

(11) Número de Publicação: **PT 1156835 E**

(51) Classificação Internacional:  
**A61K 51/08** (2007.10) **A61K 51/10** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2000.02.29</b>	(73) Titular(es): <b>BIOGEN IDEC INC.</b>	
(30) Prioridade(s): <b>1999.03.01 US 259338</b>	<b>14 CAMBRIDGE CENTER CAMBRIDGE MA</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2001.11.28</b>	<b>02142</b>	<b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2009.04.15</b> <b>142/2009</b>	(72) Inventor(es): <b>PAUL CHINN</b>	<b>US</b>
	(74) Mandatário: <b>LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO</b> <b>PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598</b> <b>CHARNECA DA CAPARICA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA RADIOMARCAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ÍTRIO-90**

(57) Resumo:  
KIT PARA MARCAR RADIOACTIVIDADE PROTEÍNAS COM ÍTRIO-90

## DESCRIÇÃO

### MÉTODO PARA RADIOMARCAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ÍTRIO-90

#### Âmbito da Invenção

A presente descrição refere-se a kits e métodos para a radiomarcção de proteínas e péptidos com radioisótopos terapêuticos as quais podem ser administradas directamente aos pacientes sem necessidade de purificação posterior. Tais kits e métodos são particularmente aplicáveis na marcação de proteínas e péptidos com ítrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ). Através da optimização do protocolo de radiomarcção não é necessária uma purificação posterior da proteína radiomarcada, os kits e métodos vieram satisfazer uma necessidade há muito sentida na técnica, uma vez que solucionaram o persistente problema de como fornecer medicamentos marcados com ítrio num formato amigável que, possibilitasse a esses medicamentos serem facilmente preparados e administrados no hospital ou em casa dos pacientes.

#### Técnica anterior

Proteínas radiomarcadas, particularmente anticorpos, tem estado sob avaliação há vários anos como potenciais reagentes de diagnóstico e terapêutica. Estes reagentes foram pensados para serem particularmente úteis na terapêutica do cancro, uma vez que os investigadores começaram agora a identificar antigénios específicos do tumor e ligandos cognatos ou anticorpos os quais se ligam aos ditos antigénios. Através da administração de um ligando radiomarcado ou um anticorpo o

qual tem uma ligação de especificidade com um antigénio específico do tumor, conjugado com um radioisótopo de gama curta, elevada energia e abundante emissão de partículas, um tendo potencial para fornecer uma dose letal de radiação directamente para as células do tumor.

Dependendo da gama de partículas de isótopo em causa, as marcações podem ser escolhidas com base na sua adequação para atingir um tipo particular de células. Por exemplo, emissores de gama são geralmente usados para fins de diagnóstico, ou seja, para visualizar tumores, mas são geralmente ineficazes como agentes de destruição. Pelo contrário, emissores alfa e beta podem ser usados para efectuar a destruição de células. Emissores alfa podem ser utilizados particularmente em doenças transmitidas por via sanguínea ou tumores vasculares onde podem alcançar uma boa penetração; embora uma emissão de partículas possa ser suficiente em alguns casos para efectuar a destruição das células, tipicamente o emissor alfa tem de estar localizado directamente na superfície da célula. Pelo contrário, os emissores beta, ou seja  $^{90}\text{Y}$ , são particularmente adequados para doenças mais localizadas e volumosas porque têm, tipicamente, uma mais longa gama de emissão.

Anticorpos e péptidos marcados com ítrio-90 mostraram, em particular, resultados encorajadores nos protocolos de terapia clínica (Thomas et al. 1995. Gamma-interferon administration after  $^{90}\text{Y}$  radiolabeled antibody therapy: survival and hematopoietic toxicity studies. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 31:529-534; DeNardo et al. 1995. Yttrium-90/Indium-111 DOTA peptide chimeric L6: pharmacokinetics, dosimetry and initial therapeutic studies in patients with

breast cancer. J. Nucl. Med. 36:97P). Tais conjugados são usualmente feitos através da ligação de um quelato bifuncional à proteína ou anticorpo, depois conjugando a radiomarcado à construção da proteína através do quelato bifuncional. Por exemplo, os pedidos de patente co-pendentes 08/475,813, 08/475,815 e 08/478967 descrevem anticorpos radiomarcados terapêuticos para a marcação e destruição de células B de linfomas e células tumorais. Particularmente revelado é o conjugado Y2B8, o qual compreende um anticorpo monoclonal de CD20 murina anti-humana, 2B8, ligada com <sup>90</sup>Y através de um quelato bifuncional, MX-DPTA.

Patentes relacionadas com quelatos e quelatos conjugados são conhecidas na técnica. Por exemplo, a Patente US 4,831,175 de Gansow refere-se a quelatos polisubstituídos de ácido dietilenotriamina penta acetato e proteínas conjugadas contendo o mesmo, e métodos para a sua preparação. A US 5,099,069, 5,246,692, 5,286,850 e 5,124,471 de Gansow também se referem a quelatos polisubstituídos de DPTA. Como descrito em Kozak et al. numerosos agentes quelatos de DTPA, incluindo o MX-DTPA, mostraram ser adequados para radioimunoterapia de anticorpos de ítrio monoclonal (1989. 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. 49:2639-2644). Estas referências são incorporadas na sua globalidade na presente descrição.

O ítrio-90 é particularmente adequado para radioimunoterapia e terapia radiopéptica por numerosas razões. As 64 horas de meia-vida do <sup>90</sup>Y são suficientes para permitir a acumulação de anticorpos através do tumor e, diferentemente do <sup>131</sup>I, este

é um puro emissor beta de elevada energia ( $E_{\max} 2.27 \text{ MeV}$ ) sem acompanhamento de radiação gama na sua decomposição. A sua gama de emissão de partículas é de 100 a 1000 diâmetros de célula, o qual é uma suficientemente mínima quantidade de radiação penetrante que seria possível administrar a um paciente em ambulatório. Além disso, não é necessária a internalização de anticorpos marcados para a destruição de células, e a emissão local de radiação ionizante deve ser letal para as células tumorais adjacentes as quais possivelmente carecem do antigénio alvo.

Contudo, apesar da reconhecida utilidade dos anticorpos marcados de ítrio e os encorajadores resultados clínicos de algumas terapêuticas de ítrio marcado, muitos pacientes são privados dos benefícios que estas terapêuticas poderiam oferecer pelas dificuldades inerentes em conduzir tanto a radiomarcagem como a administração num único local. Este significativo problema é evidente na quase completa inexistência de kits e produtos que permitam a marcação de reagentes in loco com radioisótopos emissores alfa e beta, o que pode por outro lado demonstrar a aplicabilidade comercial de tal tecnologia.

O problema em fornecer kits para radiomarcagem e subsequente administração de terapêuticas marcadas com isótopos destrutivos aparente ser a crença há muito enraizada na técnica, que, antes de tais terapêuticas poderem ser administradas a um paciente, seria necessário um exaustivo processo de purificação para a remoção de marcas soltas para não expor o paciente a radioisótopos livres os quais se poderiam acumular nos ossos e em outros órgãos não visados. Mesmo estes kits normalmente disponíveis para anticorpos

marcados com ítrio requerem uma complicada etapa de purificação antes da terapêutica estar pronta para administração.

Por exemplo, a Antisoma fornece actualmente um kit para o anticorpo monoclonal radiomarcado HMFG1 (Theragyn<sup>®</sup>) com <sup>90</sup>Y para administração subsequente a pacientes a quem foi diagnosticado cancro nos ovários. Um extenso estudo da fase I-II demonstrou que este tratamento pode ser particularmente benéfico para os pacientes como seguimento à cirurgia convencional e quimioterapia (Hird et al. 1993. Adjuvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal antibody. Br. J. Cancer 68:403-406). Já o método de marcação da Antisoma requer a remoção de uma marca livre através de filtração com gel Sephadex G50, o qual é um significativo desencorajamento ao alcance de sucesso comercial por parte do kit de marcação Theragyn<sup>®</sup>, assim como um obstáculo em assegurar que esta terapia está facilmente disponível para todos os pacientes de cancro nos ovários para os quais poderia ser benéfica.

O facto de estes reagentes requerem correntemente purificação em coluna tem sido e continuará a ser o maior obstáculo na sua disponibilidade a todos os pacientes que poderiam beneficiar desta tecnologia se fosse apresentado um método mais simplificado que permitisse aos médicos administrar de um modo rápido, eficiente e seguro estes reagentes. Por exemplo, um médico não tem tempo ou facilidade de purificar um reagente através de HPLC ou cromatografia de filtração em gel antes de o administrar a um paciente em ambulatório. Isto significa que estas facilidades adicionais teriam de estar disponíveis no local para a produção concorrente do reagente

e imediata distribuição ao médico, o que aumentaria drasticamente o custo da terapia e, em alguns casos, obrigaria o paciente a grandes deslocamentos para receber a terapia. Em alternativa, o medicamento poderia ser marcado fora do local de administração, o que implicaria uma preparação prévia e, pelo menos, algum tempo de armazenagem. Isto não tem só o efeito de enfraquecer o radioisótopo, cuja radioactividade diminui durante o armazenamento, mas, também, leva a uma significativa destruição da integridade estrutural da proteína por excessiva exposição ao radioisótopo.

Por exemplo, muitos relatórios discutiram a natureza de radiólise do  $^{90}\text{Y}$  e outros radioisótopos similares (ou seja, Salako et. al. 1998. Effects of radiolysis on yttrium-90-labeled Lym-1 antibody preparations. J. Nucl. Med. 39:667-670; Chakrabarti et al., Prevention of radiolysis of monoclonal antibody during labeling. J. Nucl. Med. 37:1384-1388). Como verificado em Chakrabarti et al., radionuclídeos tais como o  $^{90}\text{Y}$  distribuem uma grande quantidade de radiação ao anticorpo durante o processo de marcação e também durante a armazenagem. A radiação leva a níveis significativos de degradação do anticorpo, o que pode eliminar células tumorais alvo preferenciais e expor tecidos não alvo a níveis de toxicidade significativos.

O mecanismo de lesão por radiação tem sido atribuído a geração de radicais livres (Pizzarello. 1975. Direct and indirect action. In: Pizzarello and Witcofski, eds. Basic Radiation Biology, 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febger, pp. 20-29). Mas como verificado em Salako et al. A uma energia de 2.2MeV, as partículas beta emitidas do  $^{90}\text{Y}$  podem facilmente partir a maioria das ligações químicas incluindo as pontes

dissulfido de um anticorpo, as quais tem uma força de ligação de apenas 4.4eV (Skoog. 1985. Principles of Instrumental Analysis, 3rd edition. San Francisco: Saunders). Assim, quanto mais curto for o período de tempo que a proteína a ser marcada estiver exposta a radioisótopos destrutivos tais como o  $^{90}\text{Y}$ , maiores serão as hipóteses de a proteína manter a sua integridade estrutural e especificidade de ligação o que requer a interacção como o antigénio alvo até ao momento da sua administração e alcance do local alvo determinado.

A natureza de radiólise do  $^{90}\text{Y}$  é bem conhecida na técnica há muitos anos e muitos tentaram resolver o problema que o  $^{90}\text{Y}$  apresenta na aplicação comercial destas terapêuticas. Por exemplo, ambos Salako et al. E Chakrabarti et al. avaliaram o uso de radioprotectantes em preparações de anticorpo de  $^{90}\text{Y}$  marcado como meio de reduzir a degradação do anticorpo. Salako et al. em particular relataram que albumina humana possibilita a manutenção da imunoreactividade do anticorpo de  $^{90}\text{Y}$  marcado por mais de 72 horas. Contudo, a actividade específica exibida pelas preparações de Salako eram baixas (menos de 2mCi/ml). Além disso, nem Salako nem Chakrabarti reportaram nenhum esforço para obviar os extensos processos de purificação requeridos após a marcação do anticorpo. Salako et al. marca por um período de 45 minutos a 1 hora, depois purifica o anticorpo através de cromatografia por peneira molecular, enquanto que Chakrabarti marca durante cerca de três horas e purifica através de cromatografia por filtração de gel. Nenhum destes métodos é instrumental em trazer as terapêuticas de  $^{90}\text{Y}$  marcado aos pacientes em ambulatório.

Chinol e Hnatowich foram capazes de alcançar 90% de pureza radioquímica para proteínas de  $^{90}\text{Y}$  marcado com actividades específicas variando de 1-3 mCi/mg de ausência de purificação pós-marcação, usando o seu próprio gerador-produtor de  $^{90}\text{Y}$  (1987. Generator-produced yttrium-90 for radioimmunotherapy. J. Nucl. Med. 28(9):1465-1470). Contudo, os autores desencorajaram expressamente a administração a pacientes de preparações com menos de 95% de pureza, e sugeriram que o HPLC poderia ser um importante e "possivelmente essencial" passo.

Aqueles que reconheceram que o HPLC e outros tipos de purificação deviam ser eliminados nos pacientes em ambulatório e em cenário hospitalar não tiveram sucesso em desenvolver um protocolo de marcação suficiente para o  $^{90}\text{Y}$  no qual é atingido um nível elevado de marcação de incorporação e é mantido um nível aceitável de estabilidade do anticorpo. Se um nível elevado de rádio-incorporação não é atingido com consistência, o paciente pode ser exposto a um nível inaceitável de rádio-marcação livre não-ligada se esta marca não é purificada fora do reagente. Além disso, novamente, se a integridade estrutural do anticorpo é danificada isso leva a que o anticorpo perca especificidade alvo, cujos reagentes não se ligarão especificamente aos seus ligandos cognatos.

Mather e colegas salientaram o propósito de marcar anticorpos tumorais específicos com  $^{90}\text{Y}$  de uma maneira tal que a purificação pós-marcação podia ser evitada (1989. Labeling monoclonal antibodies with yttrium-90. Eur. J. Nucl. Med. 15:307-312). Contudo, Mather verificou que s'ó poderiam ser atingidos elevadas eficiências de marcação (mais de 95%) em

actividades específicas modestas (1 mCi/mg). Além disso, Mather et al. relataram que as suas preparações de anticorpo mostravam sinais de colapso (devido à radiólise) após apenas algumas horas. Isto poderia ser devido a que Mather et al., tal como faziam muitos outros, conduziam a sua reacção de marcação sobre o período de uma hora.

Por exemplo, têm havido métodos propostos para a marcação de reagentes de proteínas com marcas menos destrutivas tais como  $^{111}\text{In}$  o que evita os passos adicionais de purificação. Richardson et al. propõe um procedimento para marcar anticorpos com  $^{111}\text{In}$  com o objectivo de facilitar um formato de kit para uso em diagnóstico (Richardson et al. 1987. Optimization and batch production of DTPA-labeled antibody kits for routine use in  $^{111}\text{In}$  immunoscintigraphy. Nucl. Med. Comm. 8:347-356). Contudo, o método de marcação proposto em Richardson et al. é conduzido por um período de uma hora, o que pode ser viável com  $^{111}\text{In}$  o qual não é muito radiolítico, mas não parece ser receptivo às aplicações de marcação de  $^{90}\text{Y}$  como evidenciado através das dificuldades reportadas por Mather et al. A WO94/11026 revela o tratamento de tumores associados com células B localizados e periféricos com anticorpos radiomarcados anti-CD20. Também descreve um método de marcação de 2B8-MX-DTPA, um anticorpo conjugado, com Índio-111 e Ítrio-90.

Brechbiel et al. (Inorg. Chem. 1986, 25:2772-2781) revela a marcação de um anticorpo conjugado com Índio-111. Tem de ser empregue a exclusão de tamanho de HPLC para remover Índio-111 não reagido anticorpo marcado. A US 5595721 revela um método para tratar um linfoma com anticorpo B1 marcado radioactivamente. Também descreve a marcação do anticorpo B1

através de associação covalente de metade de quelato ao anticorpo e permitindo ao quelato coordenar a radiomarcagem.

A EP 0529645 revela a produção de conjugados de proteína e quelato de metal e exemplifica a produção de um anticorpo radiomarcado.

Isto leva-nos às surpreendentes e inesperadas vantagens da presente invenção, a qual proporciona inestimáveis avanços no processo de radiomarcagem de proteínas com  $^{90}\text{Y}$  o que não ainda não foi reconhecido por outros na técnica. Surpreendentemente, os inventores verificaram que os processos de HPLC ou outros passos de purificação que outros acharam ser necessários para alcançar um reagente puro, e os longos períodos de incubação que outros adoptaram num esforço para aumentar a actividade específica dos seus reagentes, são na realidade prejudiciais ao processo de preparação de reagentes marcados de  $^{90}\text{Y}$ . Estes processos servem apenas para aumentar a degradação da proteína devido à radiólise, levando a menos especificidade e a uma mais elevada taxa de degradação da proteína através do tempo em que a proteína radiomarcada fica pronta para ser injectada. Surpreendentemente, os inventores verificaram que uma eficiente marcação com  $^{90}\text{Y}$  (> 95% de incorporação e pelo menos 15 mCi/mg de actividade específica) pode ser completada em dois a cinco minutos, e de facto tal marcação perde a sua eficiência se os tempos de reacção forem aumentados para além de oito minutos.

O facto da marcação com  $^{90}\text{Y}$  poder ser alcançada através dos métodos da presente invenção em apenas dois minutos destruirá

o actual cepticismo existente nesta matéria em relação à aplicabilidade de kits de Ítrio radiomarcado em meio hospital e em pacientes em ambulatório. Os kits aqui revelados podem ser usados nos métodos da presente invenção e finalmente satisfarão a necessidade à longo tempo sentida e, talvez reconhecida por pacientes de cancro e médicos, em relação à aplicabilidade comercial e acessibilidade a terapêuticas para o cancro baseadas em proteínas radiomarcadas.

### **Sumário da invenção**

A presente invenção descreve métodos e kits para radiomarcado uma proteína conjugado com um quelato ou péptido com um radioisótopo terapêutico para administração a um paciente. Os métodos da presente descrição compreendem essencialmente (i) misturar a proteína conjugada com o quelato ou péptido com uma solução compreendendo o radioisótopo ou um sal, e (ii) incubar a mistura por um período de tempo suficiente sob condições favoráveis para que a proteína ou o péptido radiomarcado tenham pureza suficiente, isto é, seja alcançada tal nível de rádioincorporação, actividade específica e especificidade de ligação que o anticorpo radiomarcado possa ser administrado directamente ao paciente sem qualquer purificação posterior.

Os kits da presente descrição compreendem essencialmente (i) um frasco contendo proteína ou péptido conjugado com quelato, (ii) um frasco contendo uma formulação tampão para estabilizar e administrar o anticorpo radiomarcado a um paciente, e (iii) instruções para executar o procedimento de radiomarcado, o qual quando proteína ou o péptido conjugado

com o quelato é exposta ao radioisótopo ou sal por um período de tempo suficiente sob condições favoráveis como recomendado nas ditas instruções e descrito acima, é alcançada uma proteína ou péptido radiomarcado tendo suficiente pureza, actividade específica e especificidade de ligação tal que o anticorpo radiomarcado pode ser diluído numa concentração apropriada na dita formulação tampão e administrada directamente ao paciente sem purificação posterior.

Baseada nesta descrição, a presente invenção proporciona um método para radiomarcção de uma proteína ou péptido conjugado com um quelato com  $^{90}\text{Y}$  para administração a um paciente compreendendo:

- (i) Misturar a proteína ou péptido conjugado com o quelato com uma solução compreendendo  $^{90}\text{Y}$  ou um sal, e
- (ii) Incubar a mistura por tempo suficiente sob temperatura aceitável, pH, e condições tampão tais que a proteína ou péptido marcado com  $^{90}\text{Y}$  é produzida tendo uma rádioincorporação maior que 95%, actividade específica suficiente, e especificidade de ligação de pelo menos 50%, de modo que a proteína ou péptido radiomarcado possa ser administrada directamente ao paciente sem posterior purificação, e em que o dito tempo suficiente de incubação é inferior a oito minutos.

Outras concepções da invenção estão descritas nas reivindicações anexas.

## **Breve descrição dos desenhos**

Figura 1. A) células SB foram lavadas e ressuspensas a  $90 \times 10^6$  células/ml com uma diluição tampão (1 x PBS, pH 7.4 contendo 1% (peso/volume) de albumina bovina). Crescentes concentrações de células foram incubadas por 3h com 2ng/ml de Y2B8 preparado usando 2B8-MX-DTPA lote #0165<sup>a</sup>. B) Concentração de parcela de células duplas inversas vs. radioatividade limite/radioatividade total (B/AT). A imunoreactividade foi calculada como  $1/y$  interceptar x 100. Os valores da imunoreactividade e do coeficiente de correlação (R) eram 72.2% e 0.999, respectivamente.

## **Descrição detalhada da invenção**

A não ser que sejam definidos de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados nesta descrição têm o mesmo significado tal como entendido comumente pelos peritos da técnica a que esta invenção pertence. Apesar de quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos possam ser usados na prática ou em testes da presente invenção, são aqui descritos os métodos e materiais preferenciais.

A presente descrição revela um método para radiomarcagem de uma proteína ou um péptido conjugado com um quelato com um radioisótopo terapêutico para administração a um paciente compreendendo (i) misturar a proteína ou o péptido conjugado com o quelato com uma solução compreendendo o radioisótopo ou

o sal, e (ii) incubar a mistura por um período de tempo suficiente sob condições favoráveis para que a proteína ou o péptido radiomarcado tenham pureza suficiente, isto é, seja alcançada tal nível de rádioincorporação, actividade específica e especificidade de ligação que o anticorpo radiomarcado possa ser administrado directamente ao paciente sem qualquer purificação posterior. "Purificação posterior" inclui HPLC, filtração por gel, outros tipos de cromatografia em coluna e outras quaisquer técnicas de separação empregues com o fim de remover radiomarcados não conjugados livres ou limitados.

Os métodos da presente descrição são particularmente aplicáveis a radioisótopos terapêuticos os quais são tipicamente radiolíticos e além disso potencialmente perigosos para a integridade estrutural da proteína. Tais radioisótopos terapêuticos são geralmente seleccionados do grupo consistindo em emissores alfa e beta. Radionucleidos terapêuticos preferidos incluem  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{195}\text{Au}$  e  $^{199}\text{Ag}$  ou  $^{177}\text{Lu}$ . Outros radionucleidos os quais tenham utilidade terapêutica são descritos na patente US 5,541,287.

Radionucleidos particularmente preferidos são aquelas que emitem radiação beta forte os quais podem causar decomposição intramolecular, tais como  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$  e  $^{188}\text{Re}$ . Apesar de um radioisótopo "terapêutico" se referir geralmente a radioisótopos tais como emissores beta e gama os quais tem um efeito citotóxico, estes radioisótopos também podem ser usados para fins de diagnóstico, tais fins não retiram estes isótopos do âmbito da presente descrição uma vez que a

natureza radiolítica destes isótopos torna-os adequados para os métodos e kits descritos.

Os métodos da presente descrição podem ser usados para marcar proteínas ou péptidos, particularmente aqueles em que a integridade estrutural tem de ser mantida para um fim específico. Proteínas preferidas são anticorpos ou fragmentos tais como Fab, (Fab)<sub>2</sub> e fragmentos Fv, os quais reconhecem os antigénios específicos ou associados a um tumor. Péptidos preferidos incluem somatostatina, péptido vasointestinal (VIP), substância P e outros que se ligam a receptores celulares. Tais péptidos e quelatos conjugados derivados de tais péptidos são revelados na patente US 5,830,431.

“Tempo suficiente de incubação” como referido nos métodos desta descrição é a média de tempo aceitável durante o qual é alcançada a radioincorporação e a pureza radioquímica suficientes com as quais o reagente pode ser administrado directamente ao paciente sem necessidade de posterior purificação. Radioincorporação e pureza suficientes são geralmente reconhecidas na técnica ser pelo menos de 95%, mas podem variar dependendo da toxicidade da marca. Também deve ser evidente para o perito na técnica que a extensão da radioincorporação considerada suficiente é, também, a função do nível desejado de eficácia. Para o <sup>90</sup>Y, e particularmente os anticorpos marcados de <sup>90</sup>Y da presente descrição, este tempo suficiente pode ser geralmente menos de cerca de oito minutos, e mais preferencialmente entre cerca de dois minutos e cerca de cinco minutos, dada uma razão molar favorável do quelato à proteína no quelato conjugado com a proteína a ser marcado.

Deverá ser evidente para o perito na técnica que o tempo óptimo requerido para marcar uma proteína específica pode variar em função da proteína, da radiomarcagem e do conjugado empregue. Um factor subjacente à optimização do tempo atribuído para a radiomarcagem é a razão entre o quelato e a proteína do reagente que é marcado. Por exemplo, a razão entre o quelato e a proteína tem de ser elevada o suficiente para alcançar um nível terapêutico útil da incorporação, isto é, 95%, mas deve, também, não ser tão elevada que a integridade estrutural ou imunoreactividade da proteína fique comprometida. Isto requer um certo equilíbrio de processos o que nalguns casos pode levar a um nível mais baixo do quelato conjugado e maior tempo de marcação.

Por exemplo, os inventores verificaram que marcar com  $^{90}\text{Y}$  ao desejável nível de pureza podia ser realizado em menos de cinco minutos usando MX-DTPA como quelato e apenas cerca de  $1^{1/2}$  a 1 razão molar entre o quelato e o anticorpo. Embora a razão entre o quelato e o anticorpo pode ser aumentada, isso não é necessário porque o nível desejado de radioincorporação e actividade específica é alcançado após um período curto de marcação. Dada esta verificação, os parâmetros tais como as concentrações de quelato à proteína podem ser facilmente determináveis por meios empíricos pelo o perito na técnica para outras proteínas e péptidos, dependendo da escola da marcação terapêutica, da escolha do quelato, do número de locais disponíveis para a fixação do quelato, susceptibilidade da proteína à radiólise, nível desejado de eficácia, etc.

Qualquer quelato bifuncional pode ser usado nos métodos da presente descrição, incluídos nos métodos da presente

invenção, desde que sejam capazes de ligar a proteína e o radioisótopo em causa. Quelatos preferidos podem ser seleccionados do grupo consistindo em MX-DPTA, fenil-DTPA, benzil-DTPA, CHX-DTPA, DOTA e seus derivados. Um quelato particularmente preferido é o MX-DTPA.

“Condições favoráveis” como referidas nos presentes métodos incluem temperatura aceitável, pH e condições de tampão. Deve ser evidente para um perito na técnica que as condições de reacção não devem ser escolhidos se forem inibidoras ou por lado, não conduzirem à reacção de marcação. Lewis et al. discute condições de reacção a serem consideradas aquando da radiomarcacão de imuniconjugados, e aqui incorporadas por referência (1994. A facile, water-soluble method for modification of proteins with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolabeled immunoconjugates. Bioconjugate Chem. 5:565-576).

Uma temperatura aceitável para a reacção pode variar dependendo da proteína a ser marcada, mas em geral varia entre cerca de 25°C e cerca de 43°C. Lewis et al. verificou que o aumento da temperatura da reacção de radiomarcacão de 25°C a 43°C aumentando tanto a eficiência da incorporação radiometal como a estabilidade cinética do DOTA radioconjugados examinados.

Um pH aceitável pode variar consideravelmente dependendo da radiomarcacão a ser usada. O pH recomendado por marcação com radionucleidos diferentes é geralmente conhecido na técnica e pode ser escolhido de acordo com o radioisótopo.

Por exemplo, para o  $^{90}\text{Y}$ , um pH aceitável pode variar de cerca de 3 a cerca de 6, mas é mais preferível cerca de 4.2.

Tampões aceitáveis podem também variar em função da radiomarcagem. Por exemplo, Lewis et al. e outros verificaram que a presença de citrato inibe as reacções de radiomarcagem com  $^{90}\text{Y}$ . Assim, o tampão de citrato não seria apropriado se o  $^{90}\text{Y}$  fosse escolhido como radiomarcagem. Quando a marcação é feita com  $^{90}\text{Y}$ , o tampão preferido é um tampão de acetato, mais particularmente um tampão de acetato de sódio numa concentração entre cerca de 10 e cerca de 1000 mM.

Se não inibir ou pelo contrário afectar adversamente a reacção de marcação, também é possível incluir um radioprotectante (não adverso) na reacção tampão. De acordo com Chakrabarti, o ácido ascórbico é um desses radioprotectantes que não interfere com o processo de marcação. Contudo, deve utilizar-se cautela quando se emprega albumina humana na reacção de marcação devido à presença de metais os quais interferem com o processo de marcação.

Na medida em que a presente descrição diz respeito a proteínas radiomarcadas com isótopos radiolíticos particulares, tem de haver um certo equilíbrio entre a especificidade de ligação e a actividade específica que o perito na técnica encontrará quando puser em prática os métodos da presente descrição. Por exemplo, quando a actividade específica é muito alta (isto é, adequadamente acima de 5mCi/mg, preferencialmente acima de 10mCi/mg e mais preferencialmente acima de 15mCi/mg), uma proteína constringida tendo a desejada especificidade de ligação terá

uma significativa capacidade de destruição da região do tumor. Contudo, a porção de proteínas na totalidade que retenham a sua imunoreactividade poderá ser mais baixa que a da globalidade que tenha uma mais baixa actividade específica devido a radiólise do radiomarcado. Dependendo do nível desejado de actividade específica, o perito poderá escolher comprometer um certo nível de imunoreactividade.

Por exemplo, os inventores verificaram que, com  $^{90}\text{Y}$ , detido e submetido conjuntamente, revela-se ensaios de ligação que podem ser usados para aferir a percentagem de afinidade de ligação e imunoreactividade dos conjugados após a marcação, se desejado. Deve ser salientado que, apesar de não ser requerida nenhuma purificação posterior após os métodos de marcação da presente descrição, um ensaio baseado em TLC para verificar o nível de radioincorporação deve sempre ser efectuado para não pôr em perigo a saúde do paciente. Tal ensaio pode ser efectuado em cerca de 3-4 minutos, e não deve afectar significativamente a estabilidade ou a eficácia do radioterapêutico.

A presente descrição também incluem kits para radiomarcado um conjugado de quelato e proteína com um radioisótopo terapêutico para administração a um paciente compreendendo (i) um frasco contendo proteína ou péptido conjugado com quelato, (ii) um frasco contendo uma formulação tampão para estabilizar e administrar o anticorpo radiomarcado a um paciente, e (iii) instruções para executar o procedimento de radiomarcado, o qual quando proteína ou o péptido conjugado com o quelato é exposta ao radioisótopo ou sal por um período de tempo suficiente sob condições favoráveis como recomendado nas ditas instruções e descrito acima, é alcançada uma

proteína ou péptido radiomarcado tendo suficiente pureza, actividade específica e especificidade de ligação tal que o anticorpo radiomarcado pode ser diluído numa concentração apropriada na dita formulação tampão e administrada directamente ao paciente sem purificação posterior. O dito conjugado de quelato e proteína ou péptido podem ser fornecidos em forma liofilizada.

Deve ser entendido que os kits da presente descrição estão concebidos para satisfazer os métodos descritos e podem ser utilizados para este propósito. Nesse sentido, deve ser evidente para os entendidos quando lerem a descrição que as instruções do kit deverão ser baseadas nos métodos acima descritos, e que as considerações acima mencionadas tem a mesma relevância e significado quando consideradas em relação aos kits. Suplementarmente, deve resultar evidente da leitura da descrição como um todo, que kits alternativos estão considerados na presente descrição os quais podem conter componentes tais como um tampão de acetato para ajustar o pH da radiomarcção como acima descrito.

Um componente particularmente vantajoso dos kits é a formulação tampão para estabilização contra os efeitos da radiólise e administração do anticorpo radiomarcado conjugado a um paciente. A formulação tampão é um portador farmacologicamente aceitável que serve tanto de diluente para o anticorpo marcado como um tampão de administração. Apesar de qualquer diluente farmacologicamente aceitável poder ser usado para administração de anticorpos terapêuticos ou de diagnóstico a um paciente, a formulação tampão da presente descrição é particularmente adequada para administrar anticorpos radiomarcados.

Por exemplo, a formulação tampão da presente descrição compreende um radioprotectante tal como a albumina humana (HSA) ou ascórbico, os quais minimizam a radiólise devida a Ítrio e outros radionucleídeos fortes. Outros radioprotectantes são conhecidos na técnica e podem também ser usados na formulação tampão da presente descrição, isto é, decompositores de radicais livres (fenol, sulfitos, glutathiona, cisteína, ácido gentísico, ácido nicotínico, ascorbilo palmitato, HOP(:O)H<sub>2</sub>, glicerol, sódio formaldeído sulfoxilato, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e SO<sub>2</sub>, etc.

A formulação tampão da presente descrição também compreende o excesso de quelato não conjugado. O propósito de incluir quelato não conjugado é que este quelato serve para decompor qualquer não proteína limitada radiomarcada no paciente, e causa a excreção da radiomarcagem assim reduzindo a absorção de isótopos de "procura de ossos", isto é, <sup>90</sup>Y, pelos ossos do paciente. Por exemplo, quando o anticorpo do kit é conjugado com um quelato DTPA, pode ser incluído na formulação tampão um excesso de DTPA ou qualquer outro quelato. A formulação tampão é preferencialmente abastecida num volume tal que o seu conteúdo completo é transferido para o frasco de reacção. Como discutido acima, isto resulta num aumento da facilidade de uso e reprodutibilidade uma vez que não têm de ser medidos e transferidos volumes exactos.

Uma formulação tampão preferida compreende um tampão de fosfato ou soro fisiológico, albumina humana e DTPA. A albumina humana é preferível numa concentração entre cerca de 5 a 25% (peso/volume), e mais preferencialmente numa concentração de cerca de 7.5% (peso/volume). A concentração de DTPA é preferencialmente de cerca de 1mM. O ascorbato pode

ser usado em alternativa à albumina humana, e é tipicamente usado numa concentração de cerca de 1 a 100 mg/ml. No entanto pode ser usado um grande número de concentrações sem comprometer a segurança do paciente.

O kit pode ser fornecido em outras formas alternativas dependendo das preferências do comprador. Por exemplo, o kit pode compreender um frasco de reacção estéril posterior no qual a reacção de marcação e a diluição na formulação tampão podem ambas ser realizadas. Outros kits são idealizados em que é fornecido o tampão para ajustar o pH do radiomarcado no frasco actual de reacção para evitar desperdícios. Também idealizado são kits que compreende um frasco de radioisótopo, embora possa ser mais viável encomendar primeiro o kit de marcação e encomendar o radioisótopo separadamente mais tarde, imediatamente antes da administração. Também idealizados são kits que compreendem um frasco de proteína ou péptido secundário para servir tanto de controlo da avaliação da afinidade de ligação do produto radiomarcado, como em certos casos ser empregue num regime de terapêutica combinada com a proteína ou péptido radiomarcado.

#### **Descrição detalhada de aspectos preferenciais desta descrição**

Tem sido correntemente avaliado em ensaios clínicos um anticorpo anti-CD20 (Y2B8) de <sup>90</sup>Y murina monoclonal marcado para o tratamento de linfoma de células B reincidente. O anticorpo 2B8 é um anticorpo de murina que reconhece o CD20 humano. A versão quimérica deste anticorpo (Rituxan<sup>®</sup>) recebeu recentemente aprovação pela FDA para o tratamento de linfoma não-Hodgkin. O pedido com o n° de série US 08/475,813 revela

administração sequencial de Rituxan® com um anticorpo de murina monoclonal marcado com Ítrio num regime terapêutico combinado, em que a administração do anticorpo anti-CD20 marcado com Ítrio seguido da administração de Rituxan® é suficiente para (a) limpar quaisquer células B periféricas do sangue remanescentes não eliminadas pelo anticorpo anti-CD20 quimérico; (b) começar a depleção de células B dos nódulos do linfoma; ou (c) começar a depleção de células B de outros tecidos.

Assim, dada como provada a eficácia do anticorpo anti-CD20 no tratamento de linfomas não-Hodgkin, e a conhecida sensibilidade dos linfócitos a radioactividade, será muito vantajoso para esta terapêutica de anticorpos tornar-se disponível comercialmente em forma de kit pelo que podem ser facilmente modificados com uma radiomarcção e administrados directamente ao paciente em meio hospitalar.

Um kit de radiomarcção do anticorpo 2B8 compreende preferencialmente quatro componentes: 1.) 2B8-MX-DTPA em solução salina normal de metal fraco a 2mg/ml, 2.) 50 mM de acetato de sódio usado para ajustar a solução de radioisótopo ao apropriado pH de marcação, 3.) formulação tampão (IX PBS, pH 7.4 contendo 7,5% de albumina humana e 1mM de DPTA), e opcionalmente, 4.) um frasco de vidro vazio de 10 ml (frasco de reacção) (um frasco de reacção de "10 ml" contém confortavelmente 10 ml e, até tecnicamente, mais de 10 ml). Todos os componentes são testados para serem estéreis e livre de pirogénicos.

Esta secção sumariza a validação deste kit de radiomarcção o qual é simples e fácil de usar e que produz anticorpos

radiomarcados com  $\geq 95\%$  de radioincorporação e aceitável retenção de ligação para antigénio de células positivas.

Foi também concluída uma avaliação dos parâmetros experimentais afectando a ligação e a radioincorporação.

### **Exemplo 1. Kit de radiomarcção e método para marcar 2B8 com $^{90}\text{Y}$**

#### A. Reagentes no kit de radiomarcção

1. 2B8-MX-DTPA, IDEC; lote #082395RM2
2. 50mM de acetato de sódio, metal fraco, IDEC; lote #082395RM3
3. Formulação tampão (IX PBS, pH 7.4 contendo 7,5% (peso/volume) de albumina humana e 1mM de DTPA), IDEC, lote #082395RM1;
4. Frasco de reacção, 10 ml, IDEC

#### B. Materiais e equipamento

1. Kit de radioincorporação Biodex Tec-Control, Cat.#151-770
2. Luvas: sem pó
3. Seringas de polipropileno estéreis
4. Agulhas para seringa estéreis
5. Tubos pequenos com fecho; 1,5 ml

#### C. Métodos

## 1. Preparação de um kit de radiomarcção usando Y2B8

Os reagentes do kit são preparados e introduzidos num frasco de septo de vidro. Foram lavados frascos de borosilicato de tipo I (2 ou 10 ml) com água estéril para injeção (WFI) e passadas na autoclave antes do enchimento. Septos de borracha butílica foram lavados com WFI estéril e passados na autoclave antes de serem usados. Os reagentes foram enchidos manualmente e crimpados num quarto Classe 100 e testados para pirogenicidade e esterilidade usando métodos USP.

Reagentes Adicionais:

1. Ítrio-[90], sal de cloreto, portador livre, em HCl.

Precauções:

1. Todos os passos devem ser executados usando técnica asséptica.
2. Aos componentes do kit de radiomarcção deve ser permitido atingirem a temperatura ambiente antes da utilização.

Protocolo de radiomarcção:

1. O volume de  $^{90}\text{YCl}_3$  a adicionar ao frasco de reacção foi calculado do modo seguinte:
  - a. A concentração de radioactividade no período da radiomarcção:

$C_0$  = concentração de radioactividade no período de calibração (ver o Certificado de Análise do fabricante)

$\Delta t$  = mudança em tempo (o número positivo é após calibração, o número negativo é antes da calibração).

$$\text{Concentração de radioactividade no período de marcação} = \frac{C_0}{e^{0.0108 (\Delta t)}}$$

b. O volume de  $^{90}\text{YCl}_3$  a adicionar ao frasco de reacção:

$$\frac{45 \text{ mCi}}{\text{Concentração de radioactividade no período de marcação}} = \text{Volume adicionado ao frasco de reacção}$$

2. O volume de 50mM de acetato de sódio a adicionar a frasco de reacção é calculado como segue:

a. Para  $^{90}\text{YCl}_3$  em 0.040 M HCl (Amersham)

$$\text{Volume } ^{90}\text{YCl}_3 \text{ (Passo 1b)} \times (0.8) = \text{volume de acetato de sódio a adicionar}$$

b. Para  $^{90}\text{YCl}_3$  em 0.050 M HCl (Nordion):

$$\text{Volume } ^{90}\text{YCl}_3 \text{ (Passo 1b)} \times (1.0) = \text{volume de acetato de sódio a adicionar}$$

3. O frasco septo de reacção e o frasco de acetato de sódio foram limpos com álcool. Usando uma seringa de 1cc, o volume calculado (Passo 1a ou 1b) de 50mM de acetato de sódio (Passo 2) foi transferido para o frasco de

- reação. O frasco foi misturado por inversão diversas vezes.
4. O frasco fonte de septo de  $^{90}\text{YCl}_3$  foi limpo com álcool. O frasco equipado com uma agulha estéril de filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ . Usando uma seringa estéril de 1cc foi aspirado o volume requerido (Passo 1b) de  $^{90}\text{YCl}_3$  e transferido para o frasco de reação. O frasco foi misturado por inversão diversas vezes.
  5. O frasco septo de 2B8-MX-DTPA foi limpo com álcool. Usando uma seringa estéril de 3cc, foi transferido 1,5 ml de 2B8-MX-DTPA para o frasco de reação. O frasco foi misturado por inversão diversas vezes.
  6. O volume total da mistura de reação foi calculado adicionando a quantidade de clorido de Y-90 adicionado (Passo 4), mais a quantidade de 50mM de acetato de sódio adicionado (Passo 3), mais a quantidade de 2B8-MX-DTPA adicionado (Passo 5).
  7. O volume da formulação tampão a adicionar ao frasco de reação para obter o volume final de 10 ml foi calculado subtraindo o volume total da reação calculado no Passo 6.
  8. O frasco da formulação tampão foi limpo com álcool e o frasco aspirado. Devido à viscosidade da formulação tampão, o frasco de reação está equipado com uma agulha ajustada num filtro de seringa de 0.20  $\mu\text{m}$ . Usando uma seringa estéril de 10cc equipada com uma agulha de calibre adequado, o volume de formulação tampão calculado no Passo 7 é transferido para o frasco de reação. A agulha de aspiração é removida do frasco de reação e o frasco é misturado por inversão diversas vezes (Produto final). O frasco é incubado pelo menos 5 minutos antes de fazer "o ensaio de radioincorporação".

A cor da solução era âmbar e o frasco de reacção estava cheio confirmando assim que a formulação tampão foi adicionada.

9. A radioactividade total do produto final foi medida usando a instrumentação apropriada para a medição de  $^{90}\text{Y}$ .

10. O produto final foi imediatamente armazenado a  $2^{\circ}\text{-}8^{\circ}\text{C}$  até ser necessário para administração a pacientes.

## 2. Ensaio de radioincorporação

A percentagem de radioincorporação foi determinada por cromatografia instantânea de camada fina (ITLC) usando o kit de radiocromatografia Biodex Tec-Control de acordo com o protocolo seguinte:

Materiais adicionais e equipamento:

1. 2B8-MX-DTPA radiomarcado com  $^{90}\text{Y}$
2. Tubos para contagem de tiras de TLC radioactivo
3. Tesouras
4. Seringa estéril, 1cc
5. Agulhas estéreis, 26G
6. Contador gama ou contador de cintilação
7. Pipeta

Procedimento:

1. Primeiramente, deve ser lido todo o Manual Operativo Biodex.

2. Cada amostra radiomarcada em triplicado foi testada de acordo com o kit de instruções; foi colocada uma tira por frasco.
3. Foi usada uma pipeta para colocar uma gota de 1µl da amostra radiomarcada na tira de cromatografia. Em alternativa, pode ser colocada uma pequena gota dispensada por uma agulha 26G anexada a uma seringa estéril de 1cc. O anticorpo permanece na origem, e o <sup>90</sup>Y-DTPA não incorporado move-se com o solvente.
4. Cada secção foi contada para a actividade usando um contador apropriado, isto é, um contador de cintilação para o <sup>90</sup>Y, ajustado para o ambiente.
5. Foram seguidas as instruções Biodex para calcular a percentagem de anticorpo radiomarcado.

### Ensaio de ligação

#### Reagentes adicionais

1. <sup>90</sup>Y2B8-MX-DTPA
2. Células liofilizadas - as linhas de células humanas SB (CD 20-positivo) foram obtidas na American Type Culture Collection e cultivadas em frascos T usando RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino suplementado com 2% de glutamina. As culturas foram mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram desintegradas 1:2 todos os dias e colhidas a 0.5-2.5 x 10<sup>6</sup> células/ml e viabilidade > 80%. As concentrações de células foram determinadas usando um hemacitometro e a viabilidade determinada por exclusão com azul de tripano. As células foram colhidas à temperatura ambiente a uma densidade de 0.5-2 x 10<sup>6</sup> células/ml por centrifugação (1300 rpm num centrifugador

Sorval) e lavadas duas vezes com 1X HBSS. As células peletizadas foram ressuspensas a  $50 \times 10^6$  células/ml em 1X HBSS contendo 1% (peso/volume) de albumina bovina (BSA) e 10% (peso/volume) de manitol (tampão de liofilização), 0.5 ml dispensados em tubos de polipropileno microcentrífugos de 1.5 ml com juntas o-ring e armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , e liofilizado toda a noite a 30-60 millitorr. Foram armazenados e desidratados tubos de células liofilizadas a  $2-8^{\circ}\text{C}$  e reconstituídos em água estéril para ensaios; foram armazenados e desidratados tubos microcentrífugos de células liofilizadas.

3. Água estéril para irrigação ou água estéril para injeção.
4. Tampão de diluição (1X PBS, pH 7.2-7.4 contendo 1% de albumina bovina (BSA) e 0.02% de azida de sódio).

#### Procedimento:

##### Preparação de uma amostra de anticorpo radiomarcado

1. Foi obtido um anticorpo radiomarcado armazenado a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
2. Foi retirado um volume de  $10\mu\text{l}$  com um P20 e adicionado a um tubo microcentrífugo de 1.5 ml contendo  $990\mu\text{l}$  de tampão de diluição (1:100 diluição). O bico é lavado e o tubo é inclinado ligeiramente.
3. É obtido um tubo estéril de polipropileno com tampa de 50 ml e adicionado 10 ml de tampão de diluição, usando uma pipeta serológica de 10ml.
4. Foi retirado um volume de  $35\mu\text{l}$  com um P200 do tubo de diluição 1:100 e adicionado ao tubo cônico contendo 10 ml de tampão de diluição. É misturado cuidadosamente.

## Preparação de células liofilizadas

1. Foram obtidos três tubos de células SB liofilizadas.
  2. Foi adicionado a cada tubo um volume de 0.5 ml de SWFI, e os tubos foram inclinados até serem obtidas suspensões de uma única célula.
  3. Foram obtidos três tubos microcentrífugos de 1.5 ml vazios; foi adicionado aos três tubos 0.5 ml de tampão de diluição representando um controlo sem células.
- Protocolo de ensaio

1. Foi adicionado a cada tubo um volume de 0.5 ml de  $^{90}\text{Y2B8-MX-DTPA}$  diluído.
2. Os tubos foram colocados numa misturadora por 45 minutos, após se ter assegurado que as tampas estavam bem fixadas.
3. Após 45 minutos de incubação à temperatura ambiente, as células foram peletizadas por microcentrifugação durante 5 minutos.
4. Um volume de 0.8 ml do fluante foi transferido para os frascos de cintilação.
5. Uma mistura de cintilação foi adicionada a cada frasco.
6. A quantidade de radioactividade em cada frasco foi determinada usando um contador de cintilação, ajustado ao ambiente.

## D. Resultados

Foi avaliada a reprodutibilidade e a robustez dos protocolos de radiomarcagem para o Y2B8 através da

realização de várias etapas de validação usando diferentes lotes de cada radioisótopo. Foram preparados seis lotes de validação de Y2B8 por cinco operadores. Esses lotes foram designados como segue e realizadas as seguintes funções:

#1: IDEC Pharmaceuticals

#2: IDEC Pharmaceuticals

#3: IDEC Pharmaceuticals

#4: MD Anderson Health Center

#5: Mayo Clinic

#6: City of Hope

Os resultados do teste em cada validação estão sumarizados na Tabela 1.

**Tabela 1. Resultados do ensaio para validação de Y2B8**

N° do lote	% de radioincorporação	% de ligação
1	99.5	78.6
2	99.3	87.0
3	99.4	85.9
4	99.2	81.9
5	99.2	79.6
6	96.3	80.8
Média=98.8	Média=82.3	
Desvio Padrão=1.24	Desvio padrão=3.4	
%CV=1.25%	CV=4.2%	

Para os seis lotes de validação preparados, foi obtida uma gama de percentagem de ligação de 78.6% a 87% com uma média de 82.3%. Os valores de radioincorporação para o Y2B8 foram em média 98.8% (variação de 96.3% a 99.5%). Conjuntamente estes valores conformam a reprodutibilidade e a robustez dos métodos de preparação de kits de radiomarcção para o Y2B8 e, indicam que o Y2B8 preparado usando este kit de radiomarcção é adequado para utilização em meio hospitalar.

### **Exemplo 2. Avaliação inicial dos parâmetros de reacção - pH e tempo de reacção**

Foram iniciados inicialmente estudos cinéticos para avaliar a radioincorporação e a ligação do anticorpo (Y2B8) marcado com <sup>90</sup>Y seguindo reacções de marcação realizadas sob várias condições de pH e tempo de reacção. Para reacções de radiomarcção na gama de pH 3.9 a 4.7 a um tempo de incubação de 5 min, a radioincorporação foi de > 96% com > 80% de retenção de ligação a células positivas CD20 (Tabela 2). Resultados similares foram obtidos para tempos de incubação de 3, 5 e 10 min para uma gama de pH de 2.9 a 4.6 (Tabela 3).

**Tabela 2. Cinética de radiomarcagem de Y2B8: Efeitos do pH na radioincorporação e ligação de células positivas CD-20<sup>1</sup>**

pH de reacção	Radioincorporação (%)	Ligação (%)
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

**Tabela 3. Cinética de radiomarcagem de Y2B8: Efeitos do tempo de incubação na radioincorporação e ligação de células positivas CD-20<sup>1</sup>**

Tempo de incubação (min)	Radioincorporação (%)	Ligação (%)	
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

---

<sup>1</sup>Os resultados da reacção de marcação e os estudos de avaliação de parâmetros reportados nas Tabelas 2 e 3 foram realizados com 2B8 derivado de um sistema de expressão de células CHO; o conjugado MX-DTPA foi preparado usando um protocolo similar àquele usado para a caracterização anterior do 2B8-49. As reacções foram realizadas usando aproximadamente 3 mg de anticorpo e uma razão molar de 4:1 do quelato para o anticorpo tal como descrito no pedido de patente dos requerentes com o n° de série 09/259,337 apresentada em simultâneo.

---

As imunoreactividades para as preparações de Y2B8 foram determinadas usando o método de Lindmo et al. Foram incubadas quantidades crescentes de células SB positivas CD-20 recentemente colhidas com uma quantidade fixa de Y2B8n sob condições de excesso de antigénio. Análise recíproca dos dados da ligação mostraram uma imunoreactividade de 72.2% para Y2B8 seguida de uma preparação de ensaio (Figura 1).

### **Exemplo 3. Avaliação de parâmetros de reacção posteriores**

#### **I. Introdução**

As experiências descritas nesta secção examinam o impacto dos desvios do protocolo na ligação de Y2B8 preparada usando o kit de radiomarcção de Y2B8. A ligação do anticorpo radiomarcado pode ser afectada por numerosos parâmetros durante o processo de radiomarcção (Tabela 4).

**Tabela 4**

<b>Desvio do kit de radiomarcção</b>	<b>Efeitos previsíveis nas condições de marcação</b>	<b>Efeito previsível na ligação</b>
1) Adição de excesso de volume de $^{90}\text{Y}$	diminuição do pH; aumento da radiólise	diminuição
2) Adição de menos volume de $^{90}\text{Y}$	sem alterações do pH; diminuição da radiólise	aumento ou nenhuma
3) Adição de excesso de volume de NaAc	sem alterações do pH; diminuição da radiólise	aumento ou nenhuma
4) Adição de menos volume de NaAc	diminuição do pH; aumento da radiólise	diminuição
5) Adição de excesso de volume de 2B8-MX-DTPA	sem alterações do pH; diminuição da radiólise (mais baixa actividade específica)	aumento
6) Adição de menos volume de 2B8-MX-DTPA	sem alterações do pH; aumento da radiólise (mais alta actividade específica)	diminuição
7) Incubação > 5 min.	aumento da radiólise	Diminuição
8) Incubação < 5 min.	diminuição da radiólise	aumento ou nenhuma

Foram identificados desvios no protocolo de radiomarcção que terão, provavelmente, maior impacto na ligação, e incluem: 1) adição de menor volume de acetato de sódio. 2) adição de excesso de solução de cloreto de  $^{90}\text{Y}$ . 3) adição de menor volume de 2B8-MX-DTPA e 4) tempo máximo de incubação excedido. O impacto destes desvios foi analisado separadamente e simultaneamente.

Quando analisados separadamente, 20% do volume de desvios nos itens 1-3 resultou no IDEC-Y2B8 passar na especificação de libertação estabelecida para a ligação no ensaio clínico, mesmo quando incubado por 8 minutos. Num estudo em que os três volumes de desvio (1-3 acima) foram feitos simultaneamente, apenas as doses preparados usando o protocolo de marcação da 2ª feira (potencialmente o mais radiolítico) e incubadas por 8 minutos (60% a mais do que o normal) estavam marginalmente abaixo (<3%) da especificação clínica. Pelo contrário, doses preparadas usando um protocolo de marcação de 6ª feira mantinham aceitáveis os resultados da ligação, a pesar dos efeitos cumulativos dos desvios nos 4 parâmetros (1-4 acima). Para todos os desvios, separada e colectivamente, a radioincorporação estava abaixo da especificação clínica de 95%.

## II. Escolha de parâmetros

Decidiu-se que 20% de desvio do requerido volume de reagente, ou permitir que o tempo de reacção excede-se em 30% o máximo de 6 minutos usado normalmente, representava potenciais desvios extremos do protocolo usado em radiofarmácia. Neste estudo avaliou-se o impacto destes desvios na ligação do IDEC-Y2B8. Simulou-se marcações de "2ª feira" e de "6ª feira" para assegurar que as condições avaliadas representavam extremas da

preparação de doses para toda a semana. Avaliou-se, também, o efeito combinado na ligação quando todos os desvios ocorrem numa única preparação de dose, e o impacto destes desvios na radioincorporação do  $^{90}\text{Y}$ .

Marcações de "2ª feira" e de "6ª feira" são um reflexo do conceito, que, uma vez que a solução de cloreto de  $^{90}\text{Y}$  tem uma meia-vida curta (64 h), o volume do radioisótopo usado depende do dia de semana em que a dose é preparada. Por esta razão, o volume de reacção para uma dose preparada à 2ª feira é menor, resultando em mais elevada concentração de  $^{90}\text{Y}$ , e resultando possivelmente em maior radiólise. Por isso, simulou-se procedimentos de marcação de "2ª feira" e de "6ª feira" para assegurar que as condições avaliadas representavam os extremos da preparação de doses para toda a semana.

### III. Materiais e métodos

#### A. Reagentes

1.  $^{90}\text{YCl}_3$  em 0.05 M HCL; Pacific Northwest National Laboratory, grau de reagente; P.O.#08016, 08118
2. Ultrex HLC; J.T. Baker, Produto #6900, Lote # J22539
3. Água estéril para irrigação; Baxter, Parte #2F7114, Lote # G924092
4. Tampão de diluição; contem 10mM de fosfato salino, pH 7.4, 1% BSA; Sigma, Parte #P-3688, Lote #076H8913
5. Kit de radiomarcção fornecido pela IDEC; IDEC Parte #130018, Lote #0129, contendo o seguinte:
  - a) 2B8-MX-DTPA; IDEC Parte #129017, Lote #0165

- b) 50mM de acetato de sódio; IDEC Parte #121017, Lote #0209<sup>a</sup>
  - c) Formulação tampão; IDEC Parte #120015, Lote #0202
  - d) Frasco de reacção; IDEC Parte #122015, Lote #0218
6. Células SB liofilizadas, IDEC Parte #127, Lote #127-001F

## B. Materiais e equipamento

1. Pipetas (20, 200 e 1000gL)
2. Vórtice
3. Bicos de pipeta não metálicos (Biorad; não metálicos)
4. Contador gama (Isodata, Modelo #20-10)
5. Tubos de vidro (12 x 75 mm)
6. Tubos de polipropileno (Costar, 15 ml, cónicos, estéreis)
7. Kit de radiocromatografia Tee-Control (Biodex; Cat #151-770)
8. Microcentrifugadora (Savant)
9. Tubos microcentrífgos de polipropileno, não metálicos (Biorad; Cat #223-9480)

## C. Métodos

### 1. Preparação de Y2B8

Em geral, o 2B8-MX-DTPA marcado com <sup>90</sup>Y foi preparado usando uma versão em menor escala do protocolo do kit de radiomarcção descrito acima tal como modificado após as alterações abaixo descritas. A radiomarcção é realizada

usando cloreto de  $^{90}\text{Y}$  em armazém em concentrações de 84 mCi/ml ou 29.8 mCi/ml para simular, respectivamente, preparações de doses de 2ª feira e de 6ª feira (baseadas numa calibração de 4ª feira de 50 mCi/ml). A solução de cloreto de  $^{90}\text{Y}$  concentrado foi diluída usando 50 mM HCl (Ultrex, de elevada pureza) em tubos microcentrífugos de plástico "sem metal". O HCl Ultrex (de elevada pureza) foi diluído em 50mM com água estéril para irrigação (SWFI). As reacções de radiomarcção foram realizadas em tubos microcentrífugos de plástico "sem metal, tubos cónicos de 15 ml, ou frasco de reacção de vidro septo de 10 ml fornecidos no kit de radiomarcção de Y2B8.

a. Marcação em pequena escala para prever a preparação de doses em larga escala

Foram realizadas reacções de radiomarcção de 1, 3, 10 e 40 mCi usando condições de reacção simulando uma preparação de doses de 2ª feira. Os volumes de reagente em ml para cada reacção encontram-se sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5. Volume de reagentes em ml

Quantidade de $^{90}\text{Y}$ (mCi)	Cloreto de $^{90}\text{Y}$	Acetato de sódio	2B8-MX-DTPA
1	0.0119	0.0143	0.0333
3	0.0357	0.0429	0.0998
10	0.119	0.143	0.333
40	0.476	0.571	1.33

Após 5 minutos de incubação, foram removidas amostras de 20µL e diluídas com formulação tampão para uma concentração final de anticorpo de 0.21 mg/ml e armazenadas a 2-8°C até ser ensaiadas. Os valores de ligação foram normalizados à reacção de 1mCi porque as reacções de 1mCi foram usadas como controlos em todas as experimentações subsequentes descrita nesta descrição. Os valores reportados foram normalizados a uma amostra de controlo de 1mCi através da divisão do valor de ligação por cada reacção pelo valor de ligação para o controlo, expressos em percentagem.

b. Impacto da adição de acetato de sódio

Para uma marcação de 2ª feira, foi misturado 10mCi de cloreto de <sup>90</sup>Y (0.119 ml) com 0.114 ml de acetato de sódio de 50mM. Este volume de 50mM de acetato de sódio representa uns 20% a menos na quantidade de tampão normalmente utilizado para preparar doses clínicas de IDEC-Y2B8. Foi adicionado (0.333 ml) o anticorpo conjugado (2B8-MX-DTPA, a amostra foi misturada e depois incubada à temperatura ambiente.

A actividade específica da solução de radiomarcção era de 18.9 mCi/mg de anticorpo. Aos 2 minutos, foi removido 0.020 ml, formulado a 0.24 mg/ml com formulação tampão, e armazenado a 2-8°C. O remanescente da solução de radiomarcção foi formulada, após 8 minutos, a 0.24 mg/ml e armazenada a 2-8°C. O protocolo foi repetido para simular uma marcação de 6ª feira, usando 0.336 ml de cloreto de <sup>90</sup>Y, 0.323 ml de acetato de sódio, e 0.333 ml de 2B8-MX-DTPA. Para ambos os estudos, a reacção de controlo de 1mCi foi realizada usando as condições "padrão" acima descritas (5 minutos de reacção).

c. Impacto da adição de excesso de cloreto de  $^{90}\text{Y}$

Para uma marcação de 2ª feira foram misturados 12mCi de cloreto de  $^{90}\text{Y}$  (0.143 ml) com 0.143 ml de acetato de sódio 50mM. Este volume de  $^{90}\text{Y}$  representa uns 20% de aumento da quantidade de  $^{90}\text{Y}$  requerida para preparação de uma dose típica de Y2B8. Foi adicionado o anticorpo conjugado e a solução amostra foi misturada e incubada à temperatura ambiente. A actividade específica final foi de 22.5mCi/mg de anticorpo. A 2 minutos, foram removidos 0.020 ml, formulado a 0.24 mg/ml com formulação tampão, e armazenado a 2-8°C. Após 8 minutos, o remanescente da solução de radiomarcção foi formulada a 0.24 mg/ml e armazenada a 2-8°C. Foi realizada uma marcação de 6ª feira de um modo similar usando 0.403 ml de cloreto de  $^{90}\text{Y}$ , 0.403 ml de acetato de sódio 50mM e 0.333 ml de 2B8-MX-DTPA (actividade específica de 22.5 mCi/mg de anticorpo). Para ambos os estudos, foi realizado reacção de controlo a 1 mCi usando as condições "padrão" acima descritas (5 minutos de reacção).

d. Impacto da adição de menor volume de anticorpo conjugado

Para uma marcação de 2ª feira foram misturados 10mCi de cloreto de  $^{90}\text{Y}$  (0.119 ml) com 0.143 ml de acetato de sódio 50mM. Foi adicionado anticorpo conjugado (0.267 ml) o que representa uns 20% menos de anticorpo normalmente usado, a solução foi misturada e incubada à temperatura ambiente. A 2 e a 8 minutos, foram removidos 0.020 ml, formulado com formulação tampão para uma concentração final de anticorpo de 0.21 mg/ml, e armazenado a 2-8°C até ao ensaio. Foi realizada uma marcação de 6ª feira de um modo similar usando 0.336 ml de cloreto de  $^{90}\text{Y}$ , 0.403 ml de acetato de sódio 50mM e 0.27 ml de conjugado. Para ambos os estudos, foi realizado reacção de

controle a 1 mCi usando as condições "padrão" acima descritas (5 minutos de reacção).

e. Impacto dos desvios combinados de reagentes

O impacto de desvio de 20% no volume de acetato de sódio, cloreto  $^{90}\text{Y}$  e conjugado foi avaliado para um protocolo de marcação de 2<sup>a</sup> feira ou de 6<sup>a</sup> feira. Para uma marcação de 2<sup>a</sup> feira, foi misturado 12mCi de  $^{90}\text{Y}$  (0.143 ml) com 0.114 ml de acetato de sódio 50mM, representando uns 20% de aumento na quantidade de cloreto de  $^{90}\text{Y}$  e uns 20% de decréscimo na quantidade de acetato de sódio normalmente usada. Foi adicionado 2B8-MX-DTPA (0.267 ml), representando menos 20% de anticorpo normalmente usado, e a mistura de reacção foi incubada à temperatura ambiente. A 2, 4, 6 e 8 minutos, foram removidos 0.020 ml da mistura de reacção, formulados com a formulação tampão para uma concentração final de anticorpo de 0.21 mg/ml., e armazenada a 2-8°C até ao ensaio. Uma marcação de 6<sup>a</sup> feira foi realizada de modo similar usando 0.403 ml de cloreto de  $^{90}\text{Y}$ , 0.387 ml de acetato de sódio e 0.267 ml de conjugado; amostras de 40 µl foram removidas nos tempos indicados e formuladas com a formulação tampão. Para ambos os estudos, foi realizado reacção de controle a 1 mCi usando as condições "padrão" acima descritas (5 minutos de reacção).

2. Determinação da radioincorporação

A quantidade de radioactividade associada com os conjugados foi determinada de acordo com o ensaio acima descrito, usando o kit manufacturado pela Biodex e disponível comercialmente (kit Tec-Control de radiocromatografia). Em geral, foram aplicadas amostras de 0.5 - 1 µl a tiras duplicadas usando uma micro pipeta e desenvolvidas de acordo com as instruções

da Biodex. Metade das tiras foram contadas para a radioatividade em tubos de vidro usando um contador gama da Isodata com janela de 100-1000 KeV. A incorporação de radiomarcção foi calculada através da divisão entre a quantidade de radioatividade na metade superior da tira e a radioatividade total encontrada tanto na metade de cima como na metade de baixo. Este valor foi expresso em percentagem e determinado o valor médio.

### 3. Determinação da ligação

As amostras foram analisadas para a percentagem de ligação de células positivas CD20 seguindo o protocolo acima descrito. Contudo, o controlo negativo das amostras de células HSB não foi incluído nestas experiências, e as células SB foram liofilizadas em frascos de 5 ml em vês de em tubos microcentrífugos.

Essencialmente, todas as amostras finais de Y2B8 formulado foram diluídas numa proporção de 1:100 com diluição tampão (10.0 µl de anticorpo + 990 µl de tampão). O anticorpo foi subsequentemente diluído novamente até atingir uma concentração aproximada de 8 ng/ml com a adição de 35 µl de diluição 1:100 a 10 ml de diluição tampão num tubo de polipropileno de 50 ml.

Seis ou sete frascos de células liofilizadas foram reconstituídos com SWFI e colocados num tubo cónico de 50 ml. As células reconstituídas (0.5 ml) foram então divididas em três tubos microcentrífugos de 1.5 ml, foram testados três tubos por amostra. Foi adicionada solução tampão (0,5 ml) a três tubos microcentrífugos vazios. Foi adicionado a cada

tubo anticorpo diluído (0.5 ml), tapados cuidadosamente e incubados à temperatura ambiente por 45 minutos com mistura final. Após a incubação, as células foram peletizadas por centrifugação durante 5 minutos num ajustamento de "6" (4000 X g) utilizando uma microcentrifugadora da Savant. Os sobrenadantes das amostras (0.75 ml) foram transferidos para tubos de vidro de 12 x 75 mm para contagem de radioactividade usando um contador gama da Isodata com parâmetros de janela de energia de 100-1000 KeV.

A radioactividade dada às células foi calculada subtraindo a radioactividade não ligada (sobrenadante) do total de radioactividade adicionada. A radioactividade total foi determinada da radioactividade contada nos tubos sem células. A percentagem de ligação foi calculada através da expressão da radioactividade dada como uma percentagem do total.

Para minimizar o efeito variabilidade lote a lote das células liofilizadas usadas para avaliar a ligação, os valores de ligação foram normalizados a controlos de 1mCi de Y2B8 preparados usando as condições de marcação "padrão". As amostras de controlo foram preparadas, como descrito acima, para cada conjunto de experimentações.

#### D. Resultados

##### 1. Marcação em pequena escala para prever preparações de doses em larga escala

Para assegurar que as reacções de radiomarkação em pequena escala eram predecessoras das preparações de doses em larga escala (40 mCi, foram preparadas doses de 1, 3, 10 e 40 mCi de

Y2B8 usando os protocolos de radiomarcção acima descritos. Esses resultados são mostrados na Tabela 6 e demonstram que o aumento da escala da mistura de reacção de 1 mCi para 40 mCi não afecta adversamente a ligação ou a radioincorporação.

**Tabela 6**

Quantidade de $^{90}\text{Y}$ mCi	% de controlo de ligação	% de radioincorporação
1	100	99.2
3	102	99.1
10	98.6	99.0
40	98.2	99.0

## 2. Impacto da adição de menor volume de acetato de sódio

Quando o Y2B8 foi preparado usando 20% menos de volume de acetato de sódio 50mM, e estendendo o tempo de incubação por mais 60%, uma ligação substancial ficou retida, comparando com o anticorpo radiomarcado preparado seguindo as condições de marcação "padrão" (Tabela 7 abaixo). Mesmo quando a reacção de marcação era realizada usando as condições de marcação de 2<sup>a</sup> feira > 89% do controlo de ligação era retido. Resultados similares foram obtidos para uma preparação de dose de 6<sup>a</sup> feira. Estes desvios não têm impacto na radioincorporação, sem ter em conta o dia em que a dose foi preparada.

### 3. Impacto da adição de excesso de volume de cloreto de <sup>90</sup>ítrio

Quando o Y2B8 foi preparado usando um excesso de 20% de volume de cloreto de <sup>90</sup>Y, em combinação com um tempo de incubação 60% mais longo do que o utilizado normalmente, foi retida uma parte substancial da ligação, quando comparada com o controlo preparado segundo as condições de marcação "padrão" (Tabela 7 abaixo). Quando a reacção de marcação foi aumentada para 8 minutos a ligação continuou a ficar > 90% relativamente ao controlo, tanto para preparação de doses de 2<sup>a</sup> feira como de 6<sup>a</sup> feira. Adicionando 20% mais volume de cloreto de <sup>90</sup>Y não se registou impacto na radioincorporação, sem ter em conta o dia em que a dose foi preparada.

### 4. Impacto da adição de menor volume de anticorpo conjugado

Quando o Y2B8 foi preparado utilizando menos 20% de volume do conjugado (2B8-MX-DTPA) e estendendo-se o tempo de incubação por 60%, A LIGAÇÃO não foi substancialmente afectada, comparada com Y2B8 preparado de acordo com as condições de marcação "padrão" (Tabela 7 abaixo). Adicionando 20% menos de conjugado não tem impacto na radioincorporação, sem ter em conta o dia em que a dose foi preparada.

**Tabela 7**

Desvio de ligação	Preparação de dose da 2 <sup>a</sup> feira <sup>a</sup>		Preparação de dose de 6 <sup>a</sup> feira <sup>b</sup>	
	% de controlo de ligação	% de radioincorporação	% de controlo de ligação	% de radioincorporação
1) 20% menos volume de acetato de sódio				
2) 60% de aumento no tempo de reacção (8 min.)	84.4	99.1	92.5	98.7
1) 20% excesso de volume de <sup>90</sup> Y				
2) 60% de aumento no tempo de reacção (8 min.)	90.6	99.1	91.8	98.6
1) 20% menos volume de anticorpo				
2) 60% de aumento no tempo de reacção (8 min.)	98.9	99.0	98.7	98.6

<sup>a</sup> para preparação de doses de 2<sup>a</sup> feira, a concentração de <sup>90</sup>Y na solução de reacção é 17mCi/ml; a concentração para a marcação de 6<sup>a</sup> feira é 8 mCi/ml. Os valores de ligação normalizados para marcar anticorpos de acordo com o protocolo de dose clínica (RSBR-005) usando volumes de reagente "padrão" e 5 minutos de tempo de reacção.

## 5. Impacto dos desvios de reagentes combinados

Quando o Y2B8 foi preparado usando um protocolo no qual os quatro desvios foram feitos simultaneamente, a ligação ficava substancialmente mantida, comparado com o anticorpo radiomarcado preparado usando as condições de marcação "padrão" (Tabela 8 abaixo). A ligação permaneceu > 83% mesmo quando a preparação de 2ª feira foi incubada por 30% mais tempo do que o máximo de 6 minutos usado normalmente. A radioincorporação não foi afectada significativamente por estes desvios cumulativos, mesmo após 8 minutos de tempo de incubação, sem ter em conta o dia em que a dose foi preparada.

**Tabela 8**

Preparação de dose de 2 <sup>a</sup> feira		
Tempo de marcação (min.)	% de controlo de ligação	% de radioincorporação
2	97.6	98.7
4	93.7	98.8
6	89.5	98.8
8	83.2	98.6
Preparação de dose de 6 <sup>a</sup> feira		
Tempo de marcação (min.)	% de controlo de ligação	% de radioincorporação
2	98.6	99.0
4	98.5	99.2
6	96.0	99.1
8	92.1	99.1

**V. Discussão**

Para reduzir a exposição à radiação dos intervenientes, foram avaliadas reacções de marcação menores em vez de produção em grande escala de doses. Além disso, verificou-se que marcações de 1 mCi e 10 mCi, avaliadas neste estudo, eram predecessoras de preparações em larga escala de 40 mCi. Os resultados demonstraram não haver diferenças significativas na ligação e na radioincorporação numa gama de 1 mCi a 40 mCi.

Decidiu-se que 20% em volume de erros para o acetato de sódio, cloreto de  $^{90}\text{Y}$  e anticorpo conjugado representavam potencialmente o desvio extremo do protocolo de radiomarcção. Adicionalmente, incubação por 8 minutos (3 minutos a mais do que o normal) foi visto como um desvio ao protocolo significativo. Em geral, devido à curta meia-vida do cloreto de  $^{90}\text{Y}$ , o volume de radioisótopo diferirá consoante o dia da preparação da dose. Por isso, as experiências descritas nesta descrição foram realizadas usando cloreto de  $^{90}\text{Y}$  em concentrações representativas tanto de 2<sup>a</sup> feira como de 6<sup>a</sup> feira para representar a gama completa de possibilidades de preparação de doses.

As doses de Y2B8 preparadas usando 20% menos volume de acetato de sódio, e incubadas por 8 minutos, retiveram significativa ligação (> 89%) relativamente às condições de marcação padrão. Resultados similares foram obtidos para doses preparadas 2<sup>a</sup> ou 6<sup>a</sup> feira. Este desvio no volume do acetato de sódio não afectou a radioincorporação.

Adicionando 20% mais de volume de cloreto de  $^{90}\text{Y}$ , e incubando até 8 minutos, reduziu-se a ligação, relativamente às condições padrão de preparação de doses, tanto para 2<sup>a</sup> feira como para 6<sup>a</sup> feira. Contudo, a ligação permaneceu em > 90%, o que é abaixo das especificações normalizadas. A ligação era marginalmente melhor para uma preparação de dose de 6<sup>a</sup> feira. A radioincorporação não era significativamente afectada pelo aumento do volume de cloreto de  $^{90}\text{Y}$ .

Para avaliar o impacto de efectuar simultaneamente todos os desvios de volume, as doses de 2<sup>a</sup> feira e de 6<sup>a</sup> feira foram

preparadas comparando 2, 4, 6 e 8 minutos de tempo de incubação. Apenas quando o Y2B8 foi preparado numa 2ª feira, usando 8 minutos de tempo de incubação, a ligação marginal falhou em preencher os critérios da especificação normalizada (83.2% comparado com os 86.3% da especificação normalizada).

## REIVINDICAÇÕES

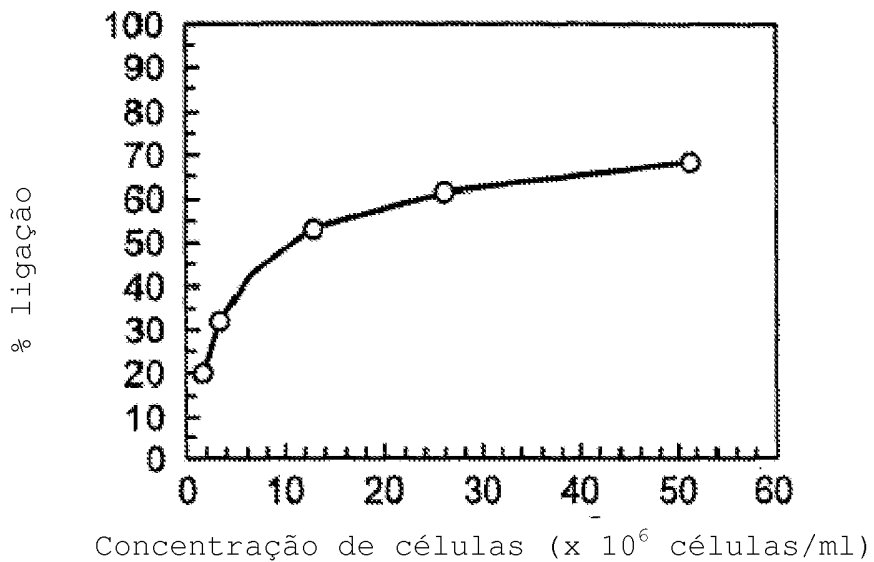
1. Método para radiomarcado um conjugado de quelato e proteína ou péptido com  $^{90}\text{Y}$  para administração a um paciente compreendendo
  - (i) Misturar o conjugado de quelato e proteína ou péptido com uma solução compreendendo  $^{90}\text{Y}$  ou um sal, e
  - (ii) Incubar a mistura por tempo suficiente sob temperatura aceitável, condições de pH, e tampão de modo a que uma proteína ou um péptido marcado com  $^{90}\text{Y}$  seja produzido tendo uma radioincorporação maior que 95%, actividade específica suficiente, e especificidade de ligação de pelo menos 50%, de maneira a que a proteína ou péptido radiomarcado possa ser administrado directamente ao paciente sem posterior purificação, e em que o tempo suficiente de incubação seja inferior a oito minutos.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a dita proteína é um anticorpo ou fragmento de anticorpo.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o fragmento de anticorpo é seleccionado do grupo consistindo em fragmentos de Fab,  $\text{F(ab}')_2$  e Fv.
4. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que o dito tempo suficiente de incubação está entre 2 e cinco minutos.
5. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que o dito quelato é um quelato bifuncional seleccionado de um grupo consistindo em MX-DTPA, fenil-DTPA, benzil-DTPA, CHX-DTPA, DOPA e seus derivados.
6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que o dito quelato é MX-DTPA.
7. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que a dita temperatura aceitável varia entre 25°C e 43°C.

8. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que o dito pH aceitável varia de 3.0 a 6.0.
9. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que o dito tampão aceitável é um tampão de acetato.
10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o dito tampão é acetato de sódio numa concentração entre 10 e 1000mM.
11. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que dito tampão aceitável inclui um radioprotectante benigno.
12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o dito radioprotectante benigno é ascorbato.
13. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que a dita especificidade de ligação é pelo menos 70%.
14. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a dita proteína é um anticorpo o qual foi marcado para uma actividade específica de pelo menos 5mCi/mg.
15. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a mistura de (ii) é incubada a um pH de 3 a 6.
16. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a razão entre o quelato e a proteína ou péptido varia de 1<sup>1/2</sup> a 1.
17. Método de acordo com a reivindicação 6, em que o dito tempo suficiente de incubação é entre dois e cinco minutos.
18. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a dita proteína é o anticorpo 2B8, um anticorpo que é produzido por células hibridomas depositadas como depósito ATTC nº HB 11388.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o quelato é MX-DTPA.
20. Método de acordo com a reivindicação 19, em que é alcançado um nível de radioincorporação maior do que 96%.
21. Método de acordo com a reivindicação 19, em que o tempo suficiente de incubação varia de dois a oito minutos.

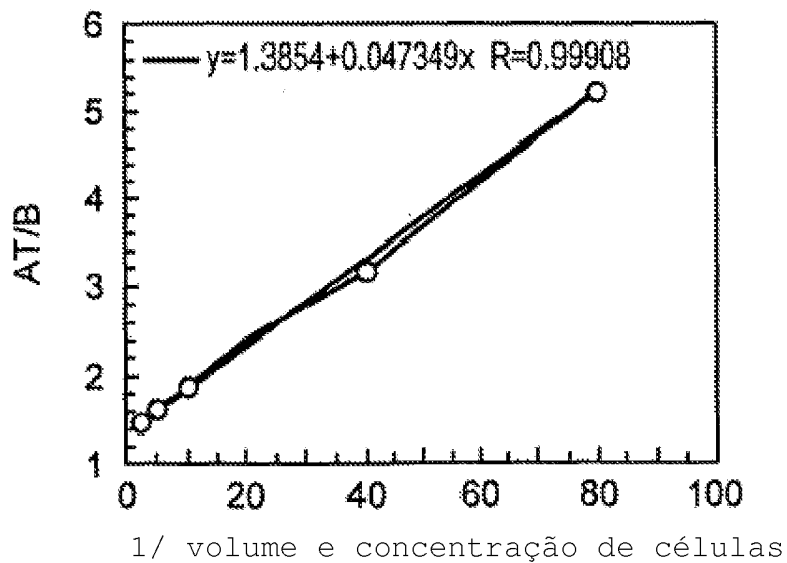
# FIG. 1A

Ligação de Y2B8 a células positivas CD20



# FIG. 1B

Ligação de Y2B8 a células positivas CD20





European Patent Office  
80298 MUNICH  
GERMANY  
Tel. +49 (0)89 2399 - 0  
Fax +49 (0)89 2399 - 4465



Adams, Harvey Vaughan John  
Mathys & Squire LLP  
120 Holborn  
London  
EC1N 2SQ  
GRANDE BRETAGNE

**For any questions about  
this communication:**  
Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date
19.03.09

Reference P28219EP-PCT	Application No./Patent No. 00919345.9 - 2123 / 1156835
Applicant/Proprietor Biogen Idec Inc.	

#### Decision to grant a European patent pursuant to Article 97(1) EPC

Following examination of European patent application No. 00919345.9 a European patent with the title and the supporting documents indicated in the communication pursuant to Rule 71(3) EPC dated 04.09.08 is hereby granted in respect of the designated Contracting States.

Patent No. : 1156835  
Date of filing : 29.02.00  
Priority claimed : 01.03.99/USA 259338

Designated Contracting States  
and Proprietor(s) : AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE  
Biogen Idec Inc.  
14 Cambridge Center  
Cambridge, MA 02142/US

This decision will take effect on the date on which the European Patent Bulletin mentions the grant (Art. 97(3) EPC).

The mention of the grant will be published in European Patent Bulletin 09/16 of 15.04.09.

Examining Division

Baumgärtner H

Brück M

Beeck M

