

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2002 -3164**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.02.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.02.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/000855**

(33) Země priority: **NO**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.04.2003**

(Věstník č. 4/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/NO01/00065**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/060417**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**A 61 K 51/00**

**A 61 P 35/00**

(71) Přihlašovatel:

**ANTICANCER THERAPEUTIC INVENTIONS AS,**  
Oslo, NO;

(72) Původce:

Larsen Roy H., Bekkestua, NO;  
Henriksen Gjermund, Mjondalen, NO;

(74) Zástupce:

**Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Konjugátorový systém**

(57) Anotace:

Konjugátorový systém obsahující liposomy s ionofory a s roztokem chelátoru a radionuklidem nebo nuklidy emitujícími částice alfa uvnitř liposomu. Dále se popisuje způsob přípravy tohoto typu radioaktivních liposomů stejně jako použití tohoto systému a kit pro jeho přípravu.

**CZ 2002 - 3164 A3**

## Konjugátorový systém

### Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká konjugátorového systému obsahujícího liposomy s ionofory a s chelátorem umístěným uvnitř liposomů, kde liposomy jsou stabilně značené těžkými radionuklidy emitujícími  $\alpha$ -částice. Předkládaný vynález se dále týká způsobu přípravy konjugátorového systému a použití tohoto systému a kitu pro přípravu konjugátorového systému.

### Dosavadní stav techniky

Biomedicínské aplikace radionuklidů při protirakovinné léčbě se dosud soustředily na použití kationtových nebo aniontových sloučenin, například [ $^{131}\text{I}$ ]jodidu proti rakovině štítné žlázy a  $^{89}\text{Sr}$  pro paliativní léčbu bolesti způsobené metastázami rakoviny kostí a použití radionuklidů emitujících většinou beta záření navázaných na monoklonální protilátky (DeVita a další, 1996).

Použití cílené radionuklidové terapie proti rakovině je založené na schopnosti nalézt způsoby pro navázání radionuklidů na nosné sloučeniny specifické pro tumory (Gaze, 1996). V současnosti nemohou být některé radionuklidy s použitelnými radiačními vlastnostmi využity při cíleném působení na tumory, protože jsou problémy s vytvořením chemicky stabilní vazby mezi radionuklidem a nosnou sloučeninou. Nové nosné systémy však mohou rozšířit jak využití radioisotopů, tak i škálu radionuklidů použitelných pro léčení (Gaze, 1996).

Liposomy s nebo bez skupin s afinitou pro receptory navázaných na povrch byly již pro účely dodávání léčiv testovány, a v současnosti se klinicky používají pro dodávání chemoterapeutik u některých forem

rakoviny. V poslední době vedl vývoj ve výzkumu liposomů k novým verzím s farmakokinetickými vlastnostmi, které by mohly vést k využití těchto sloučenin jako nosičů pro radionuklidy pro vnitřní radioterapii proti rakovině (Gabizon, 1995). Tento poslední vývoj ve formulaci a výrobě liposomů vedl k vytvoření malých váčků o rozměrech méně než 100 nm s prodlouženou dobou cirkulace, protože velikost liposomů je možno lépe posunovat směrem k malým průměrům použitím technologie extruze přes membrány. Navíc snížilo zavedení liposomů s naroubovaným polyethylenglykolem (PEG) interferenci s plasmatickými proteiny, a tak došlo ke snížení rozpoznávání a vylučování makrofágy retikuloendoteliálního systému (Maruyama, a další, 1997). Tak bylo dosaženo zvýšené míry příjmu do tumorů v důsledku prodloužené koncentrace v krvi. Dalšího zvýšení příjmu do tumorů bylo dosaženo konjugací molekul s afinitou k receptorům, například monoklonálních protilátek nebo folátu, na povrch liposomů. Několik studií dále ukázalo výhodu použití PEG jako propojovací skupiny mezi liposomem a směrovacím (targeting) ligandem, které může rovněž zlepšit dostupnost receptoru (např. Maruyama a další, 1997; Gabizon a další, 1999; Lee a další, 1994).

Liposomy byly již dříve studovány jako nosiče pro radioisotopy (Goins a další, 1998; Turner a další, 1988). Pikul a další (1987) zveřejnili studii založenou na pasivně inkorporovaném  $^{212}\text{Pb}$ -dextranu (tj.  $^{212}\text{Pb}$ -dextran byl přidán během tvorby liposomů a frakce  $^{212}\text{Pb}$ -dextranu byla vložena spolu s vodnou fází, která tvoří vnitřek liposomu). Autoři nenavrhovali, že by tyto liposomy byly vhodné pro léčbu rakoviny, ale liposomy byly primárně používány pro studium intracelulárního usmrcování buněk radioisotopy. Nebyly zveřejněny žádné údaje o osudu  $^{212}\text{Bi}$  vytvořeného rozpadem  $^{212}\text{Pb}$ , a velikost těchto liposomů byla řádově 350 až 500 nm, což je značná velikost v porovnání s velikostí (přibližně 100 nm), která je v současnosti považována za optimální pro léčbu tumorů in vivo (Forssen, 1997). Uvedené liposomy také neobsahovaly v membráně PEG.

Ogihar-Umeda a další (1996) používali liposomy jako nosiče pro radionuklidy emitující gamažáření  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$  a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , a navrhovali použití radioaktivně značených liposomů pro zobrazování.

V teoretické studii navrhovali Kostarelos a další (1999) použití liposomů značených potenciálně terapeutickými radionuklidy  $^{131}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{188}\text{Re}$  a  $^{211}\text{At}$ , ale nebyly navrženy chemické postupy pro přípravu radioaktivně značených liposomů.

Dokument EP 386 146 B1 popisuje prostředek a způsob použití sloučenin zapouzdřených do liposomů pro léčení tumorů záchytem neutronů. Tyto liposomy však obsahovaly stabilní prvky (např. bor), které se staly radioaktivními pouze po aktivaci, a tyto liposomy neobsahovaly ani ionofory, ani chelatační látky.

Utkhede a další (1994) popisují liposomy s vloženým  $^{90}\text{Y}$  a DTPA jako chelátorem, což je odlišný chelátor ve srovnání s chelátory popisovanými v předkládaném vynálezu. Navíc se nepopisuje retence mateřských/dceřinných nuklidů a navíc není  $^{90}\text{Y}$  těžký prvek jako prvky popisované v předkládané přihlášce.

Dosažení dostatečně stabilního radioaktivního značení nosičů těžkými radionuklidy emitujícími záření alfa obvykle vyžaduje specifické chemické postupy vytvořené tak, aby vyhovovaly chemickým vlastnostem každého prvku, a tyto metody nejsou známé. Nelze očekávat, že postupy používané pro radioaktivní značení např. Ga, In, Te, Cu nebo Re mohou být kompatibilní s těžkými radionuklidy (atomová hmotnost vyšší než 150) v kationtové formě emitujícími záření alfa, jako je například  $^{212/213}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{223/224}\text{Ra}$ ,  $^{227}\text{Th}$  nebo  $^{225}\text{Ac}$ .

### Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je tedy poskytnutí konjugátorového systému radionuklid-liposom, s nebo bez skupin s afinitou k receptorům, který

(1) zahrnuje v sobě chelátor a těžký radionuklid nebo nuklidy, které emitují záření alfa částic,

(2) může zadržet dceřinný nuklid nebo nuklidy, jestliže je v liposomu inkorporován mateřský nuklid nebo nuklidy, a

(3) může být připraven postupem aktivní inkorporace použitelným pro větší počet radionuklidů,

stejně jako použití tohoto systému a kit pro přípravu tohoto systému. Tyto předměty byly dosaženy předkládaným vynálezem a jsou charakterizovány přiloženými nároky.

Předkládaný vynález se týká konjugátorového systému obsahujícího liposomy s ionofory, tj. prostředky extrahující kov do liposomů, a s chelátorem a těžkým radionuklidem nebo nuklidy (atomová hmotnost vyšší než 150) umístěnými uvnitř liposomu. Liposomy se připravují použitím aktivní inkorporace radionuklidu, tj. prostřednictvím ionoforů, přičemž se použije způsobů poskytujících liposomy s velikostí typicky 100 nm. Získaný produkt má dobrou chemickou stabilitu po dobu několika dnů a může také uvnitř liposomu zachytit dceřinný nuklid nebo nuklidy, například pocházející z přeměny  $^{212}\text{Pb}$  na  $^{212}\text{Bi}$ . Liposomy mohou být připraveny s nebo bez modifikujících skupin jako polyalkylenoxidy, například PEG, navázanými na membránu. Autoři zde také popisují způsob navázání těchto radioaktivně značených liposomů na proteiny vyhledávající tumory, jako jsou například monoklonální protilátky konjugované s folátem.

Předkládaný vynález bude nyní podrobněji popsán s odkazy na následující obrázky a příklady.

Pro vyvinutí radioaktivně značených liposomů, které jsou vhodné pro léčení rakoviny, studovali autoři předkládaného vynálezu přípravu a použití liposomů s obsahem těžkých radionuklidů (tj. s atomovou hmotností vyšší než 150) emitujících částice alfa, založených na radionuklidech  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  a  $^{227}\text{Th}$ . Použitím liposomů (váčků) s ionofory byly připraveny radioaktivně značené liposomy obsahující s výhodou chelátor (tj. liposomy obsahují ve vnitřním prostoru radionuklid a chelátor) použitím aktivní inkorporace radionuklidu s využitím postupů umožňujících získání liposomů s typickou velikostí 100 nm.

Jednovrstvé (unilamelární) váčky byly připraveny hydratací tenkého lipidového filmu a extruzí (Olson a další, 1979, Mac Donald a další, 1991) následujícím způsobem. DSPC (distearoylfosfatidylcholin) a cholesterol v molárním poměru 2 : 1, typicky 10, popř. 5  $\mu\text{mol}$ , byly rozpuštěny v chloroformu v kulové baňce. Rozpouštědlo bylo odstraněno na rotační odparce za sníženého tlaku. Suchý lipidový film byl potom hydratován v 0,5 až 1 ml roztoku 150mM kyseliny citronové, 30 mM DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina), pH 4. Získaná suspenze byla vystavena pěti cyklům zmrazení a tání a následně pětkrát opakovaně extruzi přes polykarbonátové filtry s velikostí pórů 100 nm a pětkrát přes filtry s velikostí pórů 50 nm s použitím ručního zařízení pro extrudování (Avestin, Ottawa, Kanada). Koncentrace lipidů v produktu byla přibližně 30 mM. Před vnesením radionuklidu do liposomů byl změněn vnější roztok elucí na koloně PD-10 na pufr 250 mM sacharóza, 20 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonová kyselina), pH 7,4.

Složky liposomů jsou následující:

a) Vnitřní vodné médium: pH 1 až 14, s výhodou 2 až 9, výhodněji 4 až 5. Složky: voda, prostředky schopné udržet

požadované pH vnitřního vodného prostředí po požadovanou dobu, tj. do zahájení inkorporace radioaktivního kovu nebo kovů prostřednictvím ionoforu. Složky vnitřních vodného média také poskytují s výhodou komplexační funkci pro radioaktivní kov nebo kovy. Tato funkce může být zprostředkována (i) například elektrostatickými donorovými funkčními skupinami nebo prostředky použitými pro nastavení pH, například atomem nebo atomy kyslíku v acetátu, citrátu a příbuzných sloučeninách; (ii) komplexačním prostředkem přítomným ve vnitřním vodném médiu, jako je například EDTA, DTPA, DOTA, DOTMP a příbuzné sloučeniny.

b) Ionofor: prostředek schopný transportovat, v podstatě nevratně, radioaktivní kov přes lipidickou dvojvrstvu z extraliposomální fáze dovnitř liposomu. Příklady: ionofory, které prokazatelně fungují požadovaným způsobem: vápníkový ionofor A 23187, dicyklohexyl 18-C6, bibenzo-18-C6, 2,3,-dimerkapto-1-propanol, Pb-ionofor.

c) Složky lipidické dvojvrstvy: složky lipidické dvojvrstvy poskytnou s výhodou směs schopnou vytvořit váčky, přičemž jejich teplota přechodu z kapalného do pevného stavu je vyšší než fyziologická teplota; například (i) fosfolipidy. Příklady: alkyl-fosfatidylcholin s dlouhým řetězcem, například 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DLPC), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DMPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DPPC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DSPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DOPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (POPC); (ii) steroly nebo sloučeniny s podobnými vlastnostmi z hlediska ztužení (poklesu tekutosti) lipidické dvojvrstvy. Příklady: sloučeniny ze skupiny sterolů: cholesterol a cholesterol-3-sulfát, a (iii) sloučeniny se stabilizačními účinky (stericky) in vivo pro zlepšení vlastností konstruktů z hlediska směřování na rakovinné buňky a zvýšení doby zdržení v krvi, například polyethery, polyethylenglykoly. Přídavek PEG a/nebo derivátů PEG do prostředku pro tvorbu liposomů poskytne výhody z hlediska sníženého vylučování vstříknutých

liposomů z krevního oběhu retikuloendoteliálním systémem. Tyto látky jsou normálně v prostředí přítomny v množství 3 až 10 molárních %, vztaženo na fosfolipid. Množství stabilizátoru nezbytného pro získání požadovaného stabilizačního účinku však závisí na monomeru (elektrostatické vlastnosti a polarita) a na počtu opakujících se jednotek, tj. délce řetězce. Příklady PEG a/nebo derivátů PEG: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin-N-[poly(ethylenglykol)2000] (PEG2000 DJ1PE), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin-N-[poly(ethylenglykol)2000] (PEG2000 DPPE), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin-N-[poly(ethylenglykol)2000] (PEG2000 DSPE).

d) Složky umožňující modifikaci konstruktů tak, aby mohly být zacíleny na tumorové buňky. Volba vhodně aktivovaného lipidu bude záviset na povaze haptenu stejně jako na požadavcích výzkumu. Účinnost reakce bude záviset na odštěpitelné skupině, hydrofilní mezerníkové skupině, materiálových vlastnostech liposomu a koncentraci reakčních složek. Pro testování in vivo, při kterém má zůstat haptent asociován s liposomem, se dosáhne určitých výhod volbou lipidových kotev s dlouhým acylovým řetězcem, čímž dochází k pomalejší výměně mezi membránami. Kovalentní vazba mezi haptentem a lipidovou kotvou by měla být dále stabilní jak vůči chemickému, tak i enzymatickému štěpení. Aktivované lipidy mohou poskytnout například aminové, amidové, thioetherové nebo disulfidické vazby mezi lipidem a modifikující částí. Jestliže jsou v prostředí zahrnuty sterické stabilizátory, například PEG a/nebo deriváty PEG, skupina s vazebnou funkcí je s výhodou přítomna na konci sloučeniny stejné nebo podobné stabilizátoru a s efektivní délkou řetězce stejnou nebo delší než je délka stabilizátoru. Příklady: složky váčků umožňující modifikaci konstruktů tak, aby se mohly zaměřit na tumorové buňky, ze skupiny PEG a/nebo derivátů PEG: N-[w-(2-pyridyldithio-propionylamino)poly(ethylenglykol)2000]-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin (PDP-PEG2000-DSPE), N-[w-[4-(p-maleimido-

-fenyl)butanoyl]amino}poly(ethylenglykol)2000]-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin (MpB-PEG2000-DSPE).

Oddělení radionuklidu asociovaného s liposomem od neasociovaného radionuklidu bylo prováděno použitím chromatografie typu size-exclusion (Mauk a Gamble 1979, Tilcock a další, 1991). Pro postupy separace po vnesení radionuklidu do liposomů byly používány kolony pro gelovou filtraci PD-10 size exclusion columns. Z objemů 1 ml nebo méně nanášených na kolony PD-10 se liposomy eluovaly v prvních 4,5 ml. Radionuklidy, které nebyly asociovány s liposomy, se eluovaly ve frakci odpovídající sloučeninám s nízkou molekulovou hmotností. Kolony PD-10 byly také použity při studii stability (z hlediska zachycení radionuklidů) liposomů s obsahem radionuklidů v pufru PBS.

Separace radionuklidů asociovaných s liposomy od volných radionuklidů v séru byla prováděna chromatografií gelovou filtrací na koloně Sepharose CL-4B (Hwang a Mauk, 1977). Tak mohly být připraveny roztoky obsahující radioaktivní liposomy dispergované v kapalném nosiči v podstatě prosté nenavázaných radionuklidů.

Před chromatografickými postupy byla přidávána EDTA (ethylendiamin-N,N'-tetraoctová kyselina) pro stabilizaci volného radionuklidu v takovém stavu, který umožňuje snadnou separaci od frakce asociované s liposomy.

Výtěžek vnášení radionuklidů a latenční doba radionuklidů asociovaných s liposomy byly zjišťovány gama-spektroskopií pro  $^{228}\text{Ac}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{205}\text{Bi}$  a  $^{207}\text{Bi}$ .  $^{228}\text{Ac}$  a  $^{205/207}\text{Bi}$  byly použity jako stopovací prvky pro potenciálně terapeuticky použitelné radionuklidy  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Bi}$  a  $^{213}\text{Bi}$ .

Autoři předkládaného vynálezu učinili významný a neočekávaný objev, že nedochází k významnému přemístování  $^{212}\text{Bi}$  po rozpadu  $^{212}\text{Pb}$  inkorporovaného v tomto typu liposomu. Současný stav využití  $^{212}\text{Pb}$  jako molekulárně vázaného generátoru  $^{212}\text{Bi}$  ukazuje, že obvykle

dochází k podstatnému uvolňování ( $\geq 30\%$ ) z chelátoru (McClure a Feinendegen, 1998; Mirzadeh a další, 1993). Zachycením  $^{212}\text{Pb}$  ve vysoké koncentraci chelátoru, jak je tomu například uvnitř liposomů, by však bylo možno zabránit uvolňování dceřinného produktu za poskytnutí konjugátorového systému využitelného pro zachycení dceřinného nuklidu po přeměně jádra. Poprvé se zde uvádí konjugátorový systém pro  $^{212}\text{Pb}$ , který mohl zachytit téměř kvantitativně dceřinný nuklid  $^{212}\text{Bi}$ . Předkládaný vynález se tedy týká liposomů s ionofory, které obsahují radionuklid a chelátor umístěné uvnitř liposomu (konjugátorový systém), přičemž tento konjugátorový systém může nebo nemusí zachytit dceřinný nuklid.

Chelátor podle předkládaného vynálezu může být zvolen ze skupiny zahrnující:

kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctovou (DOTA),

kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotridekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctovou (TRITA),

kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotetradekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctovou (TETA),

kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(methylen)fosfonovou (DOTMP),

kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotridekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(methylen)fosfonovou,

kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotetradekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(methylen)fosfonovou,

kyselinu diethylentriamin-N,N',N''-pentaoctovou a její isomerní deriváty,

kryptát[2,2,2], kryptát[3,2,2], kryptát[2,2,1] a jejich mono- a di-benzoderiváty,

přemostěné kalix[4]areny obsahující skupiny bohaté na elektrony (donorové), jako hydroxyl, karboxyl, ester, amid, amin,

kyselinu 1,10-diaza-4,7,13,16-tetraoxacyklooktadekan-1,10-N,N'-bis-octovou, a

1,10-diaza-4,7,13,16-tetraoxacyklooktadekan-1,10-N,N'-bis-malonát.

Další důležitý a překvapivý objev spočíval v tom, že liposomy podle předkládaného vynálezu mohly účinně inkorporovat a zachycovat  $^{223}\text{Ra}$ . To je poprvé, kdy se popisuje konjugátorový systém s radiem-223 potenciálně použitelný pro směřování na tumor. Navíc autoři vynálezu ukázali, že do popisovaného typu liposomů je možno také vložit a v těchto liposomech silně zachytit vizmut a aktinium, což ukazuje, že mohou být připraveny také konjugátorové systémy na bázi  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  a  $^{225}\text{Ac}$ .

Konjugátorový systém podle předkládaného vynálezu může být připraven s nebo bez modifikujících povrchových skupin, například PEG, v liposomové membráně (liposomy roubované PEG/PEGylované). Výhoda použití PEG v membráně se zakládá na poskytnutí některých PEG-reaktivních skupin, které umožní konjugaci proteinů jako jsou například protilátky, fragmenty protilátek nebo konstrukty nebo folát, nebo jiné proteiny/molekuly s afinitou k receptorům (vázající se na receptor).

Předkládaný vynález se dále týká nového typu liposomů s proteiny vázajícími se na receptor navázanými na membránu liposomu. Popisují se zde radioaktivně značené liposomy roubované PEG konjugované s protilátkami značenými folátem. Použití folátu a derivátů folátu pro směřování na tumory exprimující proteiny vázající folát (folate binding proteins, FBP), protein buněčné membrány navázaný přes glykosylfosfatidylinositol účastníci se příjmu oxidovaných folátů do buňky prostřednictvím endocytózy, již vzbudilo pozornost výzkumných pracovníků (Kranz a další, 1996; Reddy a

další, 1998; Shinoda a další, 1998; Trippet a další, 1999). Protože bylo ukázáno, že FBP je nadměrně exprimován několika typy buněk lidské rakoviny, tento receptor může být možným cílem pro dodávání terapeutických radioisotopů konjugovaných s folátem. Použitím protilátek konjugovaných s folátem by tedy mohlo být dosaženo cílené protirakovinné terapie působením radionuklidů. Jestliže je navíc kombinační místo antigenu protilátky značené folátem zaměřeno proti antigenu asociovanému s tumorem odlišnému od FBP, dosáhne se dvojí vazebné schopnosti (tj. afinity jak pro systém protilátka-antigen, tak pro receptor FBP). Pokud je autorům vynálezu známo, poprvé se popisuje konjugace protilátek značených folátem.

Protilátky značené folátem konjugované s liposomy podle předkládaného vynálezu by mohly být dále značeny radionuklidem nebo směsí různých radionuklidů, aby se dosáhlo zvýšení účinků radiační terapie.

Předkládaný vynález ukazuje, že tato nová kombinace protilátek značených folátem konjugovaných s liposomy může být použita pro směrování radionuklidu nebo radionuklidů do buněk exprimujících folátové receptory. To je zvláště použitelné s atomy emitujícími částice alfa, které mají záření s vysokým lineárním přenosem energie (high linear energy transfer, high-LET), které jsou extrémně cytotoxické pro savčí buňky (Hall, 1994; Larsen a další, 1998; Ritter a další, 1977). Zdroj záření alfa však může dodávat záření do zvláště malé oblasti ve srovnání s jinými typy záření. Zdroj záření alfa může být tedy zaměřen na cílovou tkáň a je možno snížit expozici normální tkáně.

Konjugátorový systém podle předkládaného vynálezu by mohl být také použit pro zacílení buněk exprimujících například estrogenový receptor nebo testosteronový receptor konjugací protilátek k estrogenu nebo testosteronu.

Značené protilátky používané v rámci předkládaného vynálezu jsou s výhodou ze třídy IgG nebo IgM a/nebo jejich fragmenty a/nebo

konstrukty (například „miniprotilátky“ - minibody). Tyto protilátky a/nebo fragmenty a/nebo konstrukty by navíc mohly být myší, chimérické nebo úplně humanizované, polyklonální nebo monoklonální.

Předkládaný vynález se také týká použití konjugátorového systému podle předkládaného vynálezu pro přípravu farmaceutického roztoku vhodného pro injekci nebo infuzi savcům včetně člověka prostřednictvím intravenózního a/nebo oblastního a/nebo intratumorového podávání. Farmaceutický roztok může být používán v kombinaci s radioimunokonjugátem nebo několika radioimunokonjugáty a/nebo jinými formami radiofarmaceutické terapie, chemoterapie, terapie vnějším zářením nebo chirurgickým léčením maligních stavů.

Předkládaný vynález se také týká způsobu použití konjugátorového systému podle předkládaného vynálezu pro léčení maligních procesů, jako je například rakovina mozku, plic, děložního hrdla, vaječníků nebo rakovina mléčné žlázy, nebo leukemie, lymfom nebo maligní melanom.

Předkládaný vynález se také týká kitu pro přípravu konjugátorového systému podle předkládaného vynálezu, který obsahuje lahvičku s roztokem liposomů a druhou lahvičku obsahující radionuklid v roztoku, které mohou být smíseny pro dosažení radioaktivního značení. Navíc se může provést smísení se třetí lahvičkou obsahující proteiny a/nebo molekuly s afinitou k určitému receptoru pro získání konjugátorového systému s afinitou k receptoru.

#### Použité reagenty a zařízení

Gama spektroskopie byla prováděna s použitím germaniového detektoru (Canberra, Meriden, Conn, USA) napojeného na vícekanálový analyzátor (EG&G ORTEC, Oak Ridge, Tenn, USA). Pro kapalnou scintilační počítání byl použit přístroj Beckmann LS 6500

(Beckmann, Fullerton, CA, USA). DSPC a cholesterol byly získány od firmy Northern Lipids (Vancouver, Kanada). Pro čištění radioaktivně značených liposomů byly použity kolony Sephadex G-25 PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Švédsko). Jako intraliposomální chelátor byl použit makrocyclický chelátor DOTA získaný od firmy Macrocyclics (Richardson, TX, USA). Při studii byly použity ultračistá  $\text{HNO}_3$  (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) a 6M HCl (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) a kyselina bis(2-ethylhexyl)fosforečná (HDEHP) firmy Fluka (Sigma-Aldrich AS, Norsko).

Všechny pufrы používané pro vnášení kationtů do liposomů prostřednictvím ionoforu byly upraveny na požadované pH použitím argininu jako volné báze. Všechna použitá voda byla získána z čistícího systému Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, Mass, USA). Iontoměničové pryskyřice byly dodány firmou Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Pryskyřice byly nejprve kondicionovány promytím vodou, potom 6M HCl, acetonem a nakonec vodou. Pryskyřice byly před nanesením do kolony uchovávány ve vodě.

Použitý DMSO byl uskladněn spolu s molekulovými síty 4 Å.

$^{232}\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  použitý při práci byl skladován více než dvacet let. Vzorek byl poskytnut oddělením Nuclear Chemistry Group, Department of Chemistry University of Oslo, Oslo, Norsko.

$^3\text{H}$ -kyselina listová byla zakoupena od firmy Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK).

Všechny další chemikálie byly od firmy Sigma-Aldrich, Norsko.

Tabulka 1 ukazuje některé fyzikální vlastnosti radionuklidů používaných při experimentech s liposomy.

Tabulka 1

Nuklid	$t_{1/2}$	Záření gama	% pravděpodobnosti*
$^{228}\text{Ac}$	6,13 h	911,2 (26,6)	26,6
$^{223}\text{Ra}$	11,43 d	269,4 (13,7) 271,2 (0,108) ( $^{219}\text{Rn}$ ) <sup>2</sup>	13,7 10,8
$^{212}\text{Pb}$	10,6 h	238,6 (43,6)	43,6
$^{208}\text{Tl}$	3,05 min	583,1 (32,5)	35,2
$^{207}\text{Bi}$	31,55 r	569,7 (97,7)	97,7
$^{205}\text{Bi}$	15,31 d	703,4 (31,1)	31,1

\*Pro každý radionuklid je uvedeno pouze nejvíce zastoupené záření gama.

Údaje jsou převzaty z tabulek Nuclear Data Sheets, Academic Press INC.

#### Nejlepší způsob provedení

Do liposomů připravených výše popsány postupů bylo vneseno radium-223 nebo olovo-212. Potom byly provedeny reakce protilátek s liposomy pro dosažení přítomnosti molekul protilátky na povrchu liposomů. Pro systémové podání bude vhodná velikost liposomů přibližně 100  $\mu\text{m}$ , ale pro podávání do dutin mohou být použity typické velikosti 200 až 1000  $\mu\text{m}$ , například pro léčení mozkového tumoru, nebo pro léčení intraperitoneální rakoviny vaječníků. (Liposomy větší velikosti zpomalí rychlost vylučování z dutiny, do které se preparát vstříkne, čímž se uchová v oblasti tumoru vyšší koncentrace.)

### Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 Vazba PEGylovaných liposomů, obsahujících buď protilátku Fab' nebo Fab' značenou folátem konjugovanou k membráně liposomu, na buňky OVCAR 3.

Obr. 2 Vazba folátovaných PEG liposomů na buňky OVCAR 3 ve srovnání s nefolátovanými.

### Příklady provedení vynálezu

#### Příklad 1

#### Vnášení $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ do liposomu

Metody: systém  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$  byl vyráběn zářením  $^{220}\text{Rn}$  ze zdroje  $^{228}\text{Th}$ , jak je popsáno autory Hassfjell a Hoff (1994).  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$  bez přidaného nosiče byl z jímací nádobky uvolněn použitím 0,1M  $\text{HNO}_3$  a roztok byl nanesen na kolonu 2 x 20 mm iontoměničové pryskyřice AG 50W-X4. Systém  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$  byl potom eluován 2M  $\text{HCl}$  a roztok byl odpařen do sucha. Systém  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$  byl potom rozpuštěn ve 200  $\mu\text{l}$  10mM roztoku acetátu pH 5.  $^{212}\text{Pb}$  bylo kvantifikováno měřením příslušného gama záření 238,6 keV (tabulka 1).  $^{212}\text{Bi}$  byl kvantifikován měřením gama záření 583,1 keV dceřinného isotopu  $^{208}\text{Tl}$  při dosažení radioaktivní rovnováhy.

Výsledky: Bylo zjištěno, že pro inkubační doby až tři dny bylo s liposomy asociováno méně než 0,2 % přidané aktivity.

Liposomy odpovídající koncentraci lipidu 30 až 60 mM byly důkladně smíseny s filmem ionoforu A23187 (10 až 13 nM). Potom byl přidán přibližně 1 MBq systému  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$  a směs byla inkubována při 75 °C 30 min a potom byla provedena eluce na koloně PD-10. Frakce obsahující více než 95 % naplněných váčků byla potom eluována na druhé koloně PD-10. Zadržení  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$  asociovaného s liposomy

bylo zjišťováno inkubací váček při 37 °C v lidském séru nebo PBS. Distribuce aktivity byla sledována po dobu 24 hod.

Výsledky: Účinnost vnášení  $^{212}\text{Pb}$ : 34,8 % (n = 3).

Retence byla měřena spektroskopií gama a bylo zjištěno, že pro doby inkubace do 24 hodin bylo s liposomy asociováno více než 99 %  $^{212}\text{Pb}$ .

## Příklad 2

### Retence $^{212}\text{Bi}$ vytvořeného rozpadem $^{212}\text{Pb}$ asociovaného s liposomy

Metody: Do liposomů bylo vneseno  $^{212}\text{Pb}$  jak bylo popsáno výše. Radioaktivita asociovaná s liposomy byla izolována elucí reakční směsí 10 mM EDTA v PBS na koloně PD-10 předekvilibrované 10 mM EDTA v PBS.

Po 3 hod potřebných pro zajištění rovnováhy přechodu mezi  $^{212}\text{Pb}$  a  $^{212}\text{Bi}$  byly nanесeny alikvoty roztoku na kolony PD-10 předekvilibrované 10 mM EDTA v PBS pro oddělení volných radionuklidů od radionuklidů asociovaných s liposomy. Distribuce aktivity byla sledována po dobu 24 hod.

Oddělený alikvot značených liposomů, u kterého nebyl proveden separační postup (se stejnou geometrií jako bylo získáno z chromatografických postupů) byl měřen pro použití jako standard. Tento postup byl proveden pro zajištění poměru aktivity  $^{212}\text{Bi}/^{212}\text{Pb}$  při radioaktivní rovnováze.

Výsledky: Porovnáním poměru  $^{212}\text{Bi}/^{212}\text{Pb}$  získaného pro chromatograficky dělené liposomy s poměrem rovnovážné směsi bylo zjištěno, že v liposomech bylo po rozpadu  $^{212}\text{Pb}$  zadrženo více než 95 % isotopu  $^{212}\text{Bi}$ .

Dále byla porovnávána měření aktivity  $^{212}\text{Bi}$  ve dvou chromatograficky získaných frakcích. Více než 99 % celkové aktivity  $^{212}\text{Bi}$  eluované do těchto frakcí odpovídá liposomům.

### Příklad 3

#### Testování možného opakovaného vnášení Pb a Bi do liposomů

Metody: Liposomy odpovídající 30 až 60 mM lipidu s obsahem 150 mM kyseliny citronové, 30 mM DOTA a s použitím vnějšího roztoku s obsahem 10 mM EDTA v PBS byly přidány k filmu ionoforu A23187 (20 až 26 nmol na vnitřním povrchu skleněné lahvičky). Potom byl přidán  $^{212}\text{Pb}$  a  $^{212}\text{Bi}$  v PBS a byla provedena inkubace při 37 °C. Alikvoty roztoku byly eluovány přes kolony PD-10 a chromatograficky získané frakce odpovídající eluátu liposomů byly testovány vlastním Ge-detektorem (tj. PIN).

Výsledky: Po 24 hodinách nebylo pozorováno detekovatelné vnesení (<1 %)  $^{212}\text{Pb}$  a  $^{212}\text{Bi}$ .

### Příklad 4

#### Vnášení $^{223}\text{Ra}$ do liposomů

$^{223}\text{Ra}$  bylo vytvářeno v generátoru na bázi  $^{227}\text{Ac}$ , jak se popisuje v Larsen a Henriksen, 1999. Ve stručnosti,  $^{227}\text{Ac}$  a jeho dceřinný nuklid  $^{227}\text{Th}$  jsou zachyceny na koloně extrakční chromatografické pryskyřice umožňující eluci  $^{223}\text{Ra}$  minerální kyselinou. Pro inkorporaci radia do liposomů byl roztok eluovaný z generátoru odpařen do sucha a  $^{223}\text{Ra}$  bylo potom rozpuštěno v 5 mM citrátu, pH 7,4.

Liposomy odpovídající koncentraci lipidu 30 až 60 mM byly důkladně míchány s filmem ionoforu A23187 (10 až 13 nmol na vnitřním povrchu skleněné lahvičky). Potom bylo přidáno přibližně 50 kBq  $^{223}\text{Ra}$  a směs byla inkubována při 75 °C 20 min. Reakční směs

byla potom přidána do 100  $\mu$ l 10 mM EDTA a eluována na koloně PD-10 pro izolaci radioaktivity asociované s lipidovými váčky.

Retence  $^{223}\text{Ra}$  asociovaného s liposomy byla zjišťována inkubací váček při 37 °C v lidském séru (Sigma) nebo 5 mM EDTA v lidském séru při koncentraci liposomů 0,3 mg celkového lipidu/ml séra. Výsledky jsou ukázány v tabulce 2 a ukazují, že  $^{223}\text{Ra}$  je v liposomech velmi stabilně zachyceno.

Tabulka 2

Doba inkubace (dny)	% celkového $^{223}\text{Ra}$ ve frakci liposomů
1	94,6 $\pm$ 1
3	94 $\pm$ 2,5
4	94,7 $\pm$ 0,5

Střední hodnota  $\pm$  standardní odchylka,  
n = 4

Příklad 5

Zjišťování, zda opakované vnášení bude mít vliv na experiment s retencí  $^{223}\text{Ra}$

Metody: Liposomy odpovídající 30 až 60 mM lipidu vytvořené hydratací lipidických filmů 150 mM kyselinou citronovou, 30 mM DOTA, vnější roztok PBS nebo sérum, byly přidány k filmu ionoforu A23187 (10 až 13 nmol na vnitřním povrchu skleněné lahvičky). Potom bylo přidáno  $^{223}\text{Ra}$  v 5 mM citrátu pH 7,4 a byla provedena inkubace při 37 °C. Alikvoty roztoku byly nanášeny na kolony PD-10 a chromatograficky získaná frakce odpovídající liposomům byla testována vlastním Ge-detektorem.

## Příklad 6

### Vnášení $^{207}\text{Bi}$ do liposomů

Metody:  $^{203-207}\text{Bi}$  byly vyráběny (p, xn) reakcemi na terčích z přírodního olova a čištěny použitím extrakce chromatografickou pryskyřicí selektivní pro olovo (Henriksen a Hoff, 1998).

Při této studii byla použita směs isotopů Bi, která se skládá hlavně z  $^{205}\text{Bi}$  a  $^{207}\text{Bi}$ , která bude dále označována jako  $^{207}\text{Bi}$ . 50  $\mu\text{l}$  roztoku  $^{207}\text{Bi}$  v  $10^{-4}$  M HCl bylo přidáno k liposomům odpovídajícím 30 až 60 mM lipidu, které byly předtím smíseny s filmem ionoforu A23187 (10 až 13 nmol na vnitřním povrchu skleněné lahvičky) a směs byla inkubována 30 min při 75 °C. K reakční směsi bylo potom přidáno 100  $\mu\text{l}$  10 mM EDTA a byla provedena eluce na koloně PD-10 pro izolaci radioaktivity asociované s lipidickými váčky.

Výsledky: Bylo zjištěno, že 32 % celkového  $^{207}\text{Bi}$  je asociováno s liposomy.

## Příklad 7

### Vnášení $^{228}\text{Ac}$ do liposomů

Metody:  $^{228}\text{Ac}$  bylo izolováno z preparátu  $^{232}\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  kombinací extrakce rozpouštědlem a iontové výměny.  $^{232}\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  (původně  $4\text{H}_2\text{O}$ ) byl rozpuštěn ve 20 ml 0,1M  $\text{HNO}_3$  a přidán do 500 ml dělicí nálevky a směs byla přivedena do styku s 5 x 100 ml 2M roztoku HDEHP v heptanu. Vodná fáze byla potom promyta třikrát heptanem a potom nanesena na kolonu 3 x 40 mm kationtové iontoměničové pryskyřice AG50W-X12 pro izolaci  $^{228}\text{Ac}$  jak bylo popsáno (Cabell, 1959). Z této kolony byly eluovány  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{224}\text{Ra}$  a  $^{228}\text{Ra}$  3M  $\text{HNO}_3$  a roztok byl ponechán stát více než 20 hod. Roztok byl potom odpařen do sucha a radionuklidy byly uvolněny z nádoby 1 ml 1M  $\text{HNO}_3$ . Tento roztok byl nanesen na kolonu 3 x 40 mm AG50W-X12. Znovu byly eluovány  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{224}\text{Ra}$  a  $^{228}\text{Ra}$  3M  $\text{HNO}_3$ .  $^{228}\text{Ac}$  bylo zředěno 6M

HNO<sub>3</sub> a eluát byl odpařen do sucha. <sup>228</sup>Ac bylo potom uvolněno z nádoby 200 μl 5 mM HNO<sub>3</sub>. Přibližně 6 kBq <sup>228</sup>Ac bylo přidáno k liposomům s obsahem ionoforu A23187, jak bylo popsáno výše, a směs byla inkubována 60 min při 75 °C. Do reakční směsi bylo potom přidáno 100 μl 10 mM EDTA a byla provedena eluce na koloně PD-10 pro izolaci radioaktivity asociované s lipidickými váčky. Frakce odpovídající více než 95 % naplněných váček byly spojeny a potom eluovány na druhé koloně PD-10. Retence <sup>228</sup>Ac v liposomech byla testována inkubací radioaktivně značených váček při 37 °C v lidském séru nebo PBS. Distribuce aktivity byla sledována po dobu 24 hod.

Výsledky: Při testování vnášení bylo s liposomy po provedení popsaného postupu asociováno 90 až 95 % přidaného <sup>228</sup>Ac (byla provedena korekce na rozpad v průběhu značení a čištění). Bylo zjištěno, že při sledování retence bylo pro doby inkubace až do 24 hodin s liposomy asociováno více než 98 % <sup>228</sup>Ac.

### Příklad 8

#### Vnášení <sup>90</sup>Y

Metody: <sup>90</sup>Y bylo použito v tomto příkladu jako stopovací látka pro studium chování radioaktivně značených liposomů. Při této studii byly <sup>90</sup>Y a <sup>90</sup>Sr měřeny kapalným scintilačním čítáním.

<sup>90</sup>Y bylo izolováno od <sup>90</sup>Sr pomocí chromatografické pryskyřice pro selektivní extrakci stroncia jak je popsáno autory Dietz a Horwitz (1992). Při tomto experimentu bylo <sup>90</sup>Sr (Amersham, Buckinghamshire, Anglie) v 0,1M HNO<sub>3</sub> odpařeno do sucha a ke zbytku byla přidána 3M HNO<sub>3</sub>. Roztok byl nanesen na kolonu 3 x 20 mm Sr-pryskyřice (EiChroM, Darien, IL, USA) a kolona byla promyta 5 ml 3M HNO<sub>3</sub>. Tento postup selektivně eluuje <sup>90</sup>Y, zatímco Sr se na koloně dostatečně zadrží pro snížení obsahu <sup>90</sup>Sr ve směsi <sup>90</sup>Sr/<sup>90</sup>Y s faktorem přibližně 10<sup>3</sup> (Dietz a Horwitz, 1992). Potom bylo <sup>90</sup>Sr

z kolony vytěsněno použitím 0,05M HNO<sub>3</sub> a tento roztok byl ponechán jeden týden pro umožnění zvýšení množství <sup>90</sup>Y. Potom byl roztok odpařen do sucha a ke zbytku byla přidána 3M HNO<sub>3</sub> před separací radionuklidů na druhé koloně Sr-pryskyřice. Eluát obsahující <sup>90</sup>Y byl odpařen do sucha a radionuklid byl uvolněn z nádoby použitím 200 μl 5mM HNO<sub>3</sub>. Tento roztok byl přidán k liposomům obsahujícím ionofor A23187 (jak bylo popsáno výše) a inkubován 60 min při 75 °C. K reakční směsi bylo potom přidáno 50 μl 10 mM EDTA a směs byla eluována na koloně PD-10 pro izolaci radioaktivity asociované s lipidickými váčky. Frakce odpovídající více než 95 % váček byla potom eluována na druhé koloně PD-10. Retence <sup>90</sup>Y asociovaného s liposomy byla testována inkubací váček při 37 °C v lidském séru nebo PBS. Distribuce aktivity byla sledována po dobu čtyř dnů.

Výsledky: Po jedné hodině nanesení a čištění na gelové filtrační koloně bylo s liposomy asociováno více než 95 % přidaného <sup>90</sup>Y.

Při studiu retence v liposomech byly získány následující výsledky: Po 5 hod a 1 dnu bylo asociováno s liposomy více než 99 %. Po 4 dnech bylo zjištěno, že frakce asociovaná s liposomy je 98 ± 1 %.

Jak bylo v těchto experimentech ukázáno, liposomy mohou být radioaktivně značeny radionuklidy emitujícími částice alfa a/nebo beta, a tyto nukleotidy jsou dobře zadržovány při fyziologické teplotě.

### Příklad 9

#### Příprava systému yttrium-90/radium-223 PEGylovaný liposom-folát-Fab'

Při tomto experimentu byl použit F(ab')<sub>2</sub>RØ myelom (podtřída IgG<sub>1</sub>) v koncentraci 14 mg/ml v PBS (Michalsen, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norsko).

### Konjugace kyseliny listové k protilátkám

Kyselina listová.2H<sub>2</sub>O byla nejprve rozpuštěna v dimethyl-sulfoxidu (Fluka, obsah H<sub>2</sub>O nižší než 0,05 %). Roztok byl potom jehlou nanesen na aktivovaná molekulová síta 4 Å (Fluka) a uchován v atmosféře argonu v temnu 6 až 10 hod. Folát značený tritiem (<sup>3</sup>H-folát) byl přidán jako vodný roztok draselné soli <sup>3</sup>H-folátu (1% vzhledem ke kyselině citronové). Specifická aktivita <sup>3</sup>H-folátu použitého pro konjugaci k proteinu byla 7 až 7,5 GBq/mol.

<sup>3</sup>H-folát byl aktivován pro vazbu na protilátku F(ab')<sub>2</sub> proti myelomu přidáním 10 mol ekvivalentů 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)karbodiimidu k roztoku folátu a inkubací 30 min při teplotě laboratoře. Potom byl k proteinu přidán 30 až 40 násobný molární nadbytek aktivovaného folátu s koncentrací 14 mg/ml v PBS a směs byla ponechána reagovat 30 až 60 min. Reakce byla ukončena přidáním 0,2 ml 0,3M glycinu ve směsi PBS/borát, pH 8,5. Konjugát folát F(ab')<sub>2</sub> (folát-F(ab')<sub>2</sub>) byl oddělen od nezreagovaného materiálu pomocí kolony PD-10 předekvilibrované v PBS. Pro vytvoření konjugátu folát-Fab' byl folát-F(ab')<sub>2</sub> inkubován v 1 mM dithiotreitolu (DTT) při teplotě laboratoře 2 hod a potom byla provedena eluce na koloně NAP-5 typu size exclusion. Frakce obsahující folát-Fab' byly zbaveny kyslíku probubláváním argonu roztokem a potom byl roztok ihned smíchán s roztokem liposomů.

Míra konjugace kyseliny listové byla zjištěna obsahem <sup>3</sup>H v čištěném proteinu při použití měření kapalnou scintilací (Beckmann LS6500) v kombinaci se spektrofotometrickým odečítáním při 280 nm.

Pro kvantifikaci frakce folát-Fab' navázané na liposomy bylo před reakcí s DTT přidáno stopové množství jodovaného F(ab')<sub>2</sub> (protein byl jodován standardním postupem s použitím systému IodoGen).

### Konjugace značených protilátek k liposomům

DSPE-PEC2000-MPB (Northern Lipids, VA, Kanada) ve formě sodné soli byl přidán v množství 5 molárních % celkového fosfolipidu. Liposomy byly jinak vytvořeny a byly také připraveny pro krok vnášení kationtů prostřednictvím ionoforu identickým způsobem jak bylo popsáno pro nePEGylované liposomy.

Po ponechání reakční směsi po kroku nanášení ohřát na teplotu laboratoře byla suspenze liposomů zbavena kyslíku a potom byl přidán folát-Fab' pro získání koncentrace proteinu 0,3 až 0,5 mg/ml. Koncentrace lipidu byla 1 až 3 mM při zjišťování testem Bartlett phosphorous assay (Bartlett, 1958). Konjugát folát-Fab' a liposomy byly ponechány reagovat 2 hod při teplotě laboratoře. Reakční směs byla potom nanesena na kolonu PD-10 ekvilibrovanou v PBS. PEG-liposomy konjugované s folátem-Fab' byly uchovávány při 4 °C 12 až 15 hod před použitím při testech vazby na folátový receptor.

Radioaktivita navázaná na liposomy byla měřena detektorem NaI studnicového typu s korekcí na přetečení v příslušných kanálech z dvojitě značených vzorků. Jako referenční byly použity vzorky jednoho nuklidu a směsí nuklidů.

Na základě měření radioaktivity byla koncentrace proteinu převedena na počet Fab' na liposom za předpokladu velikosti liposomu 100 nm a  $8 \cdot 10^4$  fosfolipidů/váček (Kirpotin a další, 1997) a molekulové hmotnosti Fab' myelomové protilátky 52 000.

Radioaktivita navázaná na buňky byla měřena detektorem NaI (trojnásobné koncentrace pro Y-90) a čítáním kapalné scintilace po přidání scintilátoru Insta-Gel plus (Packard) (tabulka 3).

Tabulka 3

Vazba  $^{90}\text{Y}$ -liposomů konjugovaných s protilátkami s nebo bez folátu na buňky OVCAR

Přidaný liposom/buňku	% folát-negativních liposomů navázaných na buňky	% folát-pozitivních liposomů navázaných na buňky
$1 \cdot 10^5$	<0,5	$10 \pm 3$
$1 \cdot 10^4$	$1 \pm 0,5$	$9 \pm 3$
$1 \cdot 10^3$	$4 \pm 2$	$11 \pm 2$
$1 \cdot 10^2$	$5 \pm 1$	$16 \pm 2$
10	$8 \pm 3$	$46 \pm 8$

Detekce  $^3\text{H}$ -folátu na liposomech

PEG liposomy (koncentrace lipidu 2,5 mM) v pufru 20 mM HEPES/300 mM sacharóza reagovaly s Fab' konjugovaným s  $^3\text{H}$ -folátem (0,5 mg/ml v PBS, poměr folát/Fab'  $2 \pm 0,2$ ). Po 2 hod při teplotě laboratoře byly liposomy s navázaným systémem folát-Fab' izolovány elucí na koloně materiálu Sepharose CL-4B. Množství konjugátu  $^3\text{H}$ -folát-Fab' na liposomech bylo kvantifikováno kapalným scintilačním čítáním chromatograficky získaných frakcí a bylo zjištěno, že poměr folát-Fab'/liposom je přibližně 110.

Zkratky

DSPC: distearoylfosfatidylcholin

DOTA: kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctová

DSPE-PEG2000-MPB: N-(4-(p-maleimidofenyl)butyryl)-1,2-distearoyl-  
-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin (Northern Lipids, VA,  
Kanada)

HEPES: kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová

PBS: fyziologický roztok s fosfátovým pufrem

EDTA: kyselina ethylendiamin-N,N'-tetraoctová

HDEHP: kyselina bis(2-ethylhexyl)fosforečná

PEG: polyetylenglykol

DTT: dithiotreitol

#### Odkazy

Bartlett G. R., Fosforus assay in column Chromatography. J. Biol.  
Chem. 234 (3), 466 - 468 (1958)

Cabell M. J., The purification, determination and neutron capture cross  
section of actinium-227, Can. J. Chem. 37, 1094 - 1101, (1959)

DeVita Jr. V. T., Hellman S., Rosenberg S. A., Cancer. Principles &  
practice of oncology. 5. vydání, Lippincot-Raven, Philadelphia,  
New York, USA (1997)

Dietz M. L. a Horwitz E. P., Improved chemistry for the production of  
Y-90 for medical applications. Appl. Radiat. Isot. 43, 1093 -  
1101 (1992)

Forssen E. A., The design a development of DaunoXome® for solid  
tumor targeting in vivo. Adv. Drug Delivery Rev. 24, 133 - 150  
(1997)

Gabizon R., Horowitz A. T., Goren D., Tzemach D., Mandelbaum-  
Shavit F., Quasen M. M., a Zalipsky S. Targeting Folate receptor  
with folate linked to extremities of poly(ethylenglycol)-grafted

- liposomes: In vitro studies. *Biokonjugate Chem.* 10, 289 - 298 (1999)
- Gabison A. Liposome circulation time and tumor targeting: Implication for cancer chemotherapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* 16, 285 - 294 (1995)
- Gaze M. N. The current status of targeted radiotherapy in clinical practice. *Phys. Med. Biol.* 41, 1895 - 1903 (1996)
- Goins B., Phillips W. T. a Klipper R. Repeat injection studies of technetium-99m labeled PEG-liposomes in the same animal. *J. Liposome Res.* 8(2), 265 - 281 (1998)
- Hall E. *Radiobiology for the radiologist.* 4. vyd., JB Lippincott Company, Philadelphia, USA (1994)
- Hassfjell S. P. a Hoff P. A generator for production of Pb-212 a Bi-212. *Appl. Radiat. Isot.* 45, 1021 - 1025 (1994)
- Henriksen G. a Hoff P. Isolation of cyklotron produced Bi-205, Bi-206 a Pb-203 using a lead-selective extraction chromatographic resin. *Appl. Radiat. Isot.* 49, 357 - 359 (1998)
- Hwang K. J. a Mauk M. R. Fate of lipid vesicles in vivo: A gamma-ray perturbed angular correlation study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 74, 4991 - 4995 (1977)
- Kirpotin D., Park J. W., Hong K., Zalipsky S., Wen-Lu L., Carter P., Benz C. C. a Papahadjopoulos D. Sterically stabilised Anti-HER2 Immunoliposomes: Design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry,* 36, 66 - 75, (1997)
- Kostarelos K., Emfietzoglou D. a Stamatelou M. Liposome-mediated delivery of radionuclides to tumor models for cancer radiotherapy: A quantitative analysis. *J. Liposome Res.* 9(3), 407 - 424 (1999)

- Kranz, D. M., Roy, E. J. a Patrick, T. A. Konjugates of folate anti-effector cell antibodies, US pat. No. 5,547,668 (20. srpen 1996)
- Larsen R. H., Akabani G., Welsh P. a Zalutsky M. R. The cytotoxicity and microdosimetry of astatine-211-labeled chimeric monoclonal antibodies in human glioma and melanoma cells in vitro. *Radiat. Res.* 149, 155 - 162 (1998)
- Larsen R. H., Henriksen G. Norská patentová přihláška No. P990001 (1999)
- Lee R. J. a Low P. S. Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 269, 3198 - 3204 (1994)
- MacDonald R. C., MacDonald R. I., Menco BPhM., Takeshita K., Subbarao N. K. a Hu Lan-rong. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Bioch. Biophys. Acta* 1061, 297 - 303 (1991)
- Maruyama K., Takizawa T., Takahashi N., Tagawa T., Nagaike K. a Iwatsuru M. Targeting efficiency of PEG-immunoliposome-konjugated antibodies at PEG terminals. *Adv. Drug Delivery Rev.* 24, 235 - 242 (1997)
- Mauk M. R. a Gamble R. C. Preparation of lipid vesicles containing high level of entrapped radioactive cations. *Anal. Biochem.* 94, 302 - 307 (1979)
- McClure J. J. a Feinendegen, L. E. Alpha-emitters for medical therapy: Second Bi-annual Workshop, Toronto, Kanada, 4. - 5. červen (1998). Report from Department of Energy, Germantown, MD, USA
- Mirzadeh S., Kumar K., Ganzow, O. A. The chemical fate of  $^{212}\text{Bi}$ -DOTA formed by  $\beta$ -decay of  $^{212}\text{Pb}(\text{DOTA})_2^-$ . *Radiochimica Acta*, 60, 1 - 10 (1993)

- Ogihara-Umeda I., Sasaki T., Kojima S., Nishigori H. Optimal radiolabeled liposomes for tumor imaging. *J. Nucl. Med.* 37(2), 26 - 332 (1996)
- Olson F., Hunt C. A., Szoka F., Vail W. J. a Papahadjopoulos D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polykarbonate membranes. *Bioch. Biophys. Acta* 557, 9 - 23 (1979)
- Pikul II S. S., Parks N. J., Schneider P. D. In vitro killing of melanoma by liposome delivered intracellular irradiation. *Arch. Surg.* 122, 1417 - 1420 (1987)
- Reddy, J. A. a Low, P. S. Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 15(6): 587 - 627 (1998)
- Ritter M. A., Cleaver J. E. a Tobias C. A. High-LET radiations induce a large proportion of non-rejoining DNA-breaks. *Nature* 266, 653 - 655 (1977)
- Shinoda, T., Takagi A., Maeda A., Kagatani S., Kono Y. a Hashida M. In vivo fate of folate-BSA in non-tumour- a tumour-bearing mice. *J. Pharm. Sci.* 87(12): 1521 - 1526, 1998
- Tilcock C. P., Ahkong Q. F. a Parr M. An improved method for the preparation of liposomal gadolinium-DTPA-Ionophore-Mediated active entrapment of gadolinium. *Invest. Radiol.* 26, 242 - 247 (1991)
- Trippett, T. M. a Bertino J. R. Therapeutic strategies targeting proteins that regulate folate and reduced folate transport. *J. Chemotherapy* 11: 3 - 10 (1999)
- Turner A. F., Presant C. A., Proffitt R. T., Williams L. E., Winsor D. W. a Werner J. L. In-111-labeled liposomes: Dosimetry and tumor depiction. *Radiology* 166(3), 761 - 765 (1988)

Utkhede D., Yeh V., Szucs M. a Tilcock C. Uptake of Yttrium-90 into lipid vesicles. Jour. Lip. Res. 4(2). 1049 - 1061 (1994)

**Zastupuje:**

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Konjugátorový systém, vyznačující se tím, že obsahuje liposomy s ionofory a s chelátorem umístěným uvnitř liposomů, kde liposomy dále uvnitř obsahují těžký radionuklid nebo těžké radionuklidy emitující částice alfa a/nebo  $^{212}\text{Pb}$  jako generátor  $^{212}\text{Bi}$  emitujícího částice alfa.
2. Konjugátorový systém podle nároku 1, vyznačující se tím, že koncentrace chelátoru uvnitř liposomů je vhodná pro zachycení dceřiných nuklidů.
3. Konjugátorový systém podle některého z nároků 1 až 2, vyznačující se tím, že chelátor je zvolený ze skupiny zahrnující kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctovou, DOTA; kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotridekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctovou, TRITA; kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotetradekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctovou, TETA; kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(methylen)-fosfonovou, DOTMP; kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotridekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(methylen)fosfonovou; kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotetradekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(methylen)fosfonovou; kyselinu diethylentriamin-N,N',N''-pentaoctovou a její isomerní deriváty; kryptát[2,2,2], kryptát[3,2,2], kryptát[2,2,1] a jejich mono- a dibenzoderiváty; přemostěné kalix[4]areny obsahující skupiny bohaté na elektrony - donory, jako hydroxyl, karboxyl, ester, amid, amin; kyselinu 1,10-diaza-4,7,13,16-tetraoxacyklooktadekan-1,10-

-N,N'-bis-octovou; a 1,10-diaza-4,7,13,16-tetraoxacyklo-  
-oktadekan-1,10-N,N'-bis-malonát.

4. Konjugátorový systém podle některého z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že liposomy obsahují v membráně aktivované skupiny umožňující konjugaci proteinů nebo jiných molekul s afinitou k receptorům k těmto aktivovaným skupinám.
5. Konjugátorový systém podle nároku 4, vyznačující se tím, že těmito aktivovanými skupinami je polyethylenglykol.
6. Konjugátorový systém podle některého z nároků 1 až 5, vyznačující se tím, že liposomy jsou konjugovány k proteinům vázajícím se na receptor.
7. Konjugátorový systém podle nároku 6, vyznačující se tím, že uvedené proteiny vázající se na receptor jsou monoklonální nebo polyklonální protilátky, nebo fragmenty nebo konstrukty protilátek, nebo folát.
8. Konjugátorový systém podle nároku 6, vyznačující se tím, že liposomy jsou konjugovány s protilátkami třídy IgM nebo IgG nebo fragmenty nebo konstrukty z těchto tříd protilátek.
9. Konjugátorový systém podle nároku 6, vyznačující se tím, že liposomy jsou konjugovány s protilátkami

třídy IgM nebo IgG nebo fragmenty nebo konstrukty z těchto tříd protilátek, přičemž protilátky, fragmenty nebo konstrukty jsou značeny folátem a radionuklidem nebo směsí různých radionuklidů.

10. Konjugátorový systém podle některého z nároků 1 až 9, vyznačující se tím, že protilátky nebo fragmenty nebo konstrukty protilátek konjugované s liposomy jsou myší, chimérické nebo lidské, monoklonální nebo polyklonální.
11. Konjugátorový systém podle nároku 10, vyznačující se tím, že protilátky nebo fragmenty nebo konstrukty protilátek jsou značeny folátem, přičemž vazebné místo antigenu je zaměřeno na protein vázající folát, FBP.
12. Konjugátorový systém podle nároku 10, vyznačující se tím, že protilátky nebo fragmenty nebo konstrukty protilátek jsou značeny folátem, přičemž vazebné místo antigenu je zaměřeno na antigen různý od FBP.
13. Konjugátorový systém podle některého z nároků 1 až 12, vyznačující se tím, že radionuklidem je těžký emitore alfa částic a/nebo  $^{212}\text{Pb}$  jako generátor alfa-emitoru  $^{212}\text{Bi}$  zvolený ze skupiny  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{223}\text{Ra}$  a  $^{227}\text{Th}$ .
14. Konjugátorový systém podle některého z nároků 1 až 13, vyznačující se tím, že dceřinný nuklid je  $^{212}\text{Bi}$  a mateřský nuklid je  $^{212}\text{Pb}$ .

15. Způsob výroby radioaktivně značeného konjugátorového systému, vyznačující se tím, že liposomy s ionofory a chelátorem vhodné koncentrace se stabilně radioaktivně značí těžkými emitory částic alfa mísením roztoku obsahujícího radionuklid nebo směs radionuklidů emitujících záření částic alfa a/nebo  $^{212}\text{Pb}$  jako generátor alfa-emitoru  $^{212}\text{Bi}$ , s roztokem obsahujícím liposomy, a směs se inkubuje při zvýšené teplotě vzhledem k fyziologické teplotě pro dosažení transportu radionuklidu nebo nuklidů do liposomů.
16. Způsob podle nároku 15, vyznačující se tím, že chelátor se volí ze skupiny obsahující kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctovou, DOTA; kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotridekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctovou, TRITA; kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotetradekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraoctovou, TETA; kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(methylen)fosfonovou, DOTMP; kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotridekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(methylen)fosfonovou; kyselinu 1,4,7,10-tetraazacyklotetradekan-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra-(methylen)fosfonovou; kyselinu diethylentriamin-N,N',N''-pentaoctovou a její isomerní deriváty; kryptát[2,2,2], kryptát[3,2,2], kryptát[2,2,1] a jejich mono- a dibenzoderiváty; přemostěné kalix[4]areny obsahující skupiny bohaté na elektrony - donory, jako je hydroxyl, karboxyl, ester, amid, amin; kyselinu 1,10-diaza-4,7,13,16-tetraoxacyklooktadekan-1,10-N,N'-bis-octovou; a 1,10-diaza-4,7,13,16-tetraoxacyklooktadekan-1,10-N,N'-bis-malonát.

17. Způsob podle některého z nároků 15 až 16, vyznačující se tím, že liposomy obsahují v membráně aktivované skupiny umožňující konjugaci proteinů nebo jiných molekul s afinitou k receptorům.
18. Způsob podle nároku 17, vyznačující se tím, že těmito aktivovanými skupinami je polyethylenglykol.
19. Způsob podle některého z nároků 15 až 18, vyznačující se tím, že liposomy jsou konjugovány k proteinům vázajícím se na receptor.
20. Způsob podle nároku 19, vyznačující se tím, že uvedené proteiny vázající se na receptor jsou monoklonální nebo polyklonální protilátky, nebo fragmenty nebo konstrukty protilátek, nebo folát.
21. Způsob podle nároku 19, vyznačující se tím, že liposomy jsou konjugovány s protilátkami třídy IgM nebo IgG nebo fragmenty nebo konstrukty z těchto tříd protilátek.
22. Způsob podle nároku 19, vyznačující se tím, že liposomy jsou konjugovány s protilátkami třídy IgM nebo IgG nebo fragmenty nebo konstrukty z těchto tříd protilátek, přičemž protilátky, fragmenty nebo konstrukty jsou značeny folátem a radionuklidem nebo směsí různých radionuklidů, přičemž se použije standardních postupů pro značení protilátek folátem a radionuklidem.

23. Způsob podle některého z nároků 15 až 22, vyznačující se tím, že protilátky nebo fragmenty nebo konstrukty protilátek konjugované s liposomy jsou myší, chimérní nebo lidské, monoklonální nebo polyklonální.
24. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že protilátky nebo fragmenty nebo konstrukty protilátek jsou značeny folátem, přičemž vazebné místo antigenu je zaměřeno na protein vázající folát, FBP.
25. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že protilátky nebo fragmenty nebo konstrukty protilátek jsou značeny folátem, přičemž vazebné místo antigenu je zaměřeno na antigen různý od FBP.
26. Způsob podle některého z nároků 15 až 25, vyznačující se tím, že radionuklidem je těžký emitör alfa částic a/nebo  $^{212}\text{Pb}$  jako generátor alfa-emitoru  $^{212}\text{Bi}$ , zvolený ze skupiny  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{223}\text{Ra}$  a  $^{227}\text{Th}$ .
27. Způsob podle některého z nároků 15 až 26, vyznačující se tím, že dceřinný nuklid je  $^{212}\text{Bi}$  a mateřský nuklid je  $^{212}\text{Pb}$ .
28. Použití konjugátorového systému podle některého z nároků 1 až 14 pro výrobu farmaceutického roztoku vhodného pro injekci nebo infuzi savcům včetně člověka.

29. Použití podle nároku 28 pro výrobu farmaceutického roztoku vhodného pro injekci nebo infuzi savcům včetně člověka intravenózním a/nebo oblastním a/nebo intratumorovým způsobem podáváníí.
30. Použití podle nároku 28 v kombinaci s radioimunokonjugátem nebo několika radioimunokonjugáty a/nebo jinými formami radiofarmaceutické terapie, chemoterapie, léčení vnějším ozářením nebo chirurgickým zákrokem pro léčení maligních stavů.
31. Způsob použití konjugátorového systému podle některého z nároků 1 až 14 na cílové buňky exprimující receptory zvolené ze skupiny protein vázající folát, estrogenový receptor, testosteronový receptor a/nebo různé antigeny monoklonálních protilátek, pomocí injekce pacientům pro účely dodání potenciálně terapeutického zařízení do maligních buněk exprimujících tento receptor nebo receptory.
32. Způsob použití konjugátorového systému podle některého z nároků 1 až 14 pomocí injekce pacientům pro účely dodání potenciálně terapeutického zařízení do maligních buněk exprimujících tento receptor nebo receptory, kde maligní tkáň je rakovina mozku, plic, děložního hrdla, vaječníků nebo rakovina mléčné žlázy nebo leukemie, lymfom nebo maligní melanom.
33. Kit pro přípravu konjugátorového systému podle některého z nároků 1 až 14, vyznačující se tím, že obsahuje lahvičku s obsahem roztoku liposomů a lahvičku

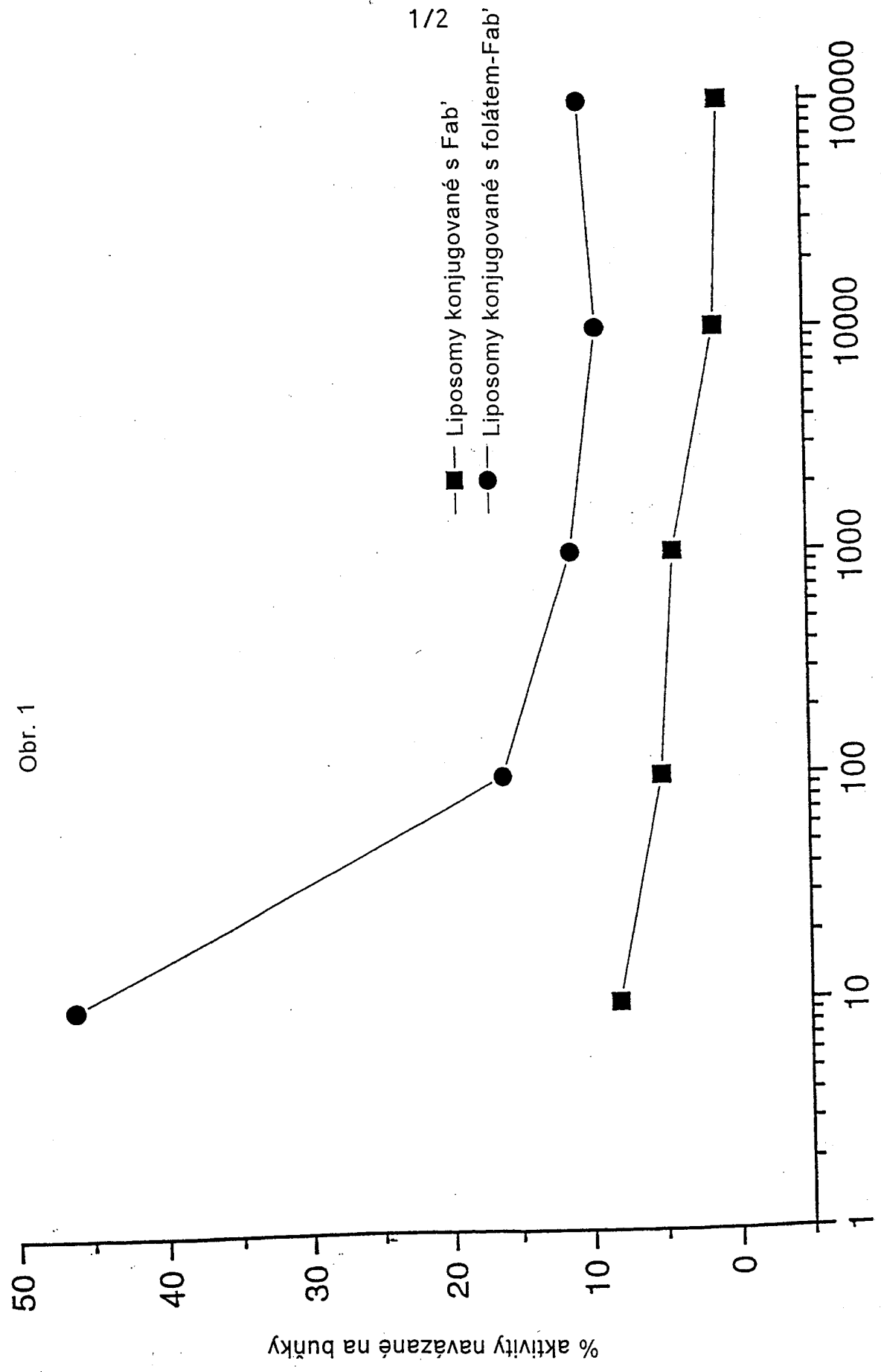
s obsahem radionuklidu v roztoku, které mohou být smíchány pro dosažení radioaktivního značení.

34. Kit pro přípravu konjugátorového systému podle některého z nároků 1 až 14, vyznačující se tím, že obsahuje lahvičku s obsahem roztoku liposomů a druhou lahvičku s obsahem radionuklidu v roztoku a třetí lahvičku s obsahem molekuly s afinitou k receptoru, které mohou být smíchány pro dosažení radioaktivního značení a značení molekulou s afinitou k receptoru.

**Zastupuje:**

30.01.03

Obr. 1

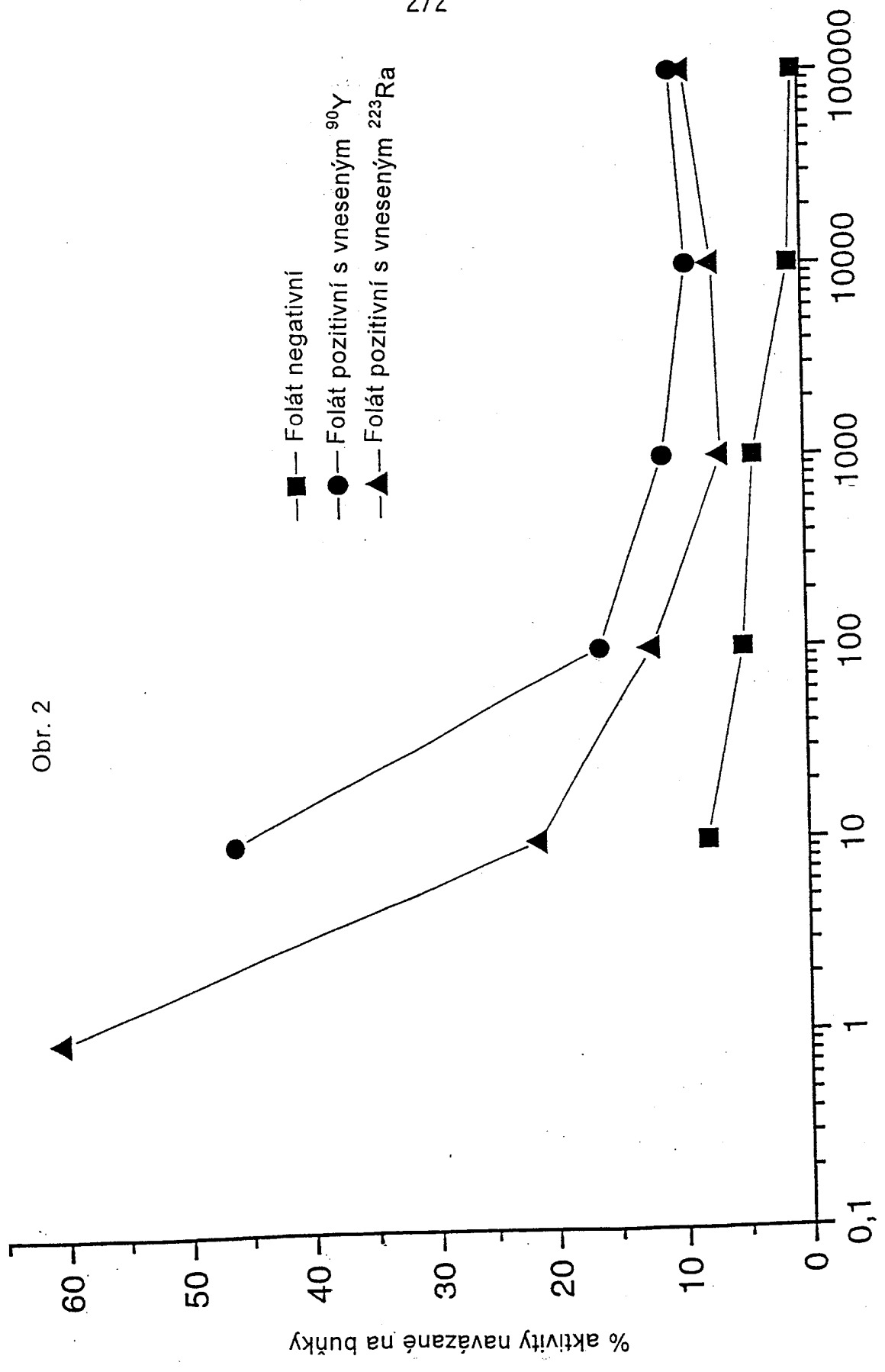


1/2

■ Liposomy konjugované s Fab'  
● Liposomy konjugované s folátem-Fab'

Poměr přidaného množství liposomů vzhledem k buňkám

% aktivity navázané na buňky



Obr. 2

Poměr přidaného počtu liposomů vzhledem k počtu buněk

% aktivity navázané na buňky