在一个实施方案中，体积排阻树脂的体积排出极限为大约 6000Da。在另一个实施方案中，体积排阻树脂的体积排阻极限为大约 5000Da。

[0021] 在另一个方面中，本发明涉及通过本文所述的方法制备的放射性免疫缀合物。

[0022] 附图简述

[0023] 图 1A 粉色的为天然 Hum-195 的 UV 光谱，蓝色的为 Hum-195/DOTA 的 UV 光谱。两种溶液的溶液的浓度均为大约 100μg/mL；使用 1cm 的光路的小玻璃管测量吸光率。

[0024] 图 1B HSA(0.1 %，绿色)、天然 Hum-195(100μg/mL，粉色) 以及 DTPA/NaAc(100μg/mL) 的 UV 光谱。

[0025] 图 2 天然 Hum195 的 SE-HPLC/UV 色谱。

[0026] 图 3 使用用于定量 HuM-195 的 UV 检测器校准 HPLC。

[0027] 图 4 所述缀合物的 SE-HPLC/UV 色谱。

[0028] 图 5 在 HuM-195 的定量中用于校准 UV 分光光度计的典型校准曲线，波长＝ 280nm。

[0029] 图 6 使用 Ac-225 标记的缀合物（在纯化之后的主要蛋白质级份）的 SE-HPLC/rad 色谱。

[0030] 图 7 包含游离的或 DTPA 结合的 Ac-225 的 SE-HPLC/rad 色谱。

[0031] 图 8 在 P-10 柱和反应器小瓶 +QC 中纯化之后在液体级份中 Ac-225 的典型活力分布（总的活力为 1.2mCi Ac-225)。

[0032] 图 9 在高分辨率 Ge 检测器上 Ac-225 和继承元素的典型 γ 光谱。

[0033] 图 10 使用 CHCA 作为基质溶液的天然 Hum195 的典型 MALDI 光谱。

[0034] 图 11 使用 CHCA 作为基质溶液的缀合物的典型 MALDI 光谱。

[0035] 图 12 一步及两步制备物的 PAGE Gel 电泳，其显示出了用于计数分析的阻隔的凝胶部分。

[0036] 图 13 在各个阻隔的凝胶部分中的活力。结果符合结合有 HuM-195 的 Ac-225 的大量百分率。对于一步配制物和两步配制物而言，结果是一致的。

[0037] 图 14PAGE Gel 电泳用于分析对照和使用一步方法得到的制备物。以与一步过程相同的方式制备对照，但是所述的抗体在与 Ac-225 螯合之前并未与 DOTA 双功能螯合试剂缀合。与一步制备物相反，对照制备物显示出极少量的 Ac-225 与 HuM-195 结合。

[0038] 发明详述

[0039] 本发明提供了用于制备放射性免疫缀合物的方法。在一个方面中，本发明涉及用

于标记单克隆抗体 (mAb)(IgG) 的改善的方法。在一个实施方案中，所述的方法为“后标记或一步方法”。

[0040] 在一个方面中，本文所述的方法涉及用于制造放射性免疫缀合物的一步缀合后螯合的方法。在一个实施方案中，所述的放射性免疫缀合物为 [Ac-225]-p-SCN-Bn-DOTA/IgG(HuM195) 构建体。

[0041] 本文所述的放射性免疫缀合物可以通过首先形成缀合的靶向部分、然后使放射性核与缀合的靶向部分螯合从而形成放射性免疫缀合物来制备。所述的缀合的靶向部分可以在与靶向部分缀合后的任何时间进行放射性标记。

[0042] 在一个实施方案中，mAb 首先与 DOTA 双功能螯合试剂缀合，然后经纯化的缀合物使用 Ac-225 标记。根据本文所述的一些实施方案，仅需要单一的一步涉及 ^{225}Ac 来标记生物分子。本文所述的方法优于两步或重标记方法的益处包括但不限于符合较高的标记产率、简单以及较短的标记时间。此外，与两步或重标记方法相比，本文所述的方法的升级可以更容易地进行。此外，本文所述的方法可以用于制备试剂盒配制物，其中可以在临床位点处形成最终的放射性标记。

[0043] 在一个实施方案中，HuM-195/p-SCN-Bn-DOTA 缀合物可以通过使 HuM-195 的浓缩溶液与 p-SCN-Bn-DOTA 在 pH 为大约 8 至大约 9 下在碳酸氢盐或磷酸盐缓冲剂中反应、并在大约 37℃或室温下温育来制备。在另一个实施方案中，生物缀合物可以由过量的生物功能螯合剂通过重复过滤或离心、并通过比重体积排阻色谱 (SEC) 来纯化。在纯化方法过程中，所述的碳酸氢盐或磷酸盐缓冲剂被改变为 N-2- 羟基乙基哌嗪 -N-2- 乙磺酸 (HEPES ;游离酸) 或醋酸盐介质。缀合物可以通过体积排阻高效液相色谱 (SE-HPLC) 来表征。

[0044] 为了进行标记，在少量游离的自由基清除剂存在下，将 HuM-195 和 ^{225}Ac 溶液在醋酸盐缓冲剂中形成的 pH 为大约 5.5 至大约 7.0 的混合物中温育大约 80 至大约 90 分钟。在反应并使用 DTPA 攻击后，可以通过瞬时薄层色谱 (ITLC) 测定标记产率。然后可以通过比重体积排阻色谱 (SEC) 来纯化样品混合物。在纯化的蛋白质级份中，可以分别通过无损高分辨率 γ 光谱测定法以及 UV 分光光度法来测量 ^{225}Ac 和蛋白质的量。通过 ITLC 和 / 或 SE-HPLC 测量纯化级份中的放射化学纯度。

[0045] 在一个方面中，本发明包含具有 CD33 靶向部分的放射性免疫缀合物。根据本发明，靶向部分可以为合成或天然的蛋白质、或其一部分或其变体 (包括物种、等位基因及突变体变体)。在一些实施方案中，靶向部分包含抗体部分。

[0046] 使用本文所述的方法制备的放射性免疫缀合物可以用于诊断或治疗医学过程中。例如，所述的放射性药物可以用作成像造影剂以便产生 PET 或其他 X 光线照相术的图像。备选地，所述的放射性药物可以用作将一定剂量的射线传递至肌体中的生理学活性的特定结构或位点处的治疗试剂。本领域的技术人员将理解所述的放射性药品的其他药物用途。

[0047] 在另一个方面中，本发明提供了用于治疗受试对象中的癌症的方法，该方法包含向所述的受试对象给药药物有效量的放射性免疫缀合物。

[0048] 在另一个方面中，本发明提供了用于治疗受试对象中的癌症的方法，该方法包含向所述的受试对象给药药物有效量的药物组合物，其中所述的组合物包含与细胞表面上的 CD33 分子特异性地结合的放射性免疫缀合物。

[0049] 定义

[0050] 除非另作说明，如本文以及所附的权利要求书中所用，单数形式“a”、“an”和“the”包括多个所指的事物。

[0051] 术语“大约”在本文中用于指近似地，在大体上或附近的范围内。当术语“大约”与数字范围结合使用时，其通过向上及向下延伸所列数值的边界来修改所述的范围。术语“大约”在本文中用于指将所述的值向上及向下改变 20％来修改数值。

[0052] 如本文所用，术语“纯度”是指在混合物中基本存在单一的化学实体或者缺乏大量的污染物。

[0053] 使用标准的分析方法，例如高效液相色谱 (HPLC) 或过滤器纯化，来测量通过所公开的方法制备的缀合分子的纯度。当通过测定缀合的靶向部分或放射性免疫缀合物的量来测量纯度时，该纯度可以高于大约 70％、高于大约 80％，高于大约 90％，高于大约 95％，高于大约 96％，高于大约 97％，高于大约 98％或者高于大约 99％。当通过测定污染物的量来测量纯度时，诸如未缀合的螯合试剂之类的污染物可以少于大约 20％、少于大约 10％或者少于大约 1％。

[0054] 如本文所用，术语“生物分子”是指含碳分子（包含高分子），并且包含在生物学系统中发现的任何已知的分子，包含氨基酸、抗体、蛋白质、肽、核酸（包含 DNA 和 RNA）、糖类、多糖等。生物分子包含天然形成的以及此类分子的衍生物、类似物和修饰物的那些。此外，所述的术语是指含碳分子，例如药物、抗生素以及在医学中使用的那些等。不能在自然界中找到的包含修饰的碱基的核酸类似物被包含在生物分子的范围内。简言之，在自然界中发现的分子的任何类似物或者此类分子的任何化学修饰物也都包含在生物分子的定义内。生物分子可以由自然界来源分离得到或者在试验室中合成，例如合成的蛋白质、合成的肽或寡核苷酸。

[0055] 如本文所用，术语“靶向部分”是指起到识别特定的生物学靶向位点的任何蛋白质、抗体、抗体片段、激素、肽、生长因子、抗原、半抗原或任何其他载体。抗体及抗体片段是指任何多克隆、单克隆、嵌合、人、哺乳动物、单链、二聚以及四聚抗体或抗体片段。当此类生物学载体与官能化的络合物连接时，其起到将所连接的放射性核携带至特定的靶向组织中的作用。

[0056] 术语“抗体”是指任何多克隆、单克隆、嵌合抗体或异种抗体。在本发明的放射性核缀合物中使用的抗体为对所需的癌细胞具有高特异性的单克隆抗体。在本发明中使用的抗体可以定向针对（例如）癌、肿瘤、白血病、自身免疫紊乱，这些紊乱与免疫系统的细胞、需要被消融的正常细胞（例如骨髓和前列腺组织）、病毒感染的细胞（包括 HIV、支原体、分化及其他细胞膜抗原、病原体表面抗原以及任何生物学活性分子）有关。

[0057] 适用于本文所述的方法的抗体的一些实例包括但不限于 HuM195（抗 -CD 33），CC-11，CC-46，CC-49，CC-49F(ab′)$_2$，CC-83，CC-83F(ab′)$_2$ 和 B72.3。抗体片段包括 Fab 片段、F(ab′)$_2$ 片段以及对所需的一个或多个抗原决定部位具有特定性的抗体的任何部分。可以在本发明的放射性核缀合物中使用的抗体可以通过本领域公知的技术来制备。高特异性单克隆抗体可以通过本领域公知的杂交技术来制备，例如参见 Kohler and Milstein，Nature，256，495-497(1975) 和 Eur. J. Immunol.，511-519(1976)。

[0058] 如本文所用，术语“放射性缀合物”是指使用放射性核标记的生物分子缀合物（例如其中蛋白质缀合物的螯合试剂部分形成了具有放射性核的络合物的一类）。

[0059] 如本文所用，术语“放射性免疫缀合物”是指使用放射性核标记的靶向部分缀合物（例如其中蛋白质缀合物的螯合试剂部分形成了具有放射性核的络合物的一类）。

[0060] 当形成本文所述的放射性免疫缀合物时，有利的是螯合和缀合度较高。

[0061] 如本文所用，术语“缀合度”和“缀合产率”可交换使用，并且被定义为与靶向部分成功缀合的螯合剂除以在缀合反应中使用的全部螯合剂的百分率。当形成所述反应的缀合靶向部分时，缀合百分率高于50％、高于70％、高于90％、高于95％、高于大约96％、高于大约97％、高于大约98％、或者高于大约99％。

[0062] 如本文所用，术语“螯合度”和“螯合产率”可交换使用，并且被定义为与缀合的靶向部分功能螯合的放射性核除以在螯合反应中使用的全部放射性核的百分率。当形成所述反应的放射性免疫缀合物时，缀合百分率高于50％、高于70％、高于90％、高于95％、高于大约96％、高于大约97％、高于大约98％、或者高于大约99％。

[0063] 如本文所述，产生的缀合度和螯合度可以取决于放射性免疫缀合物制备方法的一个或多个参数。

[0064] 根据本文所述的方法，靶向部分可以溶解于包含螯合剂的缓冲溶液中。可以选择pH以便优化在缀合反应混合物中用于使螯合剂与靶向部分缀合的条件。在一个实施方案中，缀合反应混合物可以包含碳酸氢盐缓冲剂。在另一个实施方案中，缀合反应混合物可以包含磷酸盐缓冲剂。在另一个实施方案中，缀合反应混合物的pH可以为大约8.0至大约9.2。例如，缀合反应混合物的pH可以为大约8.0、大约8.1、大约8.3、大约8.4、大约8.5、大约8.6、大约8.7、大约8.8、大约8.9、大约9.0、大约9.1或者大约9.2。此外，还可以调节缀合反应混合物的温度，以便促进螯合剂与靶向部分的缀合。在一个实施方案中，可以在大约37℃的温度下温育缀合反应混合物。在另一个实施方案中，可以将缀合反应混合物温育大约1.5小时。

[0065] 在另一个实施方案中，缀合的靶向部分可以溶解于包含放射性核的缓冲溶液中。可以选择pH以便优化在螯合反应混合物中用于使放射性核与缀合的靶向部分螯合的条件。在一个实施方案中，螯合反应混合物可以包含龙胆酸。在另一个实施方案中，螯合反应混合物的pH可以为大约5.5至大约7.0。例如，螯合反应混合物的pH可以为大约5.5、大约5.6、大约5.7、大约5.8、大约5.9、大约6.0、大约6.1、大约6.2、大约6.3、大约6.4、大约6.5、大约6.6、大约6.7、大约6.8、大约6.9或者大约7.0。

[0066] 此外，还可以调节螯合反应混合物的温度，以便促进放射性核与缀合的靶向部分的螯合。在一个实施方案中，可以在大约37℃的温度下温育螯合反应混合物。在另一个实施方案中，可以将螯合反应混合物温育大约1.5小时。在一段时间后，可以通过加入淬火螯合物（例如二乙烯三胺五乙酸(DTPA)）使所述的溶液淬火，并可以纯化反应混合物。在一个实施方案中，在加入淬火螯合物之后，可以进一步温育螯合反应混合物。在一个实施方案中，在加入淬火螯合物之后，可以将螯合反应混合物进一步温育大约30分钟。在另一个实施方案中，在加入淬火螯合物之后，可以将螯合反应混合物在大约37℃下进一步温育。

[0067] 螯合剂

[0068] 双功能螯合剂为具有双重功能的化合物，所述的功能为螯合金属离子，以及与具有肿瘤细胞抗原决定部位或抗原的特异性的生物学载体共价结合的能力。当此类化合物与（例如）放射活性金属粒子络合并且与特定的抗体共价链接时，可用于治疗和诊断应用

中。这些类型的络合物可以用于将放射活性金属携带至肿瘤细胞处，该肿瘤细胞被所述的连接抗体的特异性所靶向［例如参见 Mears et al.，Anal.Biochem.142,68-74(1984)；Krejcarek et al.，Biochem.And Biophys.Res.Comm.77,581-585(1977)］。

[0069] 大量的螯合剂是本领域已知的。例如参见 Pitt et al.，″ The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload,″ In,INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE ;Martell, Ed. ;American Chemical Society, Washington, D.C., 1980,pp.279-312 ;Lindoy,THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES ;Cambridge University Press, Cambridge,1989 ;Dugas, BIOORGANIC CHEMISTRY ;Springer-Verlag, New York,1989，并且这些文献包含在本文中。

[0070] 适用于制备本文所述的放射性免疫缀合物的示例性螯合剂包括但不限于以下螯合剂，例如 S-2-(4- 异硫氰基苄基)-1,4,7,10- 四氮杂环十二烷四乙酸 (p-SCN-Bn-DOTA)；二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)；乙烯二胺四乙酸 (EDTA)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -N, N′ , N″ , N′ ″ - 四乙酸 (DOTA)；p- 异硫氰基苄基 -1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7,10- 四乙酸 (p-SCN-Bz-DOTA)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -N,N′ ,N″ - 三乙酸 (DO 3A)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7,10- 四 (2- 丙酸)(DOTMA)；3,6,9- 三氮杂 -12- 氧杂 -3,6,9- 三羧基亚甲基 -10- 羧基 -13- 苯基 - 十三烷酸 (″ B-19036″)；1,4,7- 三氮杂环壬烷 -N, N′ ,N″ - 三乙酸 (NOTA)；1,4,8,11- 四氮杂环十四烷 -N,N′ ,N″ ,N′ ″ - 四乙酸 (TETA)；三乙烯四胺六乙酸 (TTHA)；反式 -1,2- 己二胺四乙酸 (CYDTA)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1-(2- 羟基丙基)4,7,10- 三乙酸 (HP-DO 3A)；反式 - 环己烷 - 二胺四乙酸 (CDTA)；反式 -(1,2)- 环己烷二乙烯三胺五乙酸 (CDTPA)；1- 氧杂 -4,7,10- 三氮杂环十二烷 -N,N′ , N″ - 三乙酸 (OTTA)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7,10- 四 {3-(4- 羧基 1)- 丁酸 }；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7,10- 四 (乙酸 - 甲基胺)；1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -1,4,7,10- 四 (亚甲基膦酸)；以及它们的衍生物。

[0071] 放射性核

[0072] 与缀合的靶向部分络合的放射性核可以得自任何合适的金属放射性同位素，包括但不限于锕 -225，砹 -211，碘 -120，碘 -123，碘 -124，碘 -125，碘 -126，碘 -131，碘 -133，铋 -212，砷 -72，溴 -75，溴 -76，溴 -77，铟 -110，铟 -111，铟 -113m，镓 -67，镓 -68，锶 -83，锆 -89，钌 -95，钌 -97，钌 -103，钌 -105，汞 -107，汞 -203，铑 -186，铑 -188，碲 -121m，碲 -122m，碲 -125m，铥 -165，铥 -167，铥 -168，锡 -94m，锡 -99m，氟 -18，银 -111，铂 -197，钯 -109，铜 -62，铜 -64，铜 -67，磷 -32，磷 -33，钇 -86，钇 -90，铱 -47，钐 -153，镥 -177，铑 -105，镨 -142，镨 -143，铽 -161，钬 -166，金 -199，钴 -57，钴 -58，铬 -51，铁 -59，硒 -75，铊 -201 和镱 -169。

[0073] 获得 225Ac 放射性核的方法对于本发明而言不是重要的。例如，可以在回旋加速器中制备 225Ac。可以由 Department of Energy(DOE), U.S.A.，和 Institute for Transuranium Elements(ITU), Karlsruhe, Germany 得到纯的 225Ac。

[0074] 纯化

[0075] 在某些实施方案中，本文所述的方法包含将缀合的靶向部分或放射性免疫缀合物与反应混合物的其他组分分离的一个或多个步骤。在一个实施方案中，可以将混合物转移至具有特定的分子量阻隔的过滤装置 (例如 Millipore 离心装置) 中，使得反应混合物

过滤通过过滤装置可以将缀合的靶向部分或放射性免疫缀合物与反应混合物的其他组分分离。在一个实施方案中，过滤反应混合物可以用于得到纯度为至少大约 60％、至少大约 65％、至少大约 70％、至少大约 75％、至少大约 80％、至少大约 85％、至少大约 90％、至少大约 95％、至少大约 97％、至少大约 98％、至少大约 99％或者至少大约 99.5％的缀合的靶向部分或放射性免疫缀合物。

[0076] 在多个实施方案中，缀合的靶向部分或者放射性免疫缀合物的产率为至少大约 70％、至少大约 75％、至少大约 80％、至少大约 85％、至少大约 90％、至少 95％、至少 96％、至少 97％、至少 98％或者至少 99％的终产物。

[0077] 靶向部分

[0078] 本文所述的靶向部分可以包含由免疫球蛋白质基因或者免疫球蛋白质基因的片段大部分或部分编码的一种或多种多肽。所识别的免疫球蛋白质基因包含 κ、λ、α、γ、δ、ε 和 μ 恒定区基因，以及大量的免疫球蛋白可变区基因。轻链可分为 κ 和 λ。重链可分为 γ、μ、α、δ 或 ε，其相应地分别定义了免疫球蛋白的种类 IgG，IgM，IgA，IgD 和 IgE。

[0079] 基本的免疫球蛋白（抗体）结构单元已知包含四聚体。每个四聚体由两对一致的多肽链构成，每对都具有一个“轻”链（大约 25kD）和一个“重”链（大约 50-70kD）。各个链的 N 末端定义了主要负责抗原识别的大约 100 至 110 或更多氨基酸的可变区。术语可变轻链 (Vl) 和可变重链 (VH) 分别指这些轻链和重链。

[0080] 抗体可以以完整的免疫球蛋白质形式或者以通过使用多种肽酶消化而产生的大量良好表征的片段形式存在。具体而言，胃蛋白酶消化了铰链区中二硫键以下的抗体，从而产生 F(ab)′ 2，其为 Fab 的二聚体，其本身为通过二硫键与 VH-CH1 连接的轻链。F(ab)′ 2 可以在温和的条件下还原，从而使铰链区中的二硫键断裂，由此将 F(ab)′ 2 二聚体转化为 Fab′ 单体。Fab′ 单体基本上为具有部分铰链区的 Fab（对于多个抗体片段的术语，例如参见 Fundamental Immunology，W.E.Paul，ed.，Raven Press，N.Y.(1993)）。尽管根据完整抗体的消化定义了 Fab′ 结构域，但是本领域的技术人员将会理解的是此类 Fab′ 片段可以以化学方式重新合成或者通过使用重组 DNA 方法合成。

[0081] Fab′ 区可以衍生自动物（特别是小鼠或大鼠）或人类起源的抗体，或者可以为嵌合的 (Morrison et al.，Proc Natl.Acad.Sci.USA81，6851-6855(1984)) 或人源化的 (Jones et al.，Nature 321，522-525(1986)，以及 UK 专利申请公开 No.8707252)。

[0082] 如本文所述，抗体可以包含或者衍生自任何哺乳动物，例如但不限于人类、小鼠、兔、大鼠、啮齿动物、灵长动物或它们的任意组合，并且包含分离的人类、灵长动物、啮齿动物、哺乳动物、嵌合的、人源化的和 / 或互补性决定区 (CDR)- 接枝或 CDR 经修改的抗体，免疫球蛋白，它们的裂解产物、其他部分和变体。

[0083] 用于本发明的实施方案中的抗体可以以本领域公知的多种方法衍生得到。在一个方面中，可以使用本领域公知的任何杂交瘤技术得到抗体，例如参见 Ausubel，et al.，ed.，Current Protocols in Molecular Biology，John Wiley&Sons，Inc.，NY，N.Y.(1987-2001)；Sambrook，et al.，Molecular Cloning：A Laboratory Manual，2nd Edition，Cold Spring Harbor，N.Y.(1989)；Harlow and Lane，Antibodies，A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor，N.Y.(1989)；Colligan，et al.，eds.，Current Protocols

in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., NY(1994-2001) ;Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley&Sons, NY, N.Y., (1997-2001)。

[0084] 此外,所述的抗体还可以得自由此类结构域或成分的文库(例如噬菌体文库)的选择。可以通过插入随机寡核苷酸的文库或者包含所关注序列的多核苷酸的文库(例如得自免疫的动物或人类的B细胞(Smith, G.P.1985.Science 228 :1315-1317))来创建噬菌体文库。抗体噬菌体文库在一个噬菌体中包含重链(H)和轻链(L)可变区,从而可以表达单链Fv片段或Fab片段(Hoogenboom, et al.2000, Immunol Today 21(8)371-8)。可以对噬菌粒文库的多样性进行控制,从而增加和/或改变所述文库的单克隆抗体的免疫特异性,由此产生并随后确认额外的所需的人类单克隆抗体。例如,编码重链(H)和轻链(L)免疫球蛋白分子的基因可以随机混合(shuffled),从而在组装的免疫球蛋白分子中创建新的HL对。此外,在免疫球蛋白多肽的可变区的CDR中,编码H链和L链中的一者或二者的基因可以被诱变,并随后针对所需的亲和性和中和能力进行筛选。此外,还可以通过选择一个或多个人类框架序列并引入衍生自人类全套抗体的CDR盒的集合或者通过计划的改变来以合成方式创建抗体文库(Kretzschmar and von Ruden 2000, Current Opinion in Biotechnology, 13 :598-602)。多样性的位置不限于CDR,而且还可以包含可变区的框架节段或者可以包含不同于抗体可变区的那些,例如肽。

[0085] 可以包含不同于抗体可变区的其他靶向结合成分为核糖体展示、酵母菌展示和细菌展示。核糖体展示为将mRNA翻译成它们的同源蛋白质、同时保持所述蛋白质与RNA连接的方法。核酸编码序列通过RT-PCR回收(Mattheakis, L.C. et al.1994.Proc Natl Acad Sci USA 91,9022)。酵母菌展示是基于膜结合α-凝集素酵母粘附受体aga1和aga2(交配型系统的一部分)的融合蛋白质的构建(Broder, et al.1997.Nature Biotechnology, 15 :553-7)。细菌展示是基于靶物与输出细菌蛋白质的融合,其中所述的输出细菌蛋白质与细胞膜或细胞壁结合(Chen and Georgiou 2002.Biotechnol Bioeng, 79 :496-503)。

[0086] 与杂交瘤技术相比,噬菌体及其他抗体展示方法提供了在体外针对抗原靶物的选择进行控制的机会,并且不会限制宿主对抗原的作用的可能性,反之亦然。

[0087] 抗体子序列的具体实例包含(例如)Fab, Fab′, (Fab′)2, Fv,或单链抗体(SCA)片段(例如scFv)。子序列保护眼保留了全长序列的至少一部分功能或活性的部分。例如,抗体子序列可以保留于抗原选择性地结合的能力,即使与全长抗体的结合亲和性相比,子序列的结合亲和性可以更大或更小。

[0088] Fv片段为包含以两条链表达的轻链VL可变区和重链VH可变区的片段。结合可以是非共价的或者可以是共价的,例如化学交联剂或分子内二硫键(Inbar et al., (1972) Proc.Natl.Acad Sci.USA69 :2659 ;Sandhu(1992)Crit.Rev.Biotech.12 :437)。

[0089] 单链抗体(″SCA″)为经过基因工程改造或者经过酶消耗的抗体,其包含轻链VL可变区和重链可变区,它们可任选地通过挠性连接体(例如多肽序列)以VL-连接体-VH方向或者以VH-连接体-VL方向连接。备选地,单链Fv片段可以通过两个半胱氨酸残基之间的二硫键连接两个可变结构域来制备。用于制备scFv抗体的方法(例如)Whitlow et al., (1991)在Methods :A Companion to Methods in Enzymology 2 :97中;美国专利No.4,946,778 ;以及Pack et al., (1993)Bio/Technology 11 :1271中所述。

[0090] 此外,还可以使用制备抗体子序列的其他方法,例如分离重链从而形成单价

轻 - 重链片段，进一步切割片段或者其他酶、化学或基因技术，前体条件是子序列与完整抗体所结合的抗原结合即可。

[0091] 在本发明中使用的抗体包括全长抗体、子序列（例如单链形式）、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体或者保留至少一部分单体的抗原结合活性的任何其他较高级的寡聚体。多聚体可以包含本文所列以及本领域已知的经修饰或未经修饰的全长抗体、子序列的异源或同源组合。与单体相比，抗体多聚体可以用于增加抗原的亲和力，这是由于多聚体具有多个抗原结合位点。此外，抗体多聚体可以用于制备不同抗体的寡聚体（例如二聚体、三聚体、四聚体等）的组合，因此产生多功能（例如双功能、三功能、四功能等）的抗体的组合物。

[0092] 抗体可以通过所选分子（其通过合成手段或者通过编码所述多肽的核酸进行表达来制备）的化学交联或者通过与多肽的体外或细胞表达以及随后的寡聚反应相结合的重组 DNA 技术来制备。可以通过重组技术以及制备具有不同抗原决定部位特异性的抗体的杂交瘤的表达、融合或者多种核酸（其在单一的细胞中编码了具有不同抗原决定部位特异性的抗体可变链）的表达来简单地制备抗体。

[0093] 抗体可以通过共价结合或非共价结合（例如通过多聚化结构域）直接或间接连接，从而制备多聚体。“多聚化结构域”调节了非共价蛋白质 - 蛋白质间的相互作用。具体实例包含卷曲螺旋（例如亮氨酸拉链结构）以及 α - 螺旋蛋白质序列。通过范德华力、氢键或电荷 - 电荷键调节蛋白质 - 蛋白质结合的序列也被考虑为多聚化结构域。其他的实例包含碱性螺旋 - 环 - 螺旋结构域以及调节核酸结合蛋白质（例如 DNA 结合转录因子，如 TAF）中异源或同源蛋白质 - 蛋白质间相互作用的其他蛋白质序列。多聚化结构域的一个具体的实例为 p53 残基 319 至 360，其调节了四聚体的形成。另一个实例为人类血小板因子 4，其自组装形成四聚体。而另一个实例为细胞外蛋白质 TSP4，其为凝血酶致敏蛋白家族中的一员，可以形成五聚体。其他具体的实例为 jun、fos 和酵母蛋白质 GCN4 的亮氨酸拉链。

[0094] 抗体可以通过化学交联剂彼此直接连接，或者可以通过连接体序列（例如肽序列）连接，从而形成多聚体。

[0095] 在一个实施方案中，本文所述的方法涉及特异性地结合 CD33 并包含至少人源化 V 区的至少一部分的靶向部分。例如，所述的抗体可以包含本文所定义的 VL 区以及具有至少一个人源化的片段的 VH 区。

[0096] 药物组合物

[0097] 在本发明的实施过程中，可以给药放射性免疫缀合物本身，或者作为可药用的配制物的成分给药。

[0098] 如本文所用，“可药用的盐”是指式 I 所示化合物的任何的盐，所述的化合物完全是无毒的从而可用于治疗哺乳动物。由有机和无机来源通过标准反应形成的那些盐的代表包含（例如）硫酸、盐酸、磷酸、醋酸、琥珀酸、柠檬酸、乳酸、马来酸、富马酸、棕榈酸、胆酸、十六酸、粘酸、谷氨酸、d- 樟脑酸、戊二酸、乙醇酸、邻苯二甲酸、酒石酸、蚁酸、月桂酸、硬脂酸、水杨酸、甲磺酸、苯磺酸、山梨酸、苦味酸、安息香酸、肉桂酸以及其他合适的酸。式 I 所示化合物的盐优选的是其中所述的盐为钾、钠、铵或它们的混合物。

[0099] 如本文所用，术语“治疗有效量”是指对治疗的疾病产生治疗效果的放射性免疫缀合物的量。治疗有效量将根据哺乳动物、放射性免疫缀合物以及给药方法（例如口服或肠

胃外）而改变。本领域的普通技术人员可以确定放射性免疫缀合物的治疗有效量。

[0100] 药物组合物包含“可药用的”和“生理学可接受的”载体、稀释剂或赋形剂。如本文所用，术语“可药用的”和“生理学可接受的”包含与药物给药相容的溶剂（水性或非水性）、溶液、乳液、分散介质、涂料、等渗及吸收的促进或延迟试剂。此类配制物可以包含在液体中；乳液、悬浮液、糖浆或酏剂、或者固体形式中；片（包衣或未包衣的）、胶囊（硬或软）、粉末、颗粒、晶体或微珠中。此外，还可以将补充活性化合物（例如防腐剂、抗细菌试剂、抗病毒试剂和抗真菌试剂）引入到所述的组合物中。

[0101] 可以将药物组合物配制成与特定的局部给药或者系统途径的给药相容。因此，药物组合物包含适用于特定给药途径的载体、稀释剂或赋形剂。

[0102] 用于本发明组合物的给药途径的具体的非限定性实例为吸入或鼻内传递。其他途径包含口服、经鼻、肠胃外，例如静脉内、皮内、皮下、口服、经皮（局部）以及经肌肉给药。

[0103] 可以根据标准的技术制备包含本文所述的放射性免疫缀合物的药物组合物，并且该组合物进一步包含可药用的载体。通常，生理盐水可以用作可药用的载体。其他合适的载体包含（例如）水、缓冲的水、0.4％盐水、0.3％甘氨酸等（包含用于增加稳定性的糖蛋白，例如清蛋白、脂蛋白、球蛋白等）。这些组合物可以通过常规的公知的灭菌技术来灭菌。所得的水性溶液可以包装使用，或者在无菌条件下过滤并冷冻，经冷冻的制备物可以在给药之前与灭菌的水性溶液结合。所述的组合物可以包含接近生理学条件所需的可药用辅助物质，例如 pH 调节和缓冲试剂、张力调节试剂等，例如醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙等。

[0104] 在所述的药物配制物中本文所述的放射性免疫缀合物的浓度可以大幅改变，即，大约 0.05 重量％至大约 1 重量％，大约 1 重量％至大约 2 重量％，大约 2 重量％至大约 5 重量％，大约 5 重量％至大约 10 重量％，大约 10 重量％至大约 30 重量％，大约 30 重量％至大约 50 重量％，大约 50 重量％至大约 75 重量％，大约 75 重量％至大约 99 重量％。可以根据药物组合物的物理特征来选择药物组合物，其特征包含但不限于流体的体积、粘性以及符合所选的具体给药模式的其他参数。例如，可以增高浓度以便降低与治疗有关的流体承载。给药的放射性免疫缀合物的量取决于所用的具体的靶向部分、待治疗的疾病状态、待传递的治疗试剂以及临床医生的判断。通常，给药的放射性免疫缀合物的量足以传递治疗有效剂量的具体的药理学试剂。用于各种药理学试剂的治疗有效剂量对于本领域的技术人员而言是公知的，并且对于上文所述的大量药物而言，给出了代表性的范围。典型的放射性免疫缀合物的剂量可以为大约 0.001 至大约 50mg/ 千克体重，或者大约 0.1 至大约 10mg/kg 体重。此外，还可以在医生的判断下确定治疗有效剂量。

[0105] 放射性免疫缀合物药物组合物可以以肠胃外的方式给药，即，关节内、静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、口服或经鼻。适用于所述用途的具体的配制物可以在 Remington' s Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985) 中找到。所述的配制物可以包含悬浮在可接受的载体或水性载体中的放射性免疫缀合物的溶液。可以使用多种水性载体，例如水、缓冲的水、0.9％等渗盐水等。这些组合物可以通过传统的公知的灭菌技术灭菌，或者可以进行灭菌过滤。所得的水性溶液可以包装使用，或者被冷冻，经冷冻的制备物可以在给药之前与灭菌的水性溶液结合。所述的组合物可以包含接近生理学条件所需的可药用辅助物质，例如 pH 调节和缓冲试剂、张力调节试

剂、润湿剂等，例如醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。

[0106] 用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包含：灭菌稀释剂，例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、聚丙三醇或其他合成溶剂；抗细菌试剂，例如苄基醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，例如抗坏血酸或重亚硫酸钠；螯合试剂，例如乙烯二胺四乙酸；缓冲剂，例如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；以及用于调节张力的试剂，例如氯化钠或右旋葡萄糖。可以使用酸或碱调节 pH，例如盐酸或氢氧化钠。

[0107] 对于经粘膜或经皮给药而言，在所述的配制物中可以使用适用于待渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂是本领域公知的，并且对于经粘膜给药而言，包含（例如）洗涤剂、胆盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给药可以通过使用鼻喷雾剂、吸入装置（例如吸气器）或栓剂来完成。对于经皮给药而言，所述的活性化合物可以被配制成本领域公知的软膏、油膏、凝胶或乳膏。

[0108] 在本发明的方法中，适用于给药组合物的其他药物配制物是本领域已知的（例如参见 Remington′ s Pharmaceutical Sciences(1990)18th ed.，Mack Publishing Co.，Easton，Pa.；The Merck Index(1996)12th ed.，Merck Publishing Group，Whitehouse，N.J.；和 Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms，Technonic Publishing Co.，Inc.，Lancaster，Pa.，(1993))。

[0109] 所述的药物组合物可以以剂量单位形式包装以用于容易地给药以及剂量的一致。如本文所用，“剂量单位形式”是指适合作为待治疗的受试对象使用的单一剂量的物理分离单位；每个单位都包含预定量的活性化合物，经计算所述的量能够产生与药物载体或赋形剂有关的所需的治疗作用。

[0110] 试剂盒

[0111] 此外，本发明还提供了包含根据本文所述的方法制备的放射性免疫缀合物的试剂盒。在所述的试剂盒中放射性免疫缀合物的靶向部分在自然界中可以为单克隆的或多克隆的。所述试剂盒的靶向部分的一个或两个臂可以是嵌合的、人类的、人源化的或免疫原性去除的 (deimmunized)。

[0112] 此外，通过本申请提供的试剂盒还可以包含由所述的组织中清除未结合的放射性免疫缀合物的清除组合物。一种合适的清除试剂为糖基化的抗－独特型 Fab′ 片段，其靶向针对放射性免疫缀合物的靶向部分的疾病靶向臂。在该实施方案中，给予放射性免疫缀合物并使其在靶物中最大程度地共生。为了清除残留的放射性免疫缀合物，靶物 Ab 的抗－独特性 Ab 以糖基化的 Fab′ 片段形式给予。清除试剂以单价方式与放射性免疫缀合物结合，同时它所附着的羰基残基使完整的络合物定向于肝脏，在此进行快速的代谢。清除试剂在美国系列 No.09/314,135 和 09/337,756 中有更详细地描述。

[0113] 以下实施例说明了本发明，并列出以帮助理解本发明，并且不应该以任何方式解释为限定了本发明的范围，本发明的范围如所附的权利要求书所定义。

实施例

[0114] 实施例 1：系统命名法及定义

[0115] P-SCN-Bn-DOTA：S-2-(4- 异硫氰基苄基)1,4,7,10 四氮杂环十二烷四乙酸

(Macrocyclics, Dallas, TX)

[0116] BFC :双功能螯合试剂

[0117] DOTA-BFC :DOTA 双功能螯合试剂 :例如 NHS-DOTA ;p-SCN-Bn-DOTA

[0118] $Na(NH_4)Ac$:醋酸铵钠

[0119] mAb :单克隆抗体 :HuM-195

[0120] HuM-195 :用于治疗髓性白血病的抗 -CD33 抗体。HuM-195 为将鼠科 M-195 的 CDR 区与人类框架 / 恒定区结合的重组 IgG1mAb。

[0121] SEC :体积排阻色谱

[0122] HPLC :高效液相色谱

[0123] SE-HPLC/UV :与 UV 检测器偶联的 SE-HPLC

[0124] SE-HPLC/rad. :与放射活性检测器偶联的 SE-HPLC

[0125] ITLC :瞬时薄层色谱

[0126] $NH_4CH_3CO_2$:醋酸铵, NH4Ac

[0127] $NaCH_3CO_2$:醋酸钠, NaAc

[0128] D_f :稀释因子

[0129] CHCA :- 氰基 -4- 羟基肉桂酸

[0130] MALDI :基质辅助激光解吸 / 电离质谱

[0131] HDPE :高密度聚乙烯

[0132] HEPES :N-2- 羟基乙基哌嗪 -N-2- 乙磺酸

[0133] 实施例 2 :HuM195 与 p-SCN-Bn-DOTA 的缀合

[0134] 2.3.1 材料和化学品。参见表 2 的说明。

[0135] 2.3.2 化学品的制备以及用于缀合反应的条件。

[0136] 2.3.2.1 预先制备以下溶液 :

[0137] 天然 HuM195, 5mg/mL, 储存在 4-8℃。

[0138] p-SCN-Bn-DOTA, 储存在 -20℃。

[0139] NaCl, 0.9％ :称 0.45g NaCl, 并将其溶解于不含金属的水中, 然后使体积达到 50mL。混合所述溶液并在均化后使其过滤通过 0.45μm 醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在 50mL-HDPE 容器中。

[0140] 0.2M 磷酸二氢钠 (溶液 A) :称 0.48g NaH_2PO_4, 并将其加入到 20mL 蒸馏 H_2O 中。混合所述的溶液直到完全溶解。

[0141] 0.2M 磷酸一氢钠 (溶液 B) :称 2.83g $NaHPO_4$, 并将其加入到 100mL 蒸馏 H_2O 中。

[0142] 0.1M 磷酸盐缓冲剂, pH ＝ 8 :将 5.3mL 溶液 A 与 94.7mL 溶液 B 结合并混合。为了测试 pH, 使用 pH 试纸。通过加入等体积的蒸馏 H_2O(100mL) 来稀释缓冲剂。使所述的溶液过滤通过 0.45μm 醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在 50mL-HDPE 容器中。

[0143] 2M NaOH :取得大约 5mL 30％的 NaOH, 并将其与不含金属的水混合, 使溶液冷却, 然后使体积达到 25mL。将所述的溶液保持在 50mL-FEP 容器中。

[0144] 4M NaOH :向 50ml HDPE 容器中加入 50ml 不含金属的水以及 8.0gNaOH, 并搅拌至完全溶解。

[0145] 3M NH4Ac(或 NaAc) :称 6.15g NaAc, 并将其溶解于不含金属的水中。在所述的盐

溶解之后，使体积达到 25mL。混合所述溶液并在均化后使其过滤通过 0.45μm 醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在 25mL-HDPE 容器中。

[0146] 0.25M NH_4Ac（或 NaAc）：取得 2.1mL 3M NaAc，并将其与不含金属的水混合，使体积达到 25mL。混合所述溶液并在均化后使其过滤通过 0.45μm 醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在 25mL-HDPE 容器中。

[0147] 0.1M NH_4Ac（$NaCH_3CO_2$），pH 7。取得 3.3mL 3M NaAc，并将其与不含金属的水混合，使体积达到 100mL。将所述的溶液保持在 100mL-HDPE 容器中。

[0148] 0.1M HCl：取得 2.5mL 10M HCl，并将其与不含金属的水在 25mLPE 容量瓶中混合。等候直至溶液冷却，并使体积达到 25mL。混合所述溶液并在均化后使其过滤通过 0.45c 醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在 25mL-HDPE 容器中。

[0149] 0.05M HCl：取得 1.25mL 10M HCl，并将其与不含金属的水在 25mLPE 容量瓶中混合。等候直至溶液冷却，并使体积达到 25mL。混合所述溶液并在均化后使其过滤通过 0.45μm 醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在 25mL-HDPE 容器中。

[0150] $NaN_3$0.05％。称 0.5g NaN_3，并将其溶解于 Millipore 水中。使体积达到 1L。

[0151] 1.0M $NaHCO_3$。向 50ml HDPE 容器中加入 50.0mL 不含金属的水以及 8.4g $NaHCO_3$，并搅拌至完全溶解。（这产生了 2M $NaHCO_3$ 溶液）。将 17.8mL 4M NaOH 溶液和 50mL 2M $NaHCO_3$ 溶液在 Coning Costar 250mL 储存瓶中混合（或者是当量的）。混合良好。

[0152] 备选地：

[0153] 1.0M $NaHCO_3$：向 100mL HDPE 容器中加入 50.0mL 不含金属的水以及 8.4g $NaHCO_3$，并与 17.8mL 4M NaOH 溶液混合。搅拌直至完全溶解，并使体积达到 100mL。将所述的溶液保持在 Coning Costar 250mL 储存瓶中混合（或者是当量的）。混合良好。

[0154] 0.1M HEPES 溶液。将 3.0mL 1M HEPES 缓冲剂 (Fisher BioReagents，产品号 BP299-500) 放置在 50ml HDPE 瓶中，并加入 27ml 水用于注射。

[0155] 2.3.2.2 材料

[0156] 表 2：用于缀合的化学品和材料的列表

[0157]

化学品/材料	订单名	说明/组成	供应商
HCl, 30 %	1.00318.1000	超纯的	VWR
NaOH, 30 %	1.05589.0250	超纯的	VWR
醋酸 Na	1.062640050	> 99.99%	VWR
醋酸 NH_4	372331-10 04030KH	> 99.999%	Sigma Aldrich
冰醋酸, 100%	100264 1000660250	超纯的	VW
DOTA -NHS - 酯	B-280		Macro cyclics,

[0158]

			Dallas, TX
DOTA - p -SCN - Bn	B-205		Macro cyclics, Dallas, TX
NaCl	1.064060050	> 99.99%	VWR
Hum195		5 mg/ml	Isotex
DTPA	1083900250	> 99%	VWR
不含金属的水	1.01262.1000	超纯的	VWR
Na_2HPO_4	106566.0050	Suprapur 99.99	VWR
NaH_2PO_4	106370.0100	Suprapur 99.99	VWR
一次性 PD-10 脱盐柱	17-0851-01		GE Health Care Europe GmbH
pH 试纸	1.09533.0001 1.09542.0001	pH= 5.0 -10 pH= 4.0 - 7	VWR
PP Eppen dorf 小瓶	211-2130	PP	VWR
微量恒温仪	460-3249	203x315X89	VWR
PE 小瓶	6008117	PE	Perkin Elmer GmbH
Protein Pack 300SW	WRT080013	Protein Pack 300SW	Waters
Protein Pack 125 centriguard 柱	WRT1866000926	Protein Pack 125 centriguard 柱	Waters
叠氮化 Na, Na_3N	8.22335.0111	纯度≥ 99 %	VWR
HEPES	BP299-100		Fisher BioReagents
$NaHCO_3$	106329.0500		VWR
移液管 Eppendorf	613-3646 613-3649 613-3650	0.5 -10 μL (灰尖) 10 -100 μL (黄尖) 100 -1000 (蓝尖)	VWR
移液管尖 Eppendorf	612-1158 612-1160 612-1163	0.5 -10 μL (灰尖) 10 -100 μL (黄尖) 100 -1000 (蓝尖)	VWR
Millipore 离心装置 YM - 10	4411 (8 个单位) 4421 (24 个单位)	具有阻隔 10000 MW 分子量的过滤器	Milli pore
Nalgene 容器	2002-0001 2002-0002 2002-0004	30, 60 和 125 mL, 用于溶液的储存	VWR

[0159]

Amicon Ultra 离心过滤器装置，小于 4mL			
Amicon Ultra 离心过滤器装置，小于 4mL Ultra -10 K，再生纤维素，阻隔 10 000 MW	目录号 UFC801096		Millipore

[0160] 2.3.2.3 仪器：

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

[0162] Vortex 或类似的系统

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

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

[0165] 储存 mAb 和缀合的 mAb 的冰箱 (4-8℃)

[0166] 储存 BFC-DOTA 的冷藏室 (-20℃)

[0167] 分析天平

[0168] 烘箱内的微量恒温仪章动器

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

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

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

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

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

[0174] 2.3.3.5 在信号 Ic（峰下的面积）与浓度之间建立关系。生成校准曲线（参见图 3，其示出了典型的色谱）以便使分析员可以计算缀合物样品中 Hum195 的浓度*。另一种近似的方法是以找到浓度 / 信号的比为基础的，其中所述的浓度 / 信号的比得自 HuM-195 标准样品的 SE-HPLC/UV 色谱。如果线性条件得到满足，则浓度 / 信号的比为恒定的，K280nm。因此，根据下式计算缀合物样品中 Hum-195 的浓度：

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

[0176] K_{280nm} 为校准样品中 HuM195(mg/mL) 的浓度与校准样品的 UV（设定在 270nm 下）色谱上峰下的面积 (Ic) 的比

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

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

[0179] D_f 为稀释因子

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

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

[0182] 2.3.4 可任选地 :通过过滤 - 离心的 mAb 的浓度。

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

[0184] 2.3.4.1 取得分子量阻隔为 10000MW 的新的 Millipore 离心装置 YM-10（可以使用具有较高阻隔的 YM 装置，并且离心时间相应增加），并使用数 mL 0.05M HCl 和纯 H_2O 对其进行洗涤。

[0185] 2.3.4.2 预先将离心管的温度调节至 4℃。

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

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

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

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

[0190] 2.3.5 在碳酸氢盐缓冲剂中的缀合反应

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

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

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

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

[0195] 在 37℃下将反应混合物在章动器中温育 1 小时 30 分钟。

[0196] 2.3.6 可任选地 :在磷酸盐缓冲剂中的缀合反应

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

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

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

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

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

[0202] 2.3.6.6 封闭 Eppendorf 小瓶并使用 Vortex 系统进行混合，使其在室温下进行 24

小时或者按照以下步骤 2.3.6.7 所述进行。

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

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

[0205] 2.3.7.1 将全部的构建体反应混合物（部分 2.3.5.5 或 2.3.6.7）转移至新的 Millipore 离心装置 YM-10 或相当物（阻隔 10000MW）中。阻隔分子量为 20,000 或 40,000 的过滤器也是可接受的。

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

[0207] 2.3.7.3 将步骤 2.3.7.2 重复 3 次以上。

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

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

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

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

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

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

[0214] 以下过程为 2.3.7 中所述方法的备选方法。

[0215] 2.3.8.1 参见步骤 2.3.7.1。

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

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

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

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

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

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

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

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

[0224] 2.3.8.10 按照步骤 2.3.7.2-2.3.7.8 所述进行。

[0225] 2.3.9 在缀合物中通过 UV 分光光度法测定蛋白质的浓度。

[0226] 2.3.9.1 在 280nm 下设定 UV 分光光度计（天然及缀合的 Hum-195 的典型的 UV 光谱参见图 1)。

[0227] 2.3.9.2 制备一个稀释的标准样品，或者可任选地，为了生成校准曲线，在 0.9％ NaC 1 中制备 HuM195 的浓度已知的至少 3 个稀释标准溶液，并找到光密度（通常为 0.1-0.8) 和浓度（通常为 60-600600μg/mL) 之间的线性区。对于校准曲线的实例参见图 5。在 1cm 光路的小玻璃管中，对于 0.1％ (1mg/mL，处于 0.9％ NaCl 中）下的 HuM195 溶液而言，吸光率为大约 1.4。

[0228] 2.3.9.3 通过使用得自图“光密度与浓度”的校准曲线（例如图 5) 或者根据精确度较低的以下等式来计算样品中的蛋白质浓度：

[0229] $C(HuM195, mg/mL) = A_{280nm} * D_f * f_c / \varepsilon_{280nm} \cdot L$

[0230] A_{280nm} 为在 280nm 下的吸光率

[0231] ε_{280nm} 为对于 0,1％＝ 1.4 时在 280nm 处的消光系数

[0232] L 为小玻璃管的光路，1cm

[0233] D_f 为稀释因子

[0234] f_c 为校正天然与缀合 IgG 的消光系数之间的差异的因子。该

[0235] 因子在 280nm 下为大约 1(参见图 1)。

[0236] C(HuM195conj，mg/mL) 为未稀释样品中 HuM-195 的浓度，

[0237] 以 mg/mL 计。

[0238] 实施例 3：放射性标记过程的描述：一步法

[0239] 3.1 规模

[0240] 使用之前与 DOTA 双功能螯合试剂缀合的 HuM-195 来标记 225Ac。

[0241] 3.2 系统命名法及定义

[0242] 同样参见实施例 1。

[0243] DTPA：二乙烯三胺五乙酸

[0244] 龙胆酸：2,5- 二羟基苯甲酸

[0245] AA：抗坏血酸

[0246] 3.3 放射性标记方案

[0247] 3.3.1 材料和化学品

[0248] 参见表 3

[0249] 表 3：用于标记的化学品和材料的列表

[0250]

化学品/材料	订单名	说明/组成	供应商
30% HCl	1.00318.1000	超纯的	VW
NaOH, 30%	1.05589.0250	超纯的	VW
醋酸 Na	1.062640050	> 99.99%	VW
醋酸 NH_4	372331-109 04030KH	> 99.999%	Aldrich
乙酸	100264	超纯的	VW
龙胆酸	841745	> 99%	VW
抗坏血酸,用于生物学用途	101566.0100	> 99%	VW
DOTA-NHS-酯	B-280		Macro cyclics, Dallas, TX
DOTA-p-SCN-Bn	B-205		Macro cyclics, Dallas, TX
NaCl	1.064060050	> 99.99%	VW
HuM195		5 mg/ml	PDL/PacificGMP
DTPA	1083900250	> 99%	VW

[0251]

不含金属的水	1.01262.1000	超纯的	VW
一次性 PD-10 脱盐柱	17-0851-01		GE Health Care Europe GmbH
pH 试纸	1.09543.0001 1.09542.0001	pH= 6.5-10 pH= 4.0-7	VW
PP Eppen dorf 小瓶	211-2130 211-2160	PP	VW
微量恒温仪	460-3249	203x315X89	VW
PE 小瓶	6008117	PE	Perkin Elmer GmbH
Protein Pack 300SW	WRT080013	Protein Pack 300SW	Waters
Protein Pack 125 centriguard 柱	WRT1866000926	Protein Pack 125 centriguard 柱	Waters
过滤器	514-7014	0.45 μm 孔径 25 mm 直径	VW
移液管 Eppendorf	613-3646 613-3649 613-3650	0.5 -10 μL (灰尖) 10 -100 μL (黄尖) 100 -1000 (蓝尖)	VW
移液管尖 Eppendorf	612-1158 612-1160 612-1163	0.5 -10 μL (灰尖) 10 -100 μL (黄尖) 100 -1000 (蓝尖)	VW
ITLC SG 5X20 cm	516-7805		VW
人类血清清蛋白(HSA) ------	 PZN-0504775	1 % 20 %	Swiss Red Cross, Bern, Switz. Behring
灭菌管,移液管尖塑料制品			
50 mL Corning 管			Sigma-Aldrich
Nunc 管			Sigma-Aldrich
10DG 尺寸排阻脱盐柱	732-2010	MW 阻隔 6000	Biorad Inc.

[0252] 3.3.2 化学品的制备及用于反应的条件

[0253] 反应小瓶以及微量恒温仪

[0254] 3.3.2.1 取得新的反应管（例如 2mL 容量的 Eppendorf 管），并使用几 mL 0.1M HCl、注射用水 H_2O 以及最终用 0.5M NaAc(0.5M NH_4Ac) 缓冲剂对其进行洗涤。

[0255] 3.3.2.2 使用与用于标记的反应管相同类型的反应管来校准微量恒温仪。管内液

体（水）的温度应该为 37±2℃。

[0256] Ac-225 的制备

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

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

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

[0260] 其他化学品和材料

[0261] 3.3.2.6 为了进行标记，预先制备以下溶液：

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

[0263] 0.5M NH_4Ac（或 NaAc）：取得 4.2mL 3M NaAc，并将其与不含金属的水混合，然后使体积达到 25mL。混合所述的溶液，并在均化后使其过滤通过 0.45μm 醋酸纤维素薄膜过滤器。将所述的溶液保持在 25mL-HDPE 容器中。

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

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

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

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

[0268] 制备以下材料

[0269] PD-10 柱

[0270] pH 试纸：范围在 4-10 内的 pH 试纸的薄纸条。

[0271] Eppendorf 小瓶

[0272] PE 小瓶

[0273] 0.45μm25mm- 直径的醋酸纤维素过滤器以及用于过滤的灭菌注射器。

[0274] ITLC SG 5X20cm

[0275] 3.3.2.7 在标记前，使非放射活性的溶液过滤通过 0.45μm25mm 醋酸纤维素过滤器

[0276] 3.3.2.8 仪器：

[0277] Vortex 或类似的系统

[0278] 具有 UV 检测器以及 Protein Pack 300SWSEC 柱作为固定相的 HPLC

[0279] 储存 mAb 和缀合的 mAb 样品的冰箱（4-8℃）

[0280] 储存 BFC 的冷藏室（-20℃）

[0281] 具有高纯度 Germanium 检测器的 γ- 光谱仪系统。可任选地并且尤其对于活性

均衡性评估而言，所述的检测器还应该为 ISOCS，其可表征为 Canberra Industries 并具有 ISOCS/LABSOCS 软件包，该软件包在标准的 GENIE2000 软件下运行，其中所述的 GENIE2000 软件被构造成能够对各种具体的计算几何条件（例如小瓶、柱等）进行绝对的测量。

[0282] Squibb CRC-17 放射性核素活度计（或相当的模型）

[0283] 3.3.3 放射性标记

[0284] 3.3.3.1 取得至多 0.3mL 0.05M HCl 的等分液，其包含所需活性的 225Ac（例如在标记当天为大约 1mCi）并将其吸入到反应管中（在部分 3.3.7.3 中的更新表中）。

[0285] 3.3.3.2 可任选地，通过高分辨率 γ - 光谱仪测量反应管中 225Ac 的活性。

[0286] 3.3.3.3 加入 0.1mL 3M NaAc（或 NH4Ac），并使用 Vortex 系统温和且短暂地混合。

[0287] 3.3.3.4 通过移出 0.001mL 等分液并将其点在具有合适的 pH 范围的 pH 试纸上来检测 pH。pH 应该在 5 至 8.5 之间。不要丢弃尖端和 pH 试纸 ：将它们收集在小的 PE 袋中以用于放射活性均衡性评估。

[0288] 3.3.3.5 根据 HuM195 在缀合物溶液中的浓度，加入 0.1mL（当浓度为 10mg/mL 时）或者计算体积的 p-SCN-Bn-DOTA-mAb 缀合物溶液，其包含大约 1mg 的 mAb。所述的体积不应该超过 0.2mL。

[0289] 注意 ：在对照试验中，该步骤被省略。

[0290] 3.3.3.6 加入 0.020mL 新制备的饱和龙胆酸溶液，并使用 Vortex 系统进行短暂且温和的混合。

[0291] 3.3.3.7 重复 3.3.3.4。目标 pH 应该介于 5.5-7.0 之间。

[0292] 3.3.3.8 如果 pH 高于 7.0，则加入 0.010mL 0.1M HCl。如果 pH 低于 5.5，则加入 0.25mL 3M NaAc。

[0293] 3.3.3.9 如果需要，重复步骤 3.3.3.8。

[0294] 3.3.3.10 封闭装有反应混合物的 2mL 反应小瓶反应管，并将其在微量恒温仪 (3.3.2.2) 中在 37℃下放置 80-90 分钟。

[0295] 3.3.4DTPA 攻击以及通过 ITLC 对反应产率的测定

[0296] 3.3.4.190 分钟后，终止反应并加入 0.010mL 10mM DTPA 溶液，并使用 Vortex 系统进行短暂且温和的混合。

[0297] 3.3.4.2 将反应管放回到微量恒温仪中并温育 30 分钟。

[0298] 3.3.4.320 分钟后，关闭微量恒温仪，由反应混合物中移出 0.002mL 等分液并将其点在 ITLC 小条的参照线（在距一侧大约 15mm 处标记的线）的中心。将空尖收集在废物袋中（参见 3.3.3.4）。使装有反应混合物的管保持安全。

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

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

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

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

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

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

[0305] 3.3.4.10 通过使用下式来计算放射性标记：

[0306] $Y(\%) = (A_1+A_2)*100\% / A_t$

[0307] 其中，

[0308] Y = 放射性标记的产率 %

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

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

[0311] A_t = 在色谱的所有部分中测量的 ^{225}Ac 活性的总和，Bq(μCi)

[0312] 如果使用相同的几何学测量所述的样品（样品来源距检测器的距离、相同的小瓶、检测器等），然后可以使用下式计算产率：

[0313] $Y(\%) = (I1+I2)*100\% / I_t$

[0314] 其中，

[0315] Y = 放射化学产率 %

[0316] I_1 = 在色谱的部分 1 中测量的 ^{225}Ac 的计数率（由底部开始计数），cps

[0317] I_2 = 在色谱的部分 2 中测量的 ^{225}Ac 的计数率，cps

[0318] I_t = 在色谱的所有部分中测量的 ^{225}Ac 的计数率，cps

[0319] 3.3.5 使用 10DG 柱通过体积排阻色谱纯化反应混合物

[0320] 3.3.5.1 获得以下成分：10mL 10DG SE 树脂；柱成分，以及用于下文所述的纯化步骤的 3 通阀。

[0321] 3.3.5.2 将 10mL 体积的 10DG 树脂倒入一次性塑料柱中，使其安定并施加顶部熔块。所有这些材料均得自 Biorad Inc.，Hercules CA。使用 2 个 10mL 体积的 0.9% NaCl 洗涤包装的树脂。丢弃洗涤液。

[0322] 3.3.5.3 使用 2 个 10mL 体积的 1% HAS 平衡所述的树脂。丢弃洗涤液。

[0323] 3.3.5.4 量取用于收集药品产物的新的 50mL 灭菌 Corning 管的皮重，并将全部的构建体反应混合物施加到所述的柱上（参见 3.3.4），并将洗脱液收集在废料管中。

[0324] 3.3.5.5 使用 20mL 1% HSA 洗涤构建体反应小瓶并将该洗涤液加入到柱中，然后将洗脱液再次收集在废料管中。加入 2.0mL 1% HSA 作为流动相并将洗脱液再次收集在废料管中。将 2mL 1% HAS 加入到体积排阻柱中并收集最终的产物。

[0325] 3.3.5.5 将收集的药品产物称重并记录包含所述产物的溶液的质量。

[0326] 3.3.5.6 假设使用纯化方案除去了 1.0mg 抗体中的 80%。通过将所述的活性除以回收 HuM195 的总量 (0.8mg) 来计算所述产物的比活。可以在纯化之后的 6 小时后测定产物的活性水平。需要这段时间来用于在剂量校准器或相当物中建立及测量的 Ac-225 久期平衡，从而测定产物的产率和活性水平。

[0327] 3.3.6 可任选地：使用 PD-10 柱通过体积排阻色谱纯化反应混合物

[0328] 以下过程为在部分 3.3.5 中所述过程的备选过程。

[0329] 3.3.6.1 通过使 5mL NaCl 0.9% 通过所述的柱来使 PD-10 树脂在 0.9% NaCl 溶液

中形成一定的条件。丢弃洗涤液。

[0330] 3.3.6.2 将全部的构建体反应混合物（部分 3.3.4.3）施加到柱的填充池中，并将洗脱液（f1）收集在 Eppendorf 管或 PE 小瓶中。

[0331] 3.3.6.3 使用 0.5mL 0.9％ NaCl 溶液洗涤反应小瓶并将洗涤液倒入 PD-10 柱的填充池中。将空的反应小瓶放置在小的 PE 废物袋中以用于活性均衡性评估（参见 3.3.3.4）。

[0332] 3.3.6.4 将洗脱液分别收集在 Eppendorf 管或 PE 小瓶中。

[0333] 3.3.6.5 将步骤 3.3.6.3-3.3.6.4 重复 2 次，并将这些洗脱液收集在一起（fw）。

[0334] 3.3.6.6 将 0.5mL 0.9％ NaCl 连续施加到 PD-10 柱的填充池中，直至总洗脱体积达到 6mL。共收集 4mL 的洗脱液。这些级份应该包含大部分的标记缀合物（fp）。

[0335] 3.3.6.7 使用额外的 8mL 0.9％ NaCl 洗涤柱。将洗脱液单独地收集在新的容器中。该级份为包含游离的或者结合有 DTPA Ac-225 的级份（ff）。

[0336] 3.3.6.8 等待一（1）小时，并在用于首次评价的各个小瓶中，通过在高分辨率 γ-光谱仪上测量 221Fr 来计数 225Ac 的活性（可任选地）。

[0337] 3.3.6.9 等待超过 6 小时以达到 225Ac 与所有继承元素之间的放射活性平衡，并通过 221Fr 和 213Bi 测量 225Ac 的活性以用于最终的评价。

[0338] 3.3.6.10 如果浓度是所需的，则将级份 f_p(4mL) 转移至分子量阻隔为 10000MW 的新的 Millipore 离心装置 YM-10 中（可以使用具有分子量阻隔较高的薄膜的 YM 管，并且旋转的时间相应增加）。否则直接进入 3.3.5.5。

[0339] 3.3.6.11 在 6500rpm 及 4℃下，离心缀合物结合的溶液，直至溶液的体积为大约 1mL。

[0340] 3.3.6.12 加入 1mol 0.9％ NaCl，并重复步骤 3.3.6.11。

[0341] 3.3.6.13 量取用于收集产物的新的 50mol 灭菌 Corning 管的皮重。

[0342] 3.3.6.14 将产物转移至新的 50mL 灭菌 Corning 管中。

[0343] 3.3.6.15 使用至多 1mL 1％ HAS 洗涤空的 YM-10 管，并将洗涤液转移至装有产物的管中。

[0344] 3.3.6.16 按照 3.3.5.5 中所述进行。

[0345] 3.3.7 可任选地：活性均衡性的评估

[0346] 3.3.7.1 在高分辨率 γ-分光仪上测量 PD-10 柱，以便定量留在柱上的 225Ac 的活性。

[0347] 3.3.7.2 测量装有空的反应小瓶、尖端和 pH 试纸的袋，其中所述的反应小瓶、尖端和 pH 试纸在标记试验过程中用于 QC。

[0348] 3.3.7.3 将结果概况于下表中（表 4）：

[0349]

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

[0350] 3.4 放射性标记的缀合物的质量控制

[0351] 3.4.1 外观 / 视觉测试 :

[0352] 3.4.1.1 使用黑白背景,针对清晰度、颜色和外源物质的缺乏方面视觉检验所得的产物。

[0353] 3.4.2 放射性核的鉴定

[0354] 3.4.2.1 在校准的 γ 分光仪上收集 γ 光谱。其实例参见图 9。

[0355] 3.4.2.2 使用标准的核素库 (参见表 1),在 218keV 下寻找 Fr-221 的主峰、在 441KeV 下寻找 Bi-213 的主峰。此外,寻找以证明 Ac-225 和 T1-209 的峰。

[0356] 表 1 :核素库 * :Ac-225 及继承元素

[0357] 库的列表报告 26.03.2009 15:22:20 页码 1

[0358] **********

[0359] ***** 库的列表报告 *****

[0360] **********

[0361] 文件地址 :C:\GENIE2K\CAMFILES\Ac.NLB

[0362] 核素库的描述 :

[0363]

核素名称	半衰期（秒）	能量 (keV)	能量 Uncert. (keV)	产率 (%)	产率 Uncert.(Abs.+-)
TL-209	8.640E+005	72.800	0.000	5.9100	0.0000
		74.970	0.000	9.9800	0.0000
		84.800	0.000	3.4000	0.0000
		87.300	0.000	1.0000	0.0000
		117.000	0.000	77.0000	0.0000
		465.000*	0.000	96.6000	0.0000
		1566.000	0.000	99.7000	0.0000
BI-213	8.640E+005	76.862	0.005	1.1800	0.0600
		79.290	0.005	2.0000	0.1000
		89.600	0.000	0.7000	0.0500
		92.400	0.100	0.2000	0.0700
		292.300	0.100	0.4900	0.0700
		309.000	0.100	0.2000	0.0700
		323.600	0.100	0.1300	0.0700
		440.200*	0.020	27.3000	1.2000
		806.600	0.040	0.3500	0.0200
		1101.000	0.060	0.3900	0.0230
FR-221	8.640E+005	62.800	0.010	0.8000	0.1200
		68.000	0.010	0.4000	0.1200
		78.950	0.010	0.2000	0.1200
		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	0.020	2.5400	0.1200
		87.300	0.030	0.3000	0.0120
		97.300	0.000	0.9400	0.0600
		99.600	0.050	2.9000	0.0400
		100.300	0.050	0.2500	0.0400
		108.200	0.030	0.2500	0.0110
		111.400	0.030	0.3200	0.0150
		116.000	0.030	1.5500	0.0150
		124.400	0.030	0.2200	0.0150
		130.200	0.030	0.2000	0.0150
		144.700	0.050	0.1300	0.0070
		149.900*	0.020	0.7300	0.0400
		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

[0364] *核素库编辑者，Genie 2000，Canberra Industries。

[0365] 3.4.3 通过 ITLC 得到的放射化学纯度

[0366] 3.4.3.1 在上文 3.3.4 中有所描述

[0367] 3.4.4 通过尺寸排阻 HPLC 得到放射化学纯度

[0368] 3.4.4.1 由所述的构建体得到等分液，使得峰中的计数率显著高于放射活性检测器的背景。

[0369] 3.4.4.2 使用与校准试验中相同的条件通过 SE-HPLC 运行所述的样品：0.9％ NaCl，1mL/min 速度等。

[0370] 3.4.4.3 针对检测器检测的总活性，比较并计算与缀合物有关的活性。参见图 6 作为说明。

[0371] 3.4.4.4 通过使用下式计算缀合物“Rc”的放射化学品的纯度：

[0372] $R_c(\%) = (I_c)*100\% / I_t$

[0373] 其中，

[0374] R_c ＝标记缀合物的放射化学纯度％

[0375] I_c ＝在 SE-HPLC/rad. 色谱上在缀合物峰下测量的面积（图 6）

[0376] I_t ＝在 SE-HPLC/rad. 色谱上测量的总面积（图 6）

[0377] 使用下式计算与高 MW 聚集体结合的 Ac-225 的百分率：

[0378] $A_H(\%) = (I_h)*100\% / I_t$

[0379] 其中，

[0380] A_H ＝与高 MW 聚集体结合的 Ac-225 的百分率，％

[0381] I_h ＝在 SE-HPLC/ 放射活性色谱上，在缀合物峰的左侧上测量的面积

[0382] 通过使用下式计算与低 MW 聚集体结合的 Ac-225 的百分率：

[0383] $A_L(\%) = (I_1)*100\% / I_t$

[0384] 其中，

[0385] A_L ＝与低 MW 聚集体结合的 Ac-225 的百分率，％

[0386] It ＝在缀合物峰的右侧上测量的面积，直至峰开始相应于游离的 Ac-225，图 6

[0387] 3.4.5 免疫反应性

[0388] 3.4.5.1 通过将总体积为 0.030mL 的大约 2ng 放射性标记的抗体与 500 至 1000 倍过量的抗原温育来测定 225Ac-HuM 195 的免疫反应性（大约 10x 10^6CD 33- 阳性 AL67 细胞）。

[0389] 这些细胞的每个细胞都表达了大约 400,000 个 CD 33- 阳性结合位点，并且相对于加入的 HuM-195 是抗原过量的。在 0℃下温育 30 分钟后，通过离心并除去上清液收集细胞，使用磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 对这些细胞进行一次洗涤，并除去洗涤液。通过闪烁计数测量细胞团、上清液和洗涤液的放射活性。免疫反应性百分率计算等于｛（与细胞结合的 225Ac-HuM195）/（结合的加上未结合的总活性（上清液和洗涤液）｝乘以 100。

[0390] 3.4.6 小瓶中 Ac-225 的活性

[0391] 3.4.6.1 等待超过 6 小时以达到 225Ac 与所有继承元素之间的放射活性平衡，并通过 221Fr 和 213Bi 测量 225Ac 的活性以用于最终的评价。

[0392] 3.4.7 构建体的总体积

[0393] 3.4.7.1 重力测量法测定产物的总体积

[0394] 3.4.8 计算 Ac-225 的活性浓度

[0395] 3.4.8.1 通过在 3.4.6.1 中获得的活性除以在 3.4.7.1 中获得的体积来计算活性浓度 (mCi/mL)。

[0396] 3.4.9 比活的计算

[0397] 3.4.9.1 按照部分 3.3.5.5 中所述

[0398] 3.4.10 可任选地：通过 UV 分光光度法测定蛋白质并计算比活。

[0399] 如果在纯化的蛋白质级份中不存在 HAS，则仅使用该方法（参见图 12）。

[0400] 3.4.10.1 由结合的蛋白质级份“fp”（部分 3.3.6.6）取得 0.02mL 等分液，并使用 0.9％ NaCl 使体积达到 0.5mL(Df ＝ 25)。当 1mg 缀合物用于标记时，建议稀释因子 Df 为 25。

[0401] 3.4.10.2 如部分 2.3.7 和 2.3.9 中所述，在结合的且浓缩的样品中测量蛋白质的浓度 (cpi)。

[0402] 实施例 4

[0403] 表 5：比较林妥珠单抗 -Ac225 “一步”法与现有方法的制造过程

[0404]

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

[0405] 参考文献

[0406] 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.

[0407] 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.

[0408] 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 Stabilityin Radiolabeled Immunoconjugates.Bioconjugafe Chem.5,565-576.

[0409] D.R.Beckford,A.Xiques,R.Leyva,M.Perez-Malo;E.Casanova,M.Barrabi(2007)Nuevo radioimmunoconjugado 90Y-DOTA-HR3 Sintesis y radiomarcaje.Nucleus 2007,41,3-8.

[0410] 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-hidroxysulfosuccinimimidyl DOTA.Bioconjugate Chem.12,320-324.

[0411] Yasushi Ogawa,Joseph Traina,Eike Zimmermann,Tao Yu,Douglas W.Schneider,Erno Pungor Jr.(2007)Quantification of bifunctional diethyenetriaminepentaccetic acid derivative conjugation to monoclonal antibodies by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry.Analytical Biochemistry 368214-221.

[0412] 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 DM1Conjugated Anti-PSMA Antibody for Prostate Cancer Therapy.Journal of Pharmaceutical Sciences,Vol.94,No4,April 2005.

[0413] Instructions 52-1308-00BB;PD-10Desalting Column,GE Healthcare.

[0414] Amicon Centricon Centrifugal Filter Devices.Data sheet Millipore

[0415] [Ac-225]-DOTA-Hum195Manufacturing Protocol(Two step labelling procedure),MSKCC

[0416] Labelling of Hum-195/DOTA conjugates with Ac-225using the one step method,TUM report,February 2009.

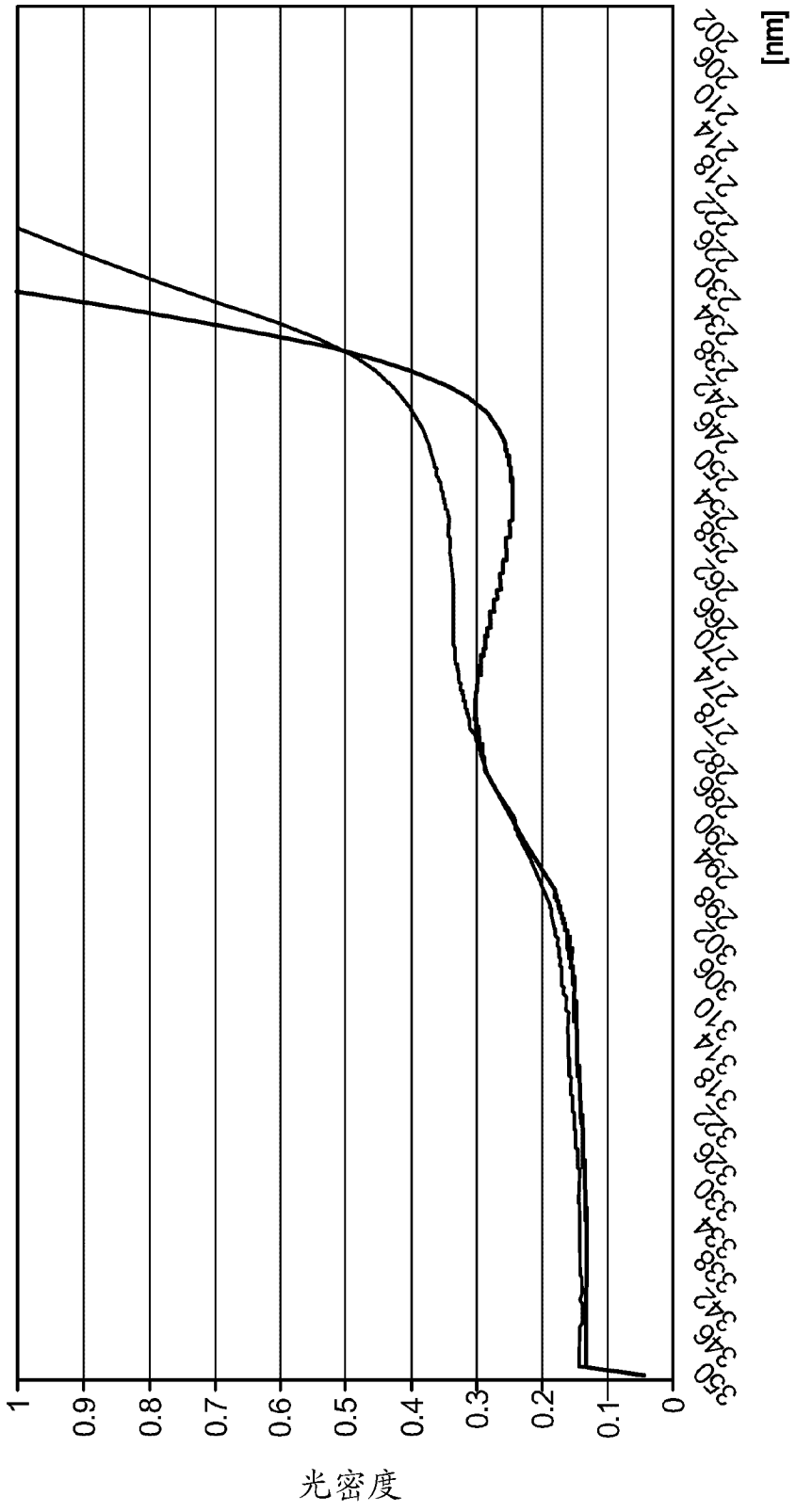


图 1A

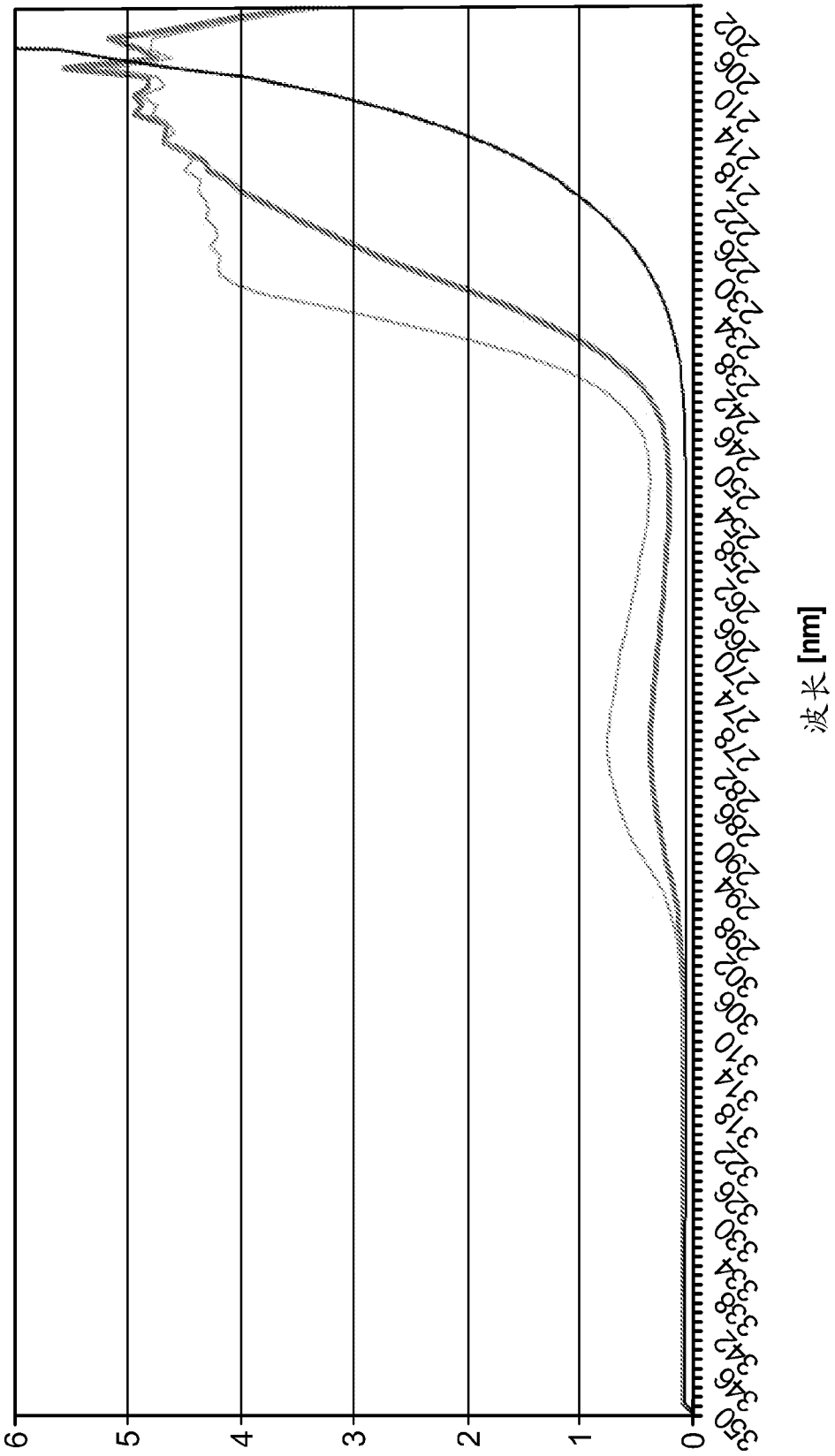


图 1B

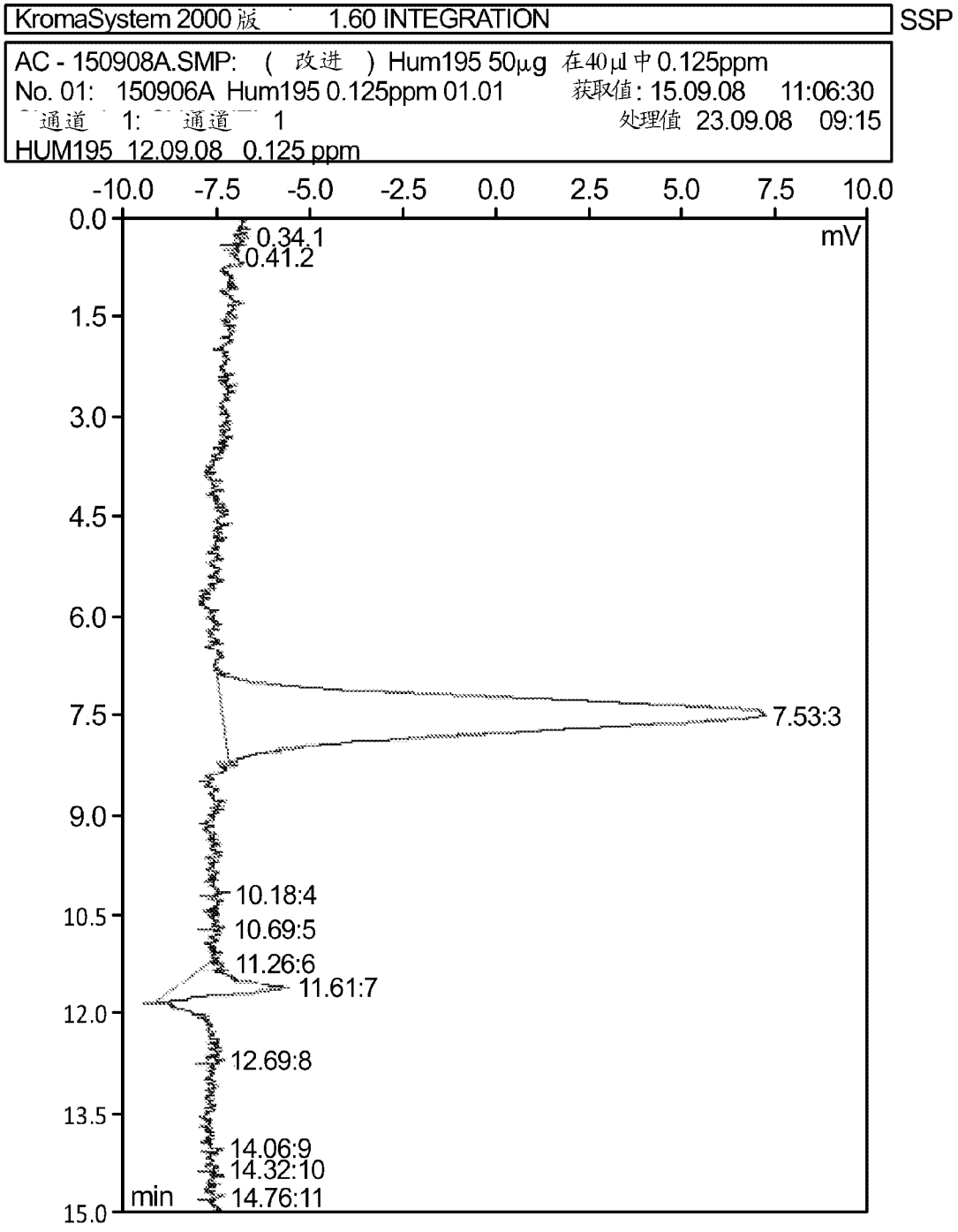

KromaSystem 2000 版 1.60 INTEGRATION
SSP
AC - 150908A.SMP: (改进) Hum195 50µg 在40µl 中 0.125ppm
No. 01: 150906A Hum195 0.125ppm 01.01
获取值: 15.09.08 11:06:30
通道 1: 通道 1
处理值 23.09.08 09:15
HUM195 12.09.08 0.125 ppm
-10.0 -7.5 -5.0 -2.5 0.0 2.5 5.0 7.5 10.0
0.0
1.5
3.0
4.5
6.0
7.5
9.0
10.5
12.0
13.5
15.0
mV
min
0.34:1
0.41:2
7.53:3
10.18:4
10.69:5
11.26:6
11.61:7
12.69:8
14.06:9
14.32:10
14.76:11

图 2

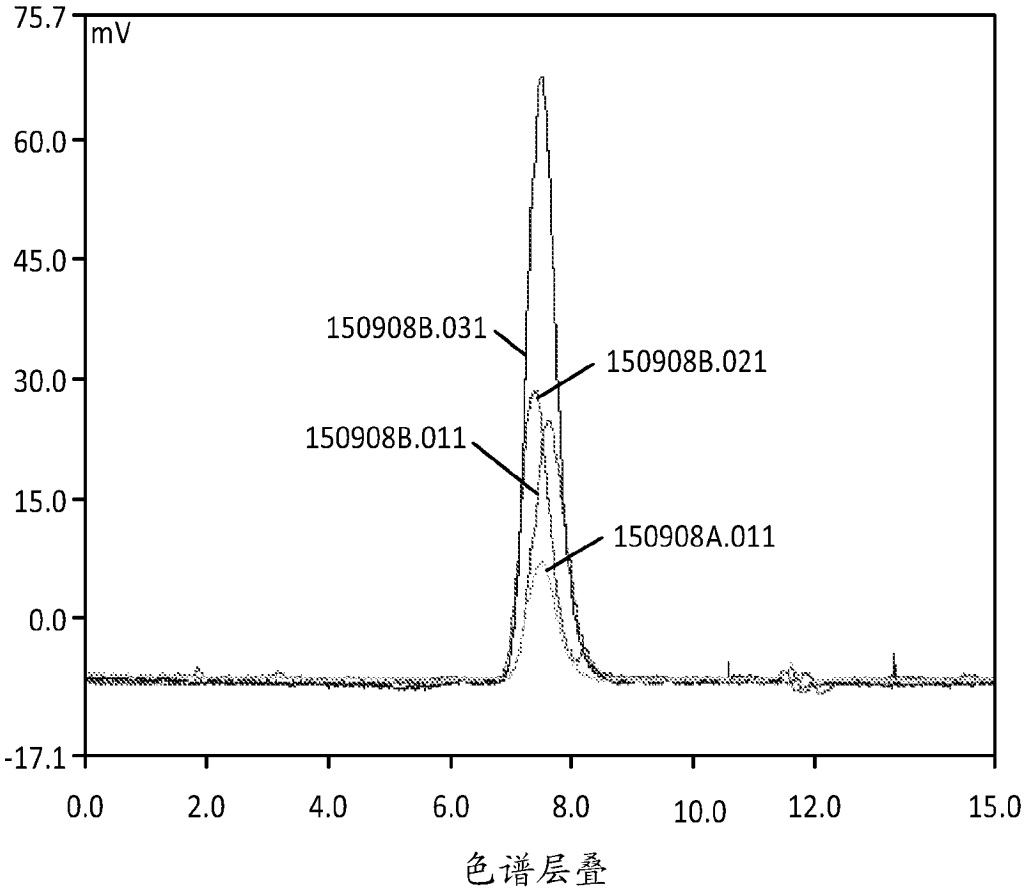

75.7
mV
60.0
45.0
30.0
15.0
0.0
-17.1
150908B.031
150908B.021
150908B.011
150908A.011
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
15.0
色谱层叠

图 3

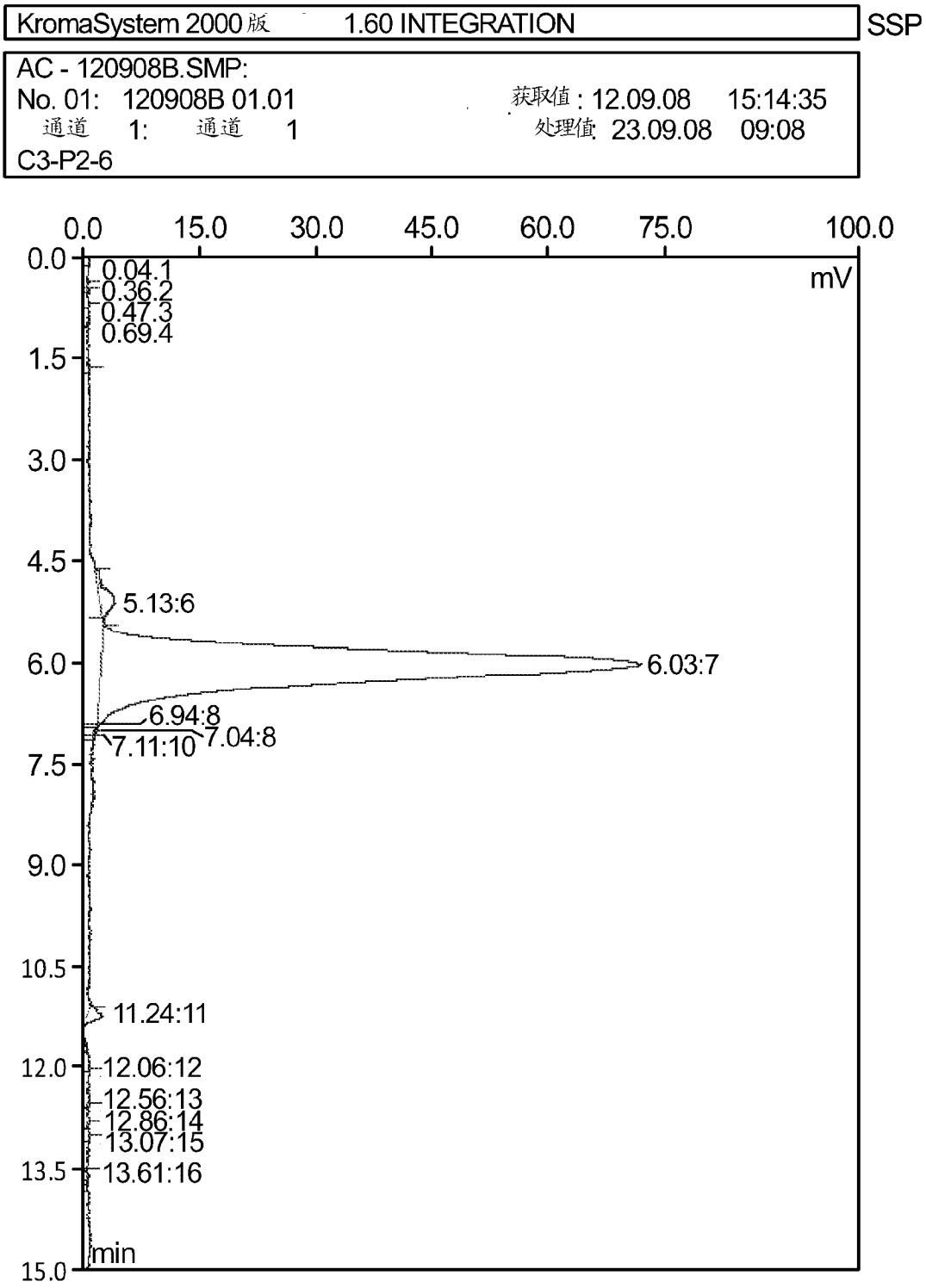

KromaSystem 2000 版 1.60 INTEGRATION SSP
AC - 120908B.SMP:
No. 01: 120908B 01.01
通道 1: 通道 1
C3-P2-6
获取值 : 12.09.08 15:14:35
处理值: 23.09.08 09:08
0.0 15.0 30.0 45.0 60.0 75.0 100.0
mV
0.04:1
0.36:2
0.47:3
0.69:4
5.13:6
6.03:7
6.94:8
7.04:8
7.11:10
11.24:11
12.06:12
12.56:13
12.86:14
13.07:15
13.61:16
min
0.0
1.5
3.0
4.5
6.0
7.5
9.0
10.5
12.0
13.5
15.0

图 4

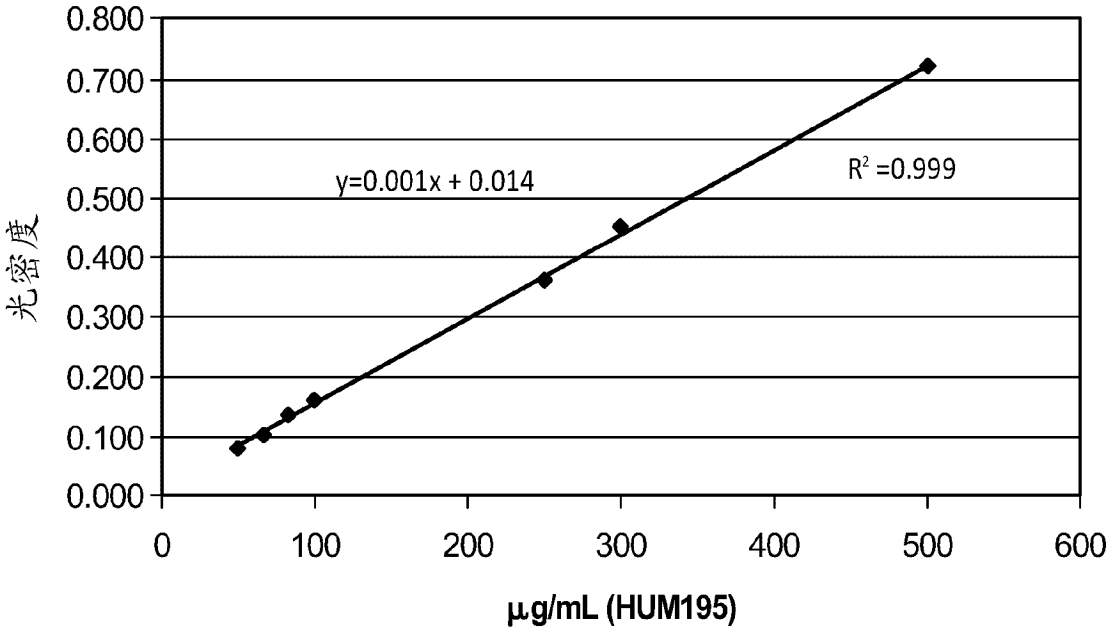

0.800
0.700
0.600
0.500
0.400
0.300
0.200
0.100
0.000
光密度
y=0.001x + 0.014
R² =0.999
0
100
200
300
400
500
600
µg/mL (HUM195)

图 5

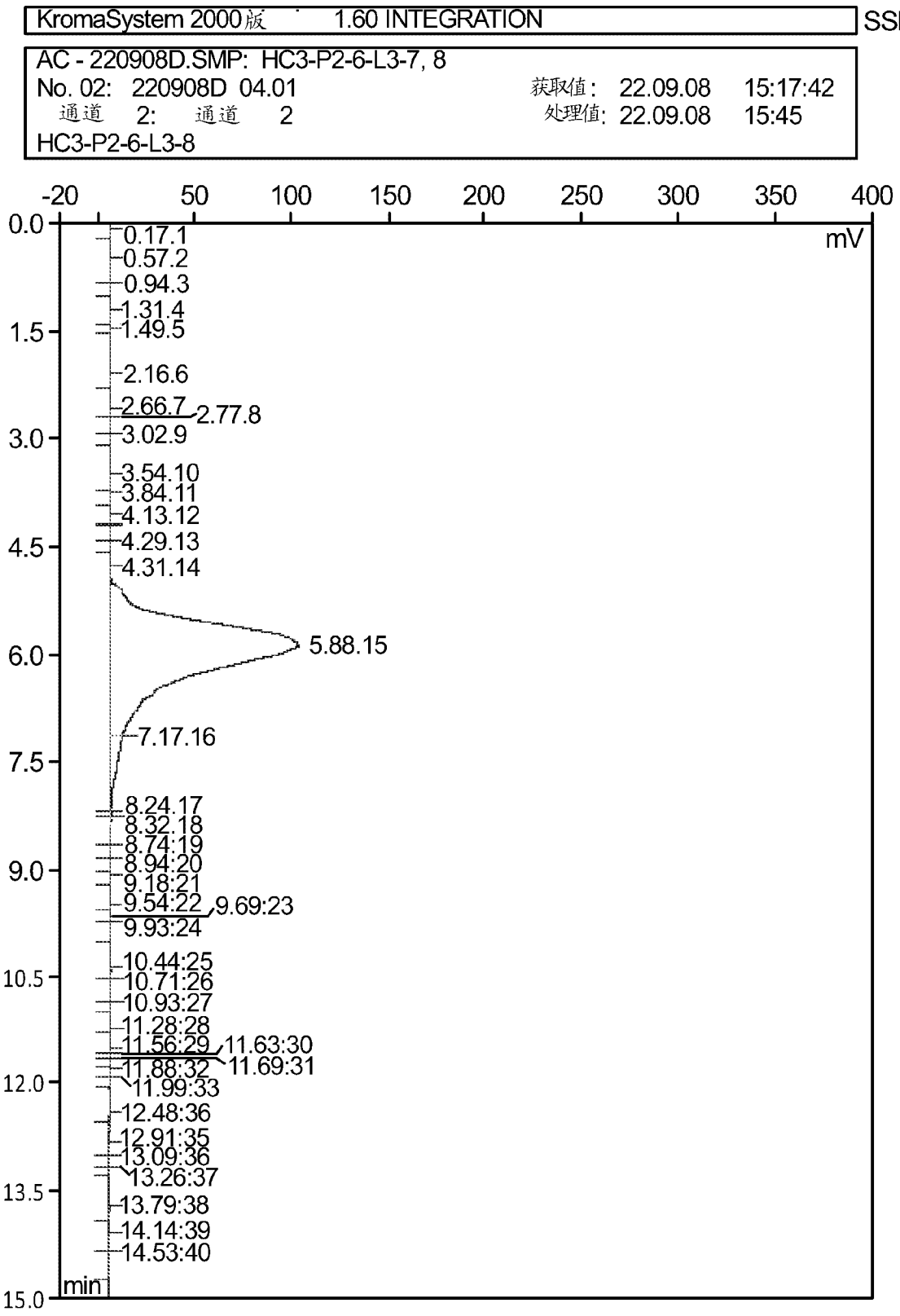

KromaSystem 2000版 1.60 INTEGRATION
SSP
AC - 220908D.SMP: HC3-P2-6-L3-7, 8
No. 02: 220908D 04.01
通道 2: 通道 2
HC3-P2-6-L3-8
获取值: 22.09.08 15:17:42
处理值: 22.09.08 15:45
-20 50 100 150 200 250 300 350 400
0.0
1.5
3.0
4.5
6.0
7.5
9.0
10.5
12.0
13.5
15.0
mV
min
0.17.1
0.57.2
0.94.3
1.31.4
1.49.5
2.16.6
2.66.7
2.77.8
3.02.9
3.54.10
3.84.11
4.13.12
4.29.13
4.31.14
5.88.15
7.17.16
8.24.17
8.32.18
8.74:19
8.94:20
9.18:21
9.54:22
9.69:23
9.93:24
10.44:25
10.71:26
10.93:27
11.28:28
11.56:29
11.63:30
11.88:32
11.69:31
11.99:33
12.48:36
12.91:35
13.09:36
13.26:37
13.79:38
14.14:39
14.53:40

图 6

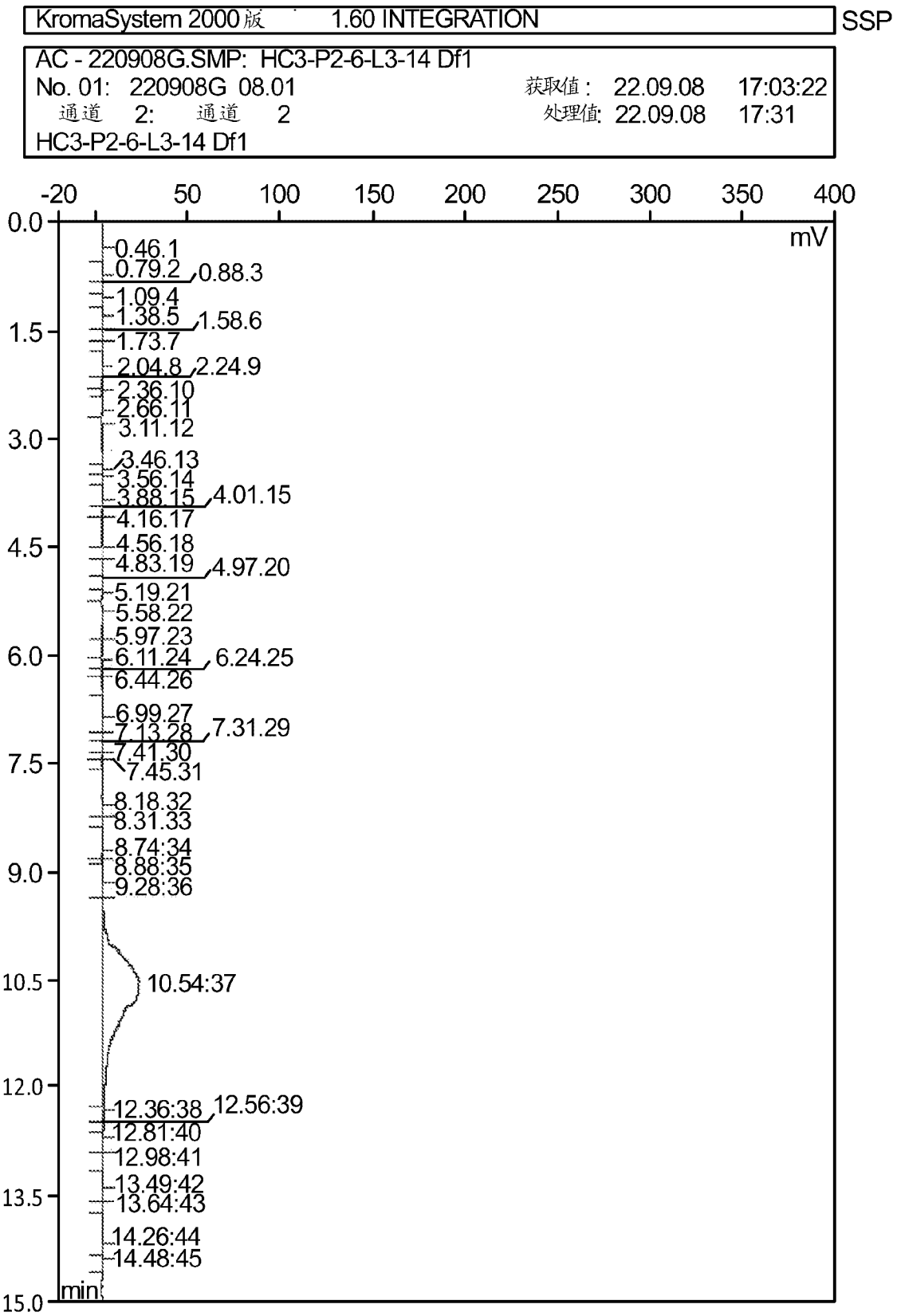

KromaSystem 2000版 1.60 INTEGRATION
SSP
AC - 220908G.SMP: HC3-P2-6-L3-14 Df1
No. 01: 220908G 08.01
获取值: 22.09.08 17:03:22
通道 2: 通道 2
处理值: 22.09.08 17:31
HC3-P2-6-L3-14 Df1
-20 50 100 150 200 250 300 350 400
mV
0.0
1.5
3.0
4.5
6.0
7.5
9.0
10.5
12.0
13.5
15.0
min
0.46.1
0.79.2
0.88.3
1.09.4
1.38.5
1.58.6
1.73.7
2.04.8
2.24.9
2.36.10
2.66.11
3.11.12
3.46.13
3.56.14
3.88.15
4.01.15
4.16.17
4.56.18
4.83.19
4.97.20
5.19.21
5.58.22
5.97.23
6.11.24
6.24.25
6.44.26
6.99.27
7.13.28
7.31.29
7.41.30
7.45.31
8.18.32
8.31.33
8.74:34
8.88:35
9.28:36
10.54:37
12.36:38
12.56:39
12.81:40
12.98:41
13.49:42
13.64:43
14.26:44
14.48:45

图 7

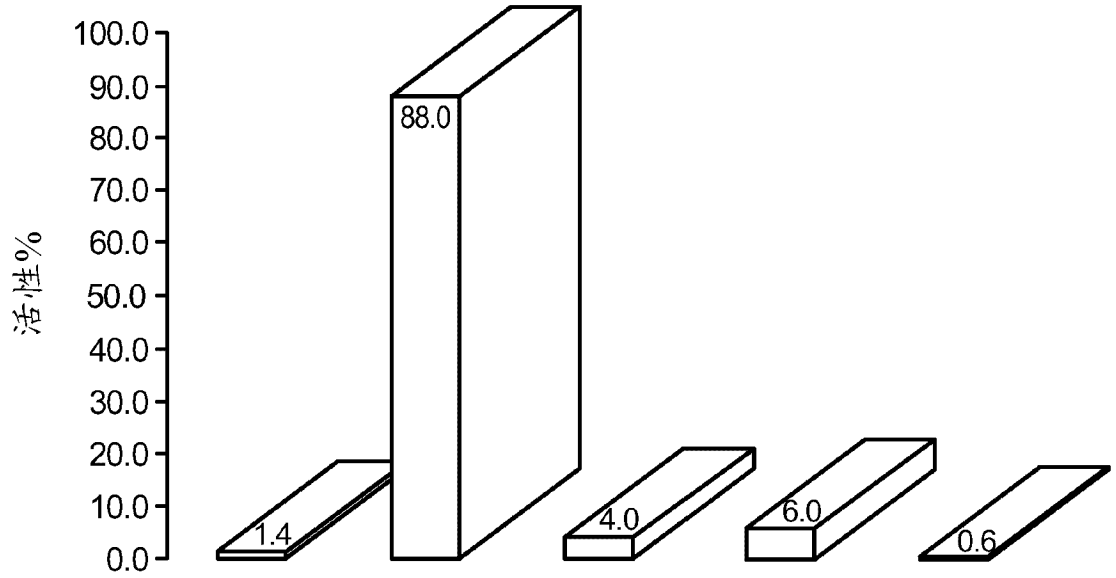

100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
活性%
1.4
88.0
4.0
6.0
0.6
在纯化后在柱中测量的Ac-DOTA-SC Ac
在纯化的之后在小瓶中吸附的Ac N-Bn/hR3 中测量的 Ac
在反应+QC 级份中测量的 Ac
在其他液体中测量的 Ac
在 QC 中测量的 Ac，动力性

图 8

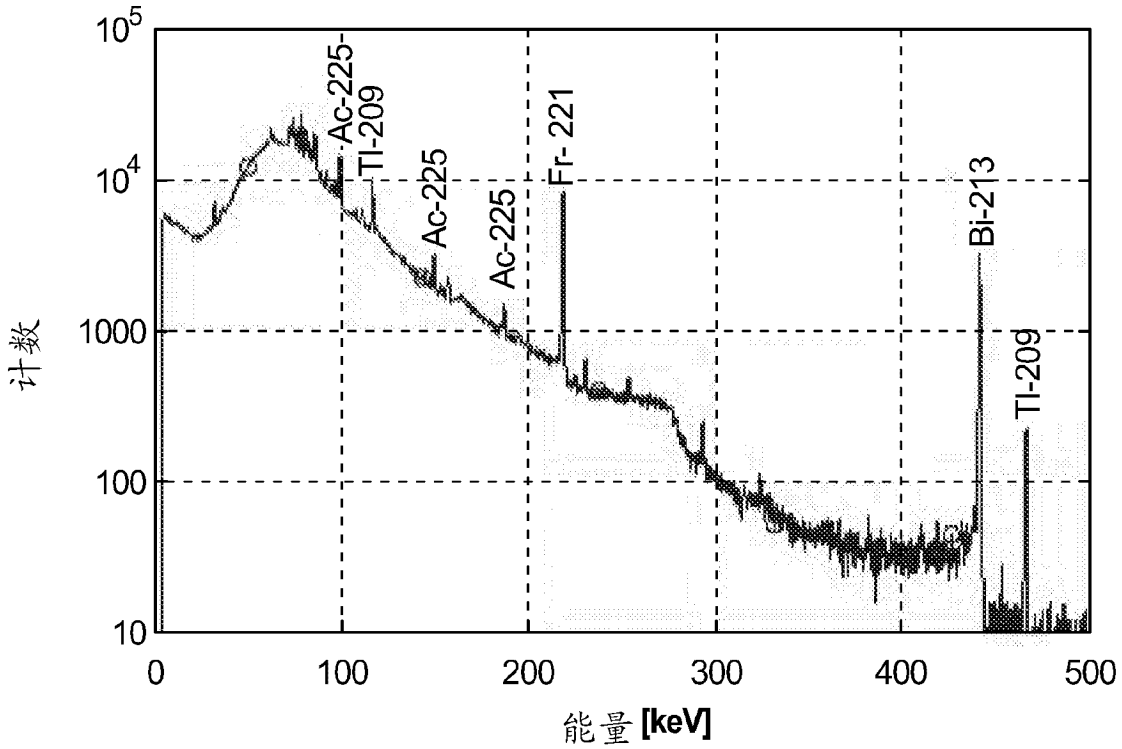

10^5
10^4
1000
100
10
计数
Ac-225
Tl-209
Ac-225
Ac-225
Fr- 221
Bi-213
Tl-209
0
100
200
300
400
500
能量 [keV]

图 9

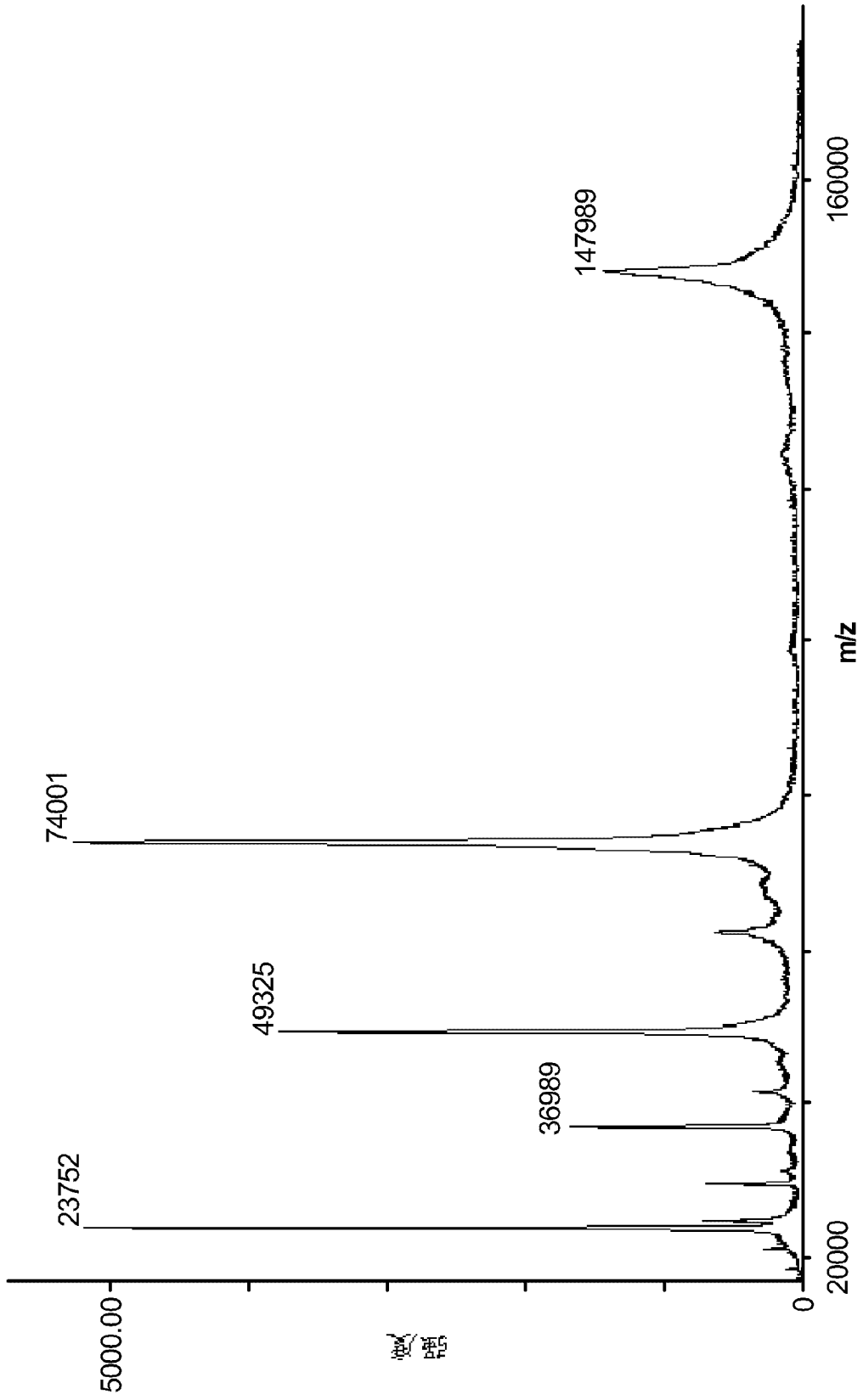


图 10

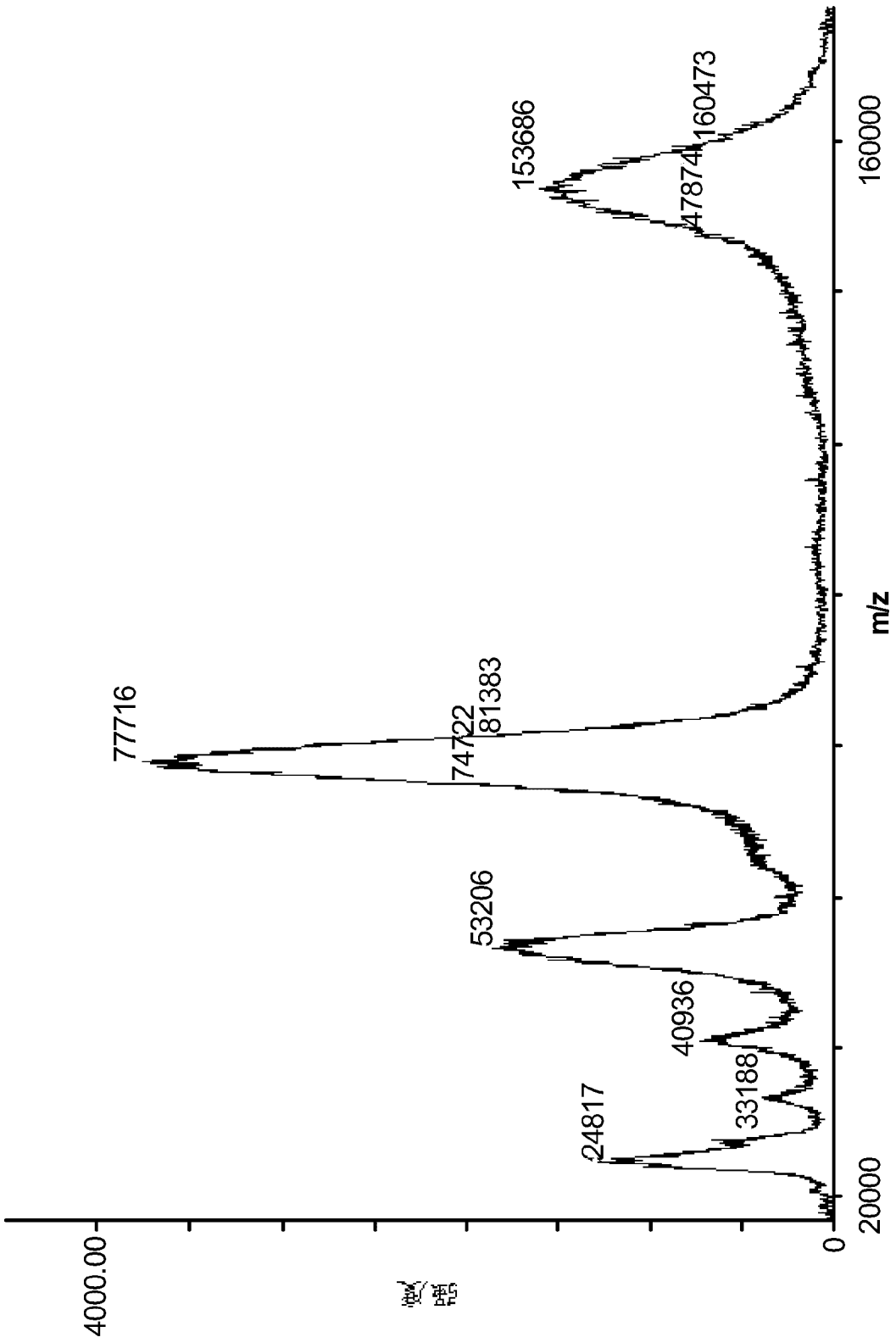

4000.00
强度
0
20000
160000
m/z
24817
33188
40936
53206
74722
77716
81383
47874
153686
160473

图 11

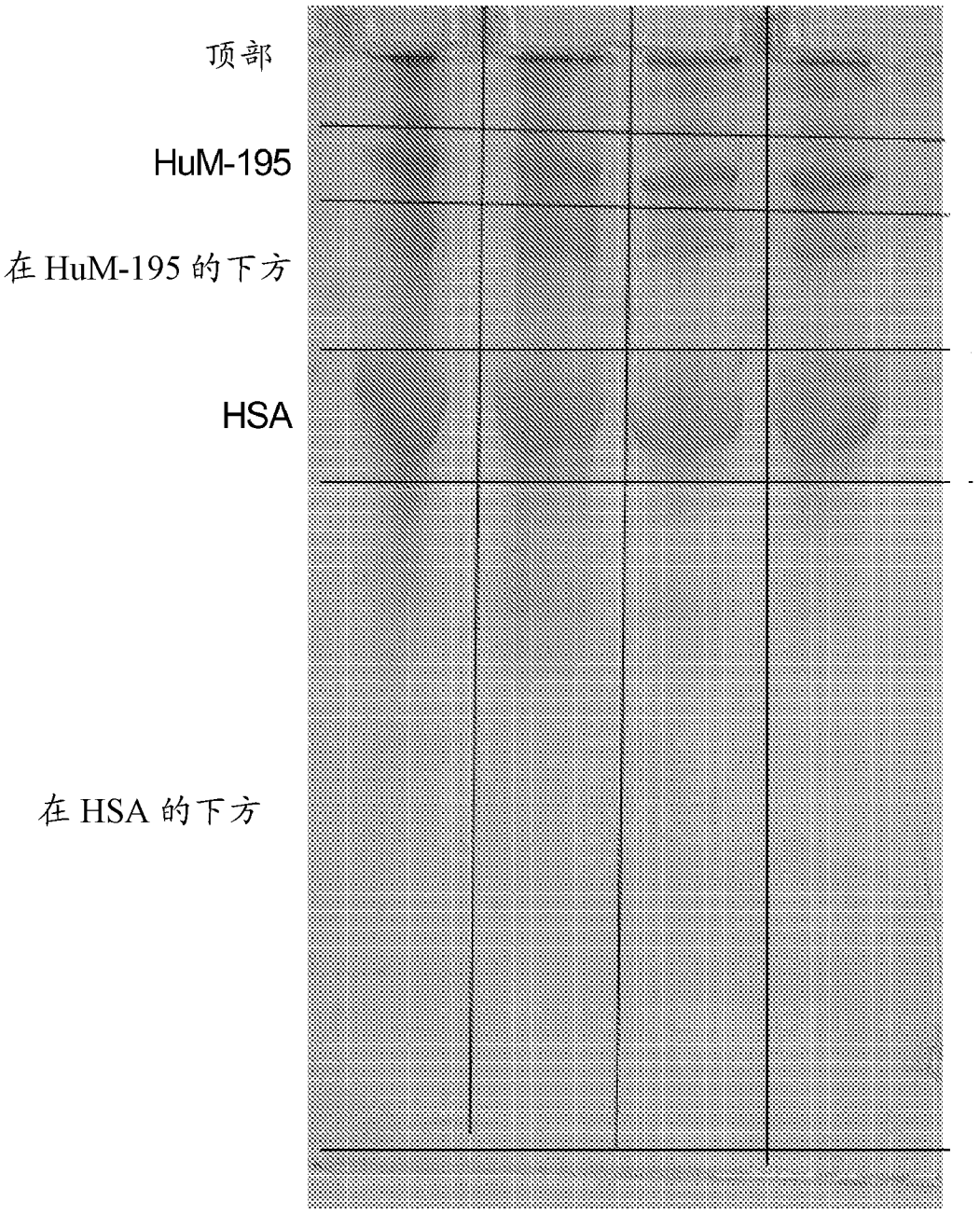


图 12

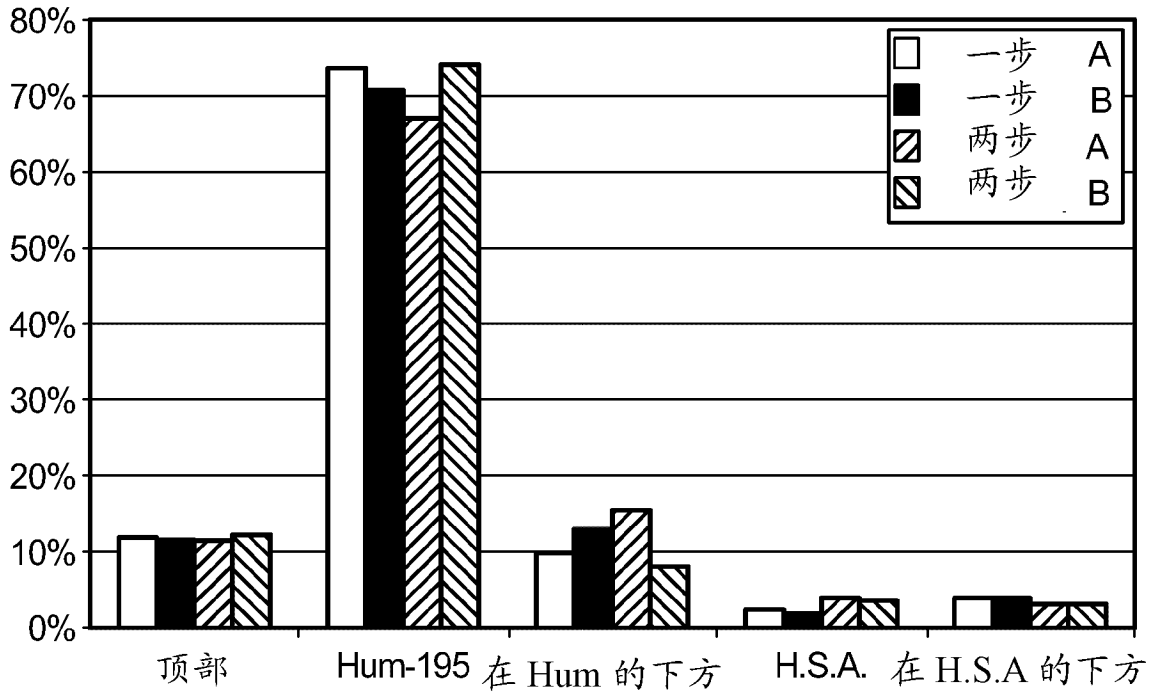

80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
一步 A
一步 B
两步 A
两步 B
顶部
Hum-195
在 Hum 的下方
H.S.A.
在 H.S.A 的下方

图 13

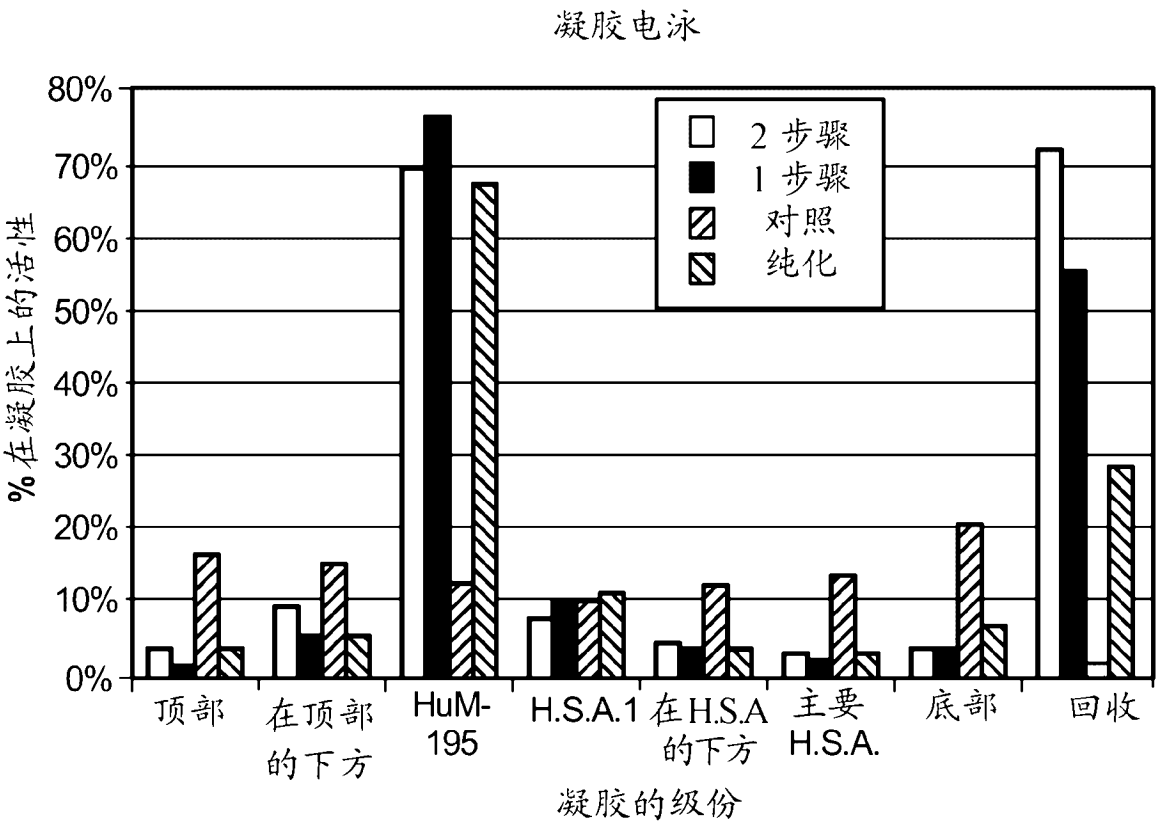

凝胶电泳
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
% 在凝胶上的活性
2 步骤
1 步骤
对照
纯化
顶部
在顶部的下方
HuM-195
H.S.A.1
在 H.S.A 的下方
主要 H.S.A.
底部
回收
凝胶的级份

图 14