



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03804636.9

[43] 公开日 2005年7月13日

[11] 公开号 CN 1638807A

[22] 申请日 2003.3.6 [21] 申请号 03804636.9

[30] 优先权

[32] 2002.3.8 [33] IT [31] RM2002A000128

[86] 国际申请 PCT/IT2003/000135 2003.3.6

[87] 国际公布 WO2003/075960 英 2003.9.18

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.26

[71] 申请人 希格马托制药工业公司

地址 意大利罗马

[72] 发明人 R·德圣缇斯 R·林德斯特德

C·A·奴佐罗

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

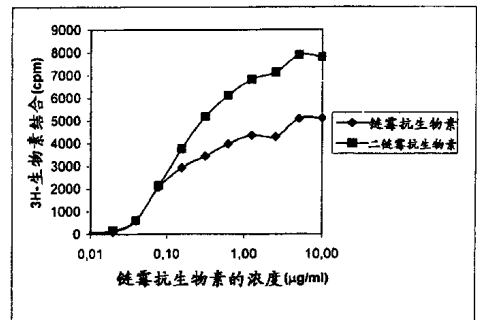
代理人 陈轶兰

权利要求书2页 说明书9页 附图6页

[54] 发明名称 在预靶向的放射免疫治疗中有效增加放射性生物素浓度的抗生物素蛋白二聚体

[57] 摘要

本发明描述了抗生物素蛋白和链霉抗生物素的二聚体(二抗生物素蛋白),其中接头是辛二酸酯,其依次结合到生物素的不同官能基团(-NH₂或-COOH)。与抗生物素蛋白相比,当在采用支持的人腱生蛋白、生物素化抗腱生蛋白单克隆抗体(Mab-B)、抗生物素蛋白/二抗生物素蛋白和生物素-³H的体外预靶向试验中使用时,二抗生物素蛋白显示出能增加在靶上标记的生物素的量。还描述了这种二抗生物素蛋白在基于三步预靶向放射免疫治疗程序的癌症诊断和抗癌治疗中的用途。



1. 抗生物素蛋白二聚体，其中两个抗生物素蛋白分子通过辛二酸酯经由-NH₂基团结合。
2. 抗生物素二聚体，其中两个抗生物素蛋白分子通过分子量为3400的聚乙二醇经由-COOH基团结合。
3. 权利要求1或2的二聚体，其中抗生物素蛋白是链霉抗生物素。
4. 药物和/或诊断组合物，包含权利要求1-3任一项的二聚体。
5. 权利要求4的组合物，其可胃肠外或局部区域给药。
6. 权利要求1-3任一项的二聚体用于制备药物和诊断工具的用途。
7. 权利要求1-3任一项的二聚体在制备用于诊断或治疗器官或组织的病理情况的药物中的用途。
8. 权利要求1-3任一项的二聚体在制备用于治疗或诊断肿瘤的药物或诊断工具中的用途。
9. 权利要求1-3任一项的二聚体在体外采用抗体的预靶向方法中的应用。
10. 权利要求1-3任一项的二聚体在制备用于治疗疾病的药物中的用途，其中所述治疗是用抗体采用预靶向方法进行的。
11. 权利要求10的用途，其中所述疾病是肿瘤。
12. 权利要求10的用途，其中所述抗体是抗腱生蛋白抗体。
13. 权利要求12的用途，其中所述抗腱生蛋白抗体是单克隆抗体。
14. 权利要求10的用途，其中所述药物是试剂盒的一部分，所述试剂盒用于通过三步预靶向技术诊断和治疗肿瘤。
15. 权利要求14的用途，其中所述试剂盒包含放射性药物。
16. 用于肿瘤的放疗或诊断的试剂盒，特征在于所述试剂盒的至少一种组分包含权利要求1或2的二聚体。
17. 权利要求16的试剂盒，用于预靶向技术。
18. 权利要求17的试剂盒，其中所述预靶向技术是三步。

19.权利要求 16、17 或 18 任一项的试剂盒，包含生物素化抗腱生蛋白抗体。

20.权利要求 19 的试剂盒，其中所述抗体是单克隆抗体。

在预靶向的放射免疫治疗中有效增加 放射性生物素浓度的抗生物素蛋白二聚体

在此描述的发明涉及抗生物素蛋白的衍生物，其用于肿瘤的诊断和治疗，特别是在所谓的三步预靶向方法中。

技术领域

在此描述的发明涉及经修饰的抗生物素蛋白，其用于人类和动物的诊断和治疗，特别是用于诊断和治疗病理状况如肿瘤。

在此描述的发明涉及制备药物和诊断工具的技术领域，并提供化合物、其制备方法、其使用方法和在药学领域适于工业应用的包含所述化合物的组合物。

在此描述的发明提供化合物、组合物和方法，其用于诊断性和治疗性药物，作为图象获取技术和对器官和组织的病理情况的治疗。

特别地，但并非除外地，本发明涉及通过放射性药物进行肿瘤治疗的领域。

发明背景

肿瘤治疗主要通过使用旨在杀死肿瘤细胞的物质来实现。这可以采用必须进入肿瘤细胞以发挥其全部效应的细胞毒性物质来实现，或通过用足够能量的辐射处理肿瘤细胞以杀死细胞。在这两种情况下，均存在尽可能选择性地将物质递送到靶细胞的问题，以避免对周围健康细胞的可能损伤。对于放射性药物，即负载放射性部分的物质，将活性部分（也就是说放射性部分）选择性地递送到肿瘤靶标，避免放射性核素在体内或在围绕肿瘤周围的健康细胞中扩散的问题尤为令人关注。

一种特别有效的肿瘤检测和治疗方法描述于专利 EP 0 496 074。该专利的方案已被应用于对脑肿瘤进行的所谓的预靶向的抗体引导的放射免疫治疗（PAGRIT）。在该方法中，在生物素化的抗腱生蛋白单

克隆抗体 (Mab-B) 后, 将抗生物素蛋白注射到人类对象中, 通过与其形成复合体而从血流中除去未与肿瘤结合的任何游离的 Mab-B, 所述复合体由肝脏有效除去 (追踪效应)。然后给予链霉抗生物素输注, 目的在于与用抗生物素蛋白可获得的相比, 获得对肿瘤的更好抗生物素蛋白化, 其中与链霉抗生物素相比, 抗生物素蛋白在血液中的持久性太短。

虽然该体系显示出阳性的临床反应 (Cremonesi, M.等人, 1999; Paganelli, G.等人, 1999; Paganelli, G.等人, 2001), 一个主要的限制因素在于链霉抗生物素引起的强免疫应答 (Paganelli, G.等人, 1997)。为了克服这两个障碍, 即链霉抗生物素的高度免疫原性, 和抗生物素蛋白的快速清除, 已采用了经化学修饰的抗生物素蛋白, 通过将聚乙二醇 (PEG) 链共价结合到抗生物素蛋白, 基于使用不同分子量的直链或支链 PEG 而具有不同衍生水平。初步研究显示, 随着 PEG 对抗生物素蛋白官能化 (在下文中称为聚乙二醇化) 程度的增加, 抗生物素蛋白的血浆半衰期延长, 免疫原性下降, 并且该物质相对于肿瘤的特异性生物分布改善。

由于聚乙二醇化降低抗生物素蛋白-PEG 结合 Mab-B 生物素的能力, 结果是衍生物的效力的下降 (Chinol, M.等人, 1998)。

对这个问题的解决方案在以 Immunomedics 的名义提交的专利申请 WO 94/23759 中提出, 其中基于高分子量分子 (优选大于 5,000 Da, 如葡聚糖、蛋白质和聚羧酸) 的化学衍生描述了抗生物素蛋白共聚物。但在该专利中实际描述的五种多聚体中没有一种就其在预靶向过程或其它过程中的作用效力进行过表征。

如在此描述的发明所表明的, 在上述专利申请 WO 94/237599 中给出的多聚化 (也包括二聚化) 的一般构思并未对一般技术人员提供完全和充分的指导以寻找能满足在三步预靶向方法应用中的必要条件的通用抗生物素蛋白多聚体。事实上, 使用不同的双官能交联剂获得的不同的二抗生物素蛋白 (diavidin) 尽管具有结合游离生物素的相同能力, 但当在体外在三步预靶向中进行测定时其效力不同, 差异程度

在某些情况下被证实是完全无效力的。

该观察结果表明，抗生物素蛋白的多聚化并不自动产生有用的功能性产物，对于适于预靶向的加强分子的选择而言，生物学表征是必要的。

发明概述

现已发现，通过用选自二琥珀酰亚胺基辛二酸酯（二聚体在下文中称为二抗生物素蛋白 1）和分子量 3400 的 PEG 二胺（二聚体在下文中称为二抗生物素蛋白 2）的能结合抗生物素蛋白的氨基和/或羧基基团的双官能接头结合两个抗生物素蛋白分子，获得两个抗生物素蛋白二聚体，其满足用于称为 PAGRIT 的肿瘤治疗方法的必要条件。

因此在此描述的本发明的目的是其中两个抗生物素蛋白分子通过辛二酸酯经由-NH₂基团结合的抗生物素蛋白二聚体，和其中两个抗生物素蛋白分子通过分子量为 3400 的聚乙二醇经由-COOH 基团结合的抗生物素蛋白二聚体。

在此描述的本发明的另外目的是包含上述二抗生物素蛋白的药物组合物和/或诊断组合物。

本发明的其它目的是二抗生物素蛋白作为用于器官和组织的病理情况的药物或诊断剂的用途，特别是用于制备用于治疗或诊断肿瘤的药物。

与本发明相关的这些和其它目的将在以下详细说明，同时还提供了试验实施例。

发明详述

在本发明中，抗生物素蛋白意指抗生物素蛋白和链霉抗生物素，但在其中链霉抗生物素用作本发明的特定具体实施方案的情况下，会指明这一实际情况。

二抗生物素蛋白 1 是这样制备的：使抗生物素蛋白与具有 N-羧基琥珀酰亚胺基(NHS 酯)作为活性酯的二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)反应，DSS 是有结合抗生物素蛋白的-NH₂基团的活性的同双官能交联剂。

二抗生物素蛋白 2 和二抗生物素蛋白 3 (阴性对照) 是分别使用分子量为 3400 的 PEG 二胺 (PEG(NH₂)₂) 和分子量为 3400 的聚乙二醇-二琥珀酰亚胺基丙酸 [PEG(SPA)₂] 作为同双官能交联剂产生的。

由于与抗生物素蛋白相比链霉抗生物素较慢地从循环中消除, 二链霉抗生物素是本发明一个特定的具体实施方案。较长的半衰期对于实现抗生物素蛋白效力的最大增加是关键。对于链霉抗生物素交联的方案与二抗生物素蛋白 1 制备所用的相类似。

在此描述的本发明的药物组合物或诊断组合物包含至少一种在此描述的二抗生物素蛋白。二抗生物素蛋白将处于与药理学中常用的合适的载体和/或赋形剂所形成的混合物中, 所述载体和/或赋形剂诸如描述于最新版“Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook”中的那些。本发明的组合物将含有有效量的二抗生物素蛋白。

优选的药物组合物的实例是那些允许胃肠外和局部区域给药的组合物。适于所述目的的药物组合物是溶液、悬浮液和有待在用时重构的冻干形式。

有关本发明的二抗生物素蛋白的用途, 这些物质特别适于制备用于通过称为用抗体进行预靶向的技术来诊断或治疗组织的病理情况如肿瘤的药物或诊断工具, 并且出于此原因, 这些物质还适于体外预靶向技术。举例来说在一个实施方案中, 用生物素化的抗腱生蛋白抗体, 优选单克隆抗体, 来实施预靶向技术。

本发明的工业应用的合适形式还有用于诊断或治疗的试剂盒, 特别是用于肿瘤的放疗, 例如描述于 EP 0 496 074, 公开在 European Journal of Nuclear Medicament Vol. 26, No 4; April 1999; 348-357 中的 Paganelli, Chinol 等人的研究, US 5.968.405 和相关文献。

在此描述的本发明的另一个目的是用于肿瘤治疗或诊断的试剂盒, 特别是通过放射性的方式, 例如采用预靶向方法, 优选三步, 特征在于所述试剂盒的至少一种组分含有二抗生物素蛋白。在所述试剂盒中, 一种优选的生物素化抗体是抗腱生蛋白抗体, 甚至更优选单克隆抗体。

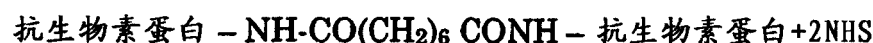
以下实施例进一步例示本发明。

实施例 1

二抗生物素蛋白 1

将 1 ml 抗生物素蛋白溶液 (300 μM 在 PBS 中, pH 7.4) 与 25 μl DSS (Pierce) (25 mM 在 DMSO 中) 混合 (抗生物素蛋白:DSS 比: 1:2)。将混合物在 0°C 温育 2 小时, 然后用 50 μl Tris (1M, pH 8.0) 阻断反应。上述反应比的选择是基于采用 1:1 - 1:10 的比例的初步试验。

反应方案如下:



(二抗生物素蛋白 1)

实施例 2

二抗生物素蛋白 2

将 1 ml 抗生物素蛋白 (450 μM 在 PBS 中, pH 7.4) 与 120 μl PEG(NH₂)₂ (Shearwater Corp.) (9 mM, 在 H₂O 中) 和 50 μl 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺-HCl (EDAC) (260 mM, 在 DMSO 中) 混合 (抗生物素蛋白:PEG 比: 约 1:2.5), 并置于室温下反应 2 小时。反应结束时, 加入 50 μl Tris (1M, pH 8.0), 将混合物进行凝胶过滤。抗生物素蛋白:PEG 比是在 1:1 - 1:10 的范围内于 4.0 - 8.0 的反应 pH 进行研究的。在纯化的二抗生物素蛋白 2 终产物中的 PEG:抗生物素蛋白的比值为 0.9, 使用 Sim 等人 1980 所述的方法。简而言之, 将二抗生物素蛋白 2 在水中稀释至 300 μM , 向 1 ml 体积中加入 250 μl 在 1N HCl 中的 5% BaCl₂ 溶液, 然后加入 250 μl 通过在 100 ml 2% KI 中混合 1.27 g I₂ 而制备的溶液。将混合物温育 15 分钟, 然后在 535 nm 读取吸光度。用 PEG(NH₂)₂ 获得标准曲线。

二抗生物素蛋白 2 的反应方案如下:



(二抗生物素蛋白 2)

实施例 3

二抗生物素蛋白 3

将 1 ml 抗生物素蛋白 (150 μM 在 PBS 中, pH 7.4) 与 20 μl PEG 二琥珀酰亚胺基-丙酸酯 (SPA-PEG-SPA) (20 mM 在 H_2O 中) 混合 (抗生物素蛋白:PEG 比: 1:3.5), 并置于 0°C 反应 2 小时。反应比的选择是基于采用 1:2 - 1:10 的比例进行的初步试验。如使用上述 Sim 等人开发的方法所测定的, 在纯化的二聚体中 PEG:抗生物素蛋白的比值为 3:1。反应方案如下:



(二抗生物素蛋白 3)

在实施例 1、2 和 3 中描述的反应的二抗生物素蛋白产率为大约 20 - 30%。增加反应中的 3 种接头的量, 获得的抗生物素蛋白寡聚体 (三聚体等, 未显示) 的最终量增大, 结果在色谱分离中有困难。在 Superdex 200-10/30 凝胶过滤柱上分析反应混合物, 而产物的纯化在 Superdex 200-16/60 柱上完成。二抗生物素蛋白 1、2 和 3 的反应混合物的色谱曲线图分别如图 1 a, b 和 c 所示。在各自的洗脱时间标明了一系列标准蛋白质的分子量 (校准)。柱的校准如图 1 d 所示: 采用葡聚糖蓝 (V_0), 铁蛋白 (444 KDa), 醛缩酶 (158 KDa), 白蛋白 (67 KDa), 和核糖核酸酶 (14 KDa)。

纯化的抗生物素蛋白二聚体呈现于图 1 e, f 和 g。样品在 Superdex 200-10/15 上分离, 流速 0.5 ml/min (a-d) 和 1 ml/min (e-g), 在 PBS

中，在连接至 280 nm 分光光度计的 Jasco HPLC 系统上进行。

实施例 4

二链霉抗生物素蛋白

将 1 ml 链霉抗生物素 (300 μ M 在 PBS 中, pH 7.4) 与 25 μ l DSS (25mM, 在 DMSO 中) 以链霉抗生物素:DSS 比为 1:2 混合, 并在 0°C 温育 2 小时, 然后用 50 μ l 1 M TRIS (pH 8.0) 终止反应。总共测试了 4 种反应条件, 链霉抗生物素:DSS 比从 1:1 - 1:10。我们选择上述比 1:2。

反应方案类似于在之前实施例中报道的。

对于二链霉抗生物素, 在反应结束时交联混合物的色谱曲线图如图 5a 所示。纯化的二链霉抗生物素如图 5b 所示, 而链霉抗生物素如图 5c 所示。样品在 Superdex 200 10/15 柱上分析, 流速 1 ml/min, 在 PBS 中, 在连接至测量 280 nm 吸光度的分光光度计的 Jasco HPLC 系统上进行。

测定二抗生物素蛋白结合生物素的能力

为了比较抗生物素蛋白和二抗生物素蛋白结合生物素的能力, 采用 HABA (4-羟基-偶氮苯-2'-甲酸) 方法。抗生物素蛋白和二抗生物素蛋白均为相当于 3 μ M 67 KDa 抗生物素蛋白单体的浓度, 在 0.1 M 磷酸盐, 0.4 mM HABA 中, pH 7.0。然后加入溶解于磷酸盐的生物素至终浓度从 0 - 20 μ M, 在 500 nm 测量吸光度。

结合生物素的能力被评价为置换 50% 结合的 HABA 所必需的生物素浓度。

对于抗生物素蛋白和 3 种二抗生物素蛋白, 大约 5 μ M 生物素都能置换 50% HABA (图 2), 由此可以推出二抗生物素蛋白在交联之后保存了结合位点总数。二抗生物素蛋白的生物素结合特性与抗生物素蛋白的相当。

体外预靶向试验

为了测试二抗生物素蛋白增加通过生物素化抗腱生蛋白单克隆抗体 (Mab-B) 与腱生蛋白结合的放射性标记的生物素的量的能力, 采

用如图 3 所示的体外预靶向试验。

简而言之，在 4°C 使 96 孔板吸附 0.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 的人腱生蛋白 (Tn-C) 16 小时。用 PBS 和 0.1% Tween 20 洗 3 次之后，将孔中的剩余吸附位点用 PBS, 2% BSA 和 0.1% Tween 20 在室温下封闭 1 小时。然后在孔中于 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的饱和浓度将两种生物素化抗腱生蛋白单克隆抗体 (ST2146 或 ST2077) 温育 2 小时。如上冲洗后，以增加的浓度在孔中一式两份温育抗生物素蛋白或二抗生物素蛋白。最后，在每孔中温育 5 pmol 饱和量的生物素- ^3H (1.6 TBq/mmol) 1 小时。冲洗之后，在 β 计数器中读板。如图 4 所示，对于所用的两种 MAb，与抗生物素蛋白相比，二抗生物素蛋白 1 和二抗生物素蛋白 2 使结合的生物素增加；二抗生物素蛋白 3 对于 MAb ST2146 未显示增加，或对 MAb ST2077 显示出结合能力下降。

与抗生物素蛋白相比，对于 Mab ST2077，二抗生物素蛋白 2 在 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度显示出结合的生物素- ^3H 的量增加 2.1 倍 (3 次试验的平均值)。对于二抗生物素蛋白 1，增加为 1.6 倍 (6 次试验的平均值)，而对于二抗生物素蛋白 3，结合能力低于 (90%) 抗生物素蛋白单体。

由这些试验可以得出结论，接头的长度和在二抗生物素蛋白二聚体中包含的结合位点均影响二聚体在生物素化抗体介导的预靶向中的活性。

二链霉抗生物素证实在体外比链霉抗生物素更有效，如图 6 所示。

在 4°C，用 0.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 的人 Tn-C 包被 96 孔微量滴定板 16 小时，用 PBS, 0.1% Tween 20 洗 3 次，然后用 PBS/2% BSA/0.1% Tween-20 封闭非特异性结合。以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度加入生物素化抗-TnC 抗体 ST2146 温育 2 小时。用 PBS/Tween-20 将孔洗 3 次，然后以指示的浓度加入链霉抗生物素或二链霉抗生物素。最后，加入 5 pmol ^3H -生物素 (1.6 TBq/mmol)，将孔温育 2 小时，冲洗，并在 β 计数器中计数。

如图 6 所示，与链霉抗生物素相比，二链霉抗生物素介导放射性标记的生物素的结合增加。

参考文献

- Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E.S., Caliceti P., Veronese F.M., Cremonesi M., Chiolerio F., Nardone E., Siccardi A.G., Paganelli G. Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. *British Journal of Cancer* 78(2): 189-197, 1998.
- Cremonesi M., Ferrari M., Chinol M., Stabin M. G., Grana C., Prisco G., Robertson C., Tosi G., Paganelli G. Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin: dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients. *Eur J Nucl Med* 26(2):110-120, 1999.
- Paganelli G., Chinol M., Maggiolo M., Sidoli A., Corti A., Baroni S., Siccardi AG. The three-step pretargeting approach reduces the human anti-mouse antibody response in patients submitted to radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med* 24:350-351, 1997.
- Paganelli G., Grana C., Chinol M., Cremonesi M., De Cicco C., De Braud F., Robertson C., Zurrida S., Casadio C., Zoboli S., Siccardi A. G., Veronesi U. Antibody-guided three step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur J Nucl Med* 26(4):348-357, 1999.
- Paganelli G., Bartolomei M., Ferrari M., Cremonesi M., Broggi G., Maira G., Sturiale C., Grana C., Prisco G., Gatti M., Caliceti P., Chinol M. Pre-targeted locoregional radioimmunotherapy with ⁹⁰Y-biotin in glioma patients: Phase I study and preliminary therapeutic results. *Cancer Biother & Radiopharm* 16(3):227-235, 2001.
- Sims G.E.S. and Snape T.J. A method for estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions. *Anal Biochem* 107:60-63, 1980.

图1

二抗生物素蛋白1、2和3通过凝胶过滤分离

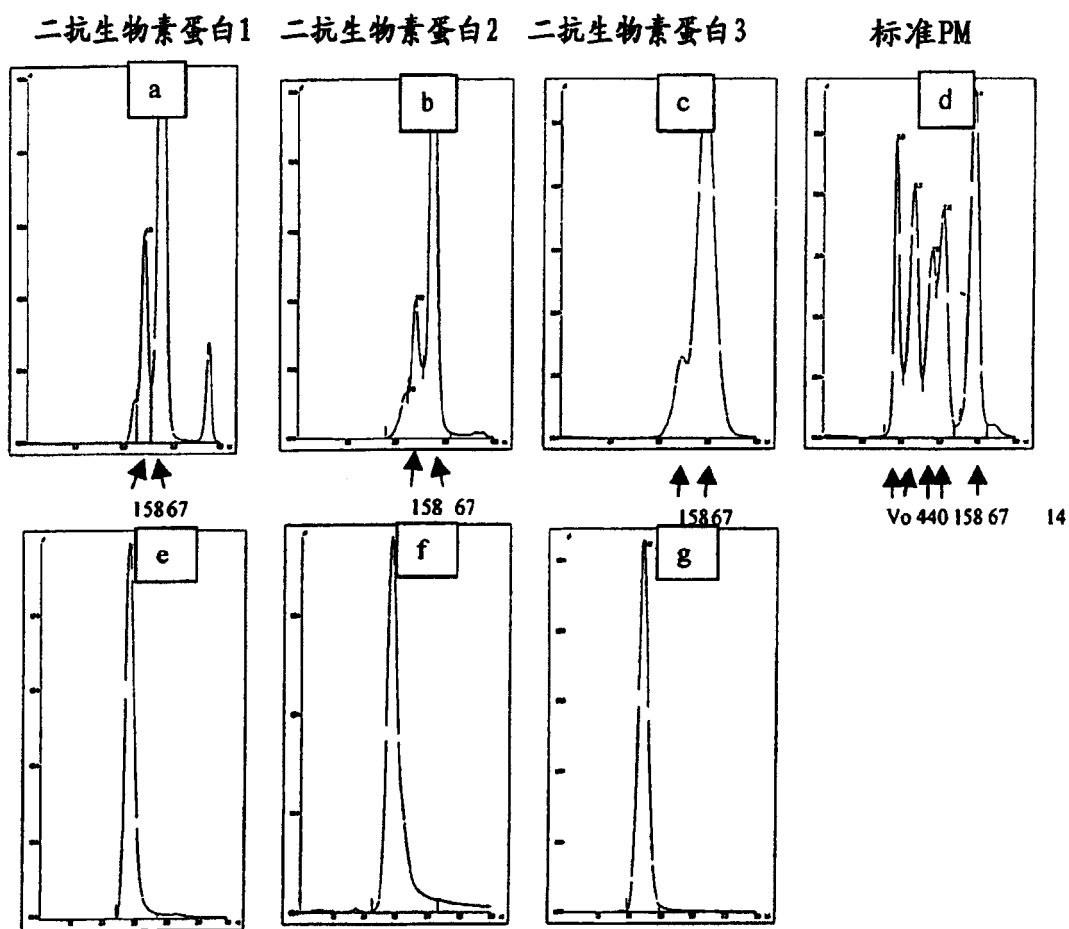


图2

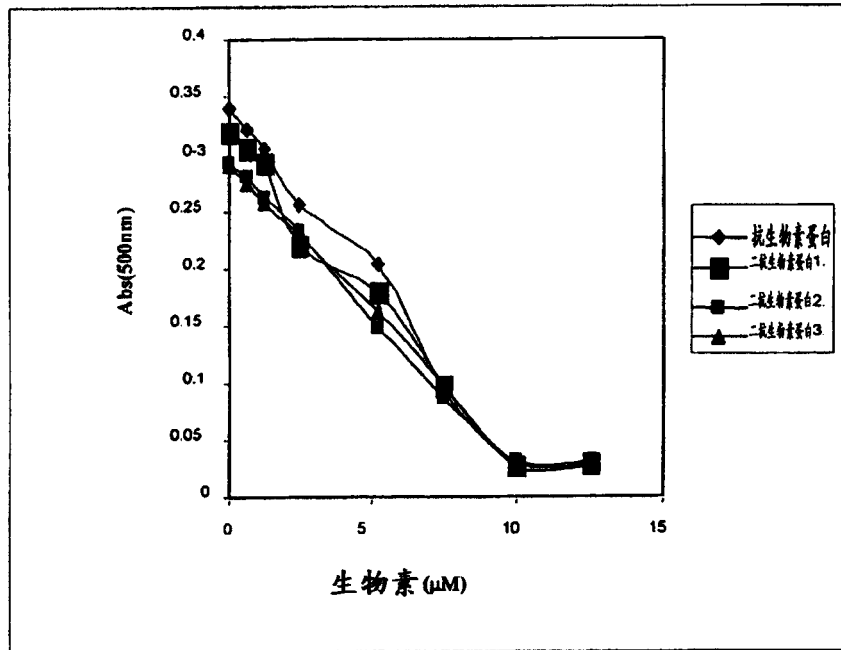


图 3

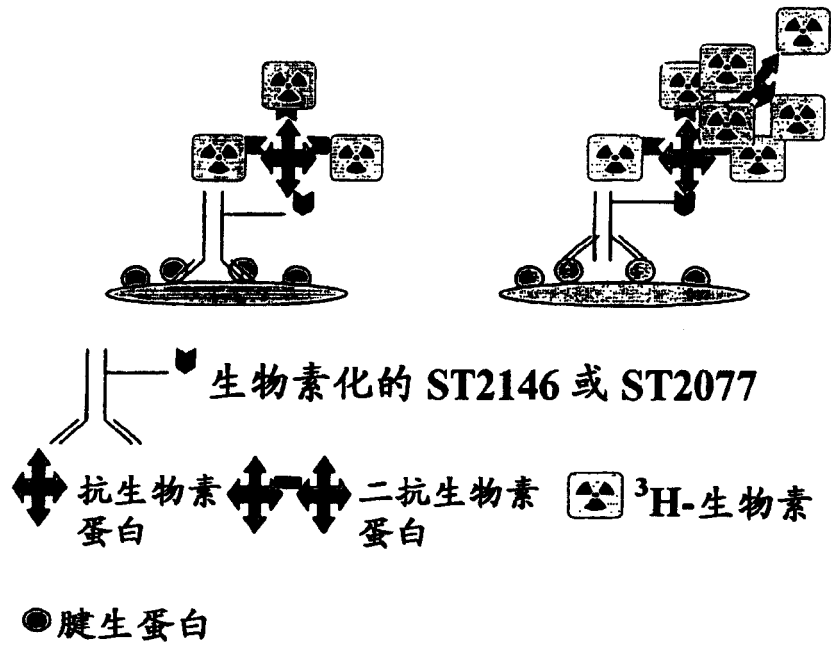


图4

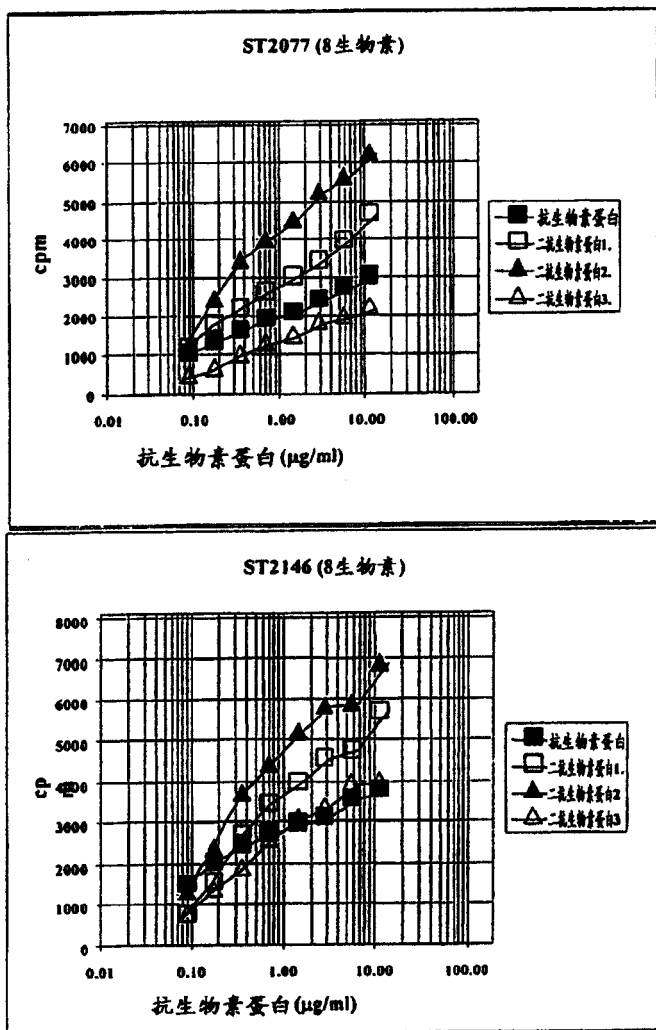


图5

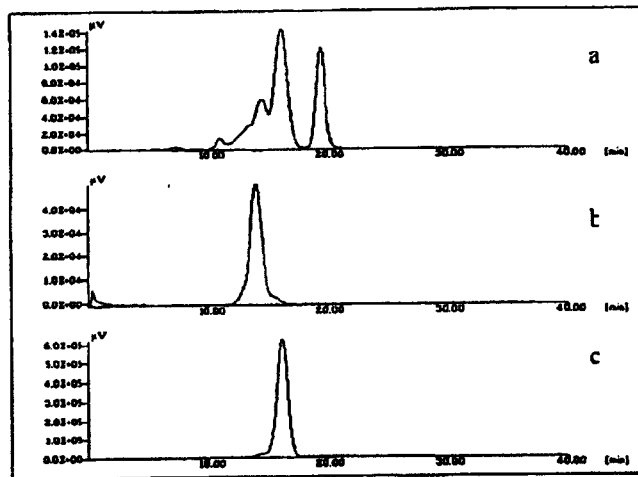
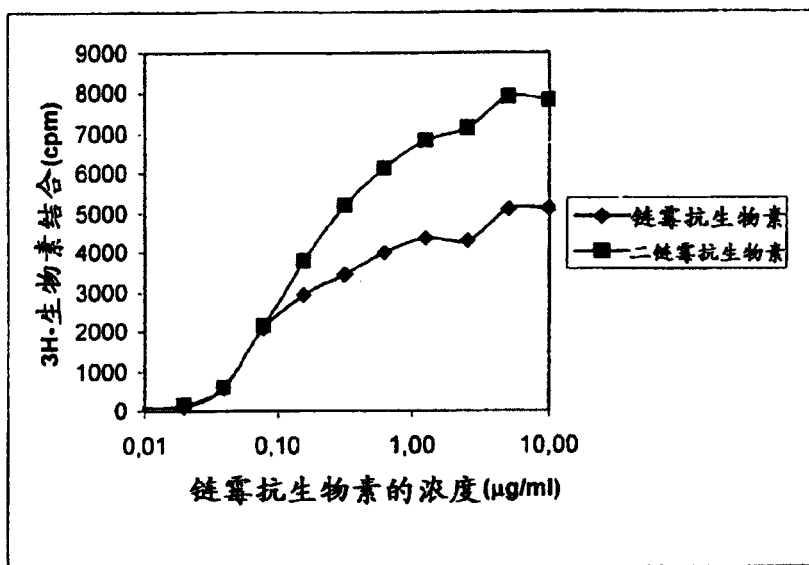


图6



专利名称(译)	在预靶向的放射免疫治疗中有效增加放射性生物素浓度的抗生物素蛋白二聚体		
公开(公告)号	CN1638807A	公开(公告)日	2005-07-13
申请号	CN03804636.9	申请日	2003-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	希格马托制药工业公司		
申请(专利权)人(译)	希格马托制药工业公司		
当前申请(专利权)人(译)	希格马托制药工业公司		
[标]发明人	R德圣缇斯 R林德斯特德 CA奴佐罗		
发明人	R·德圣缇斯 R·林德斯特德 C·A·奴佐罗		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61K47/48 A61K49/00 A61K51/00 A61K51/04 A61P35/00 C07K14/465 C07K16/30 G01N33/577 A61K51/10		
CPC分类号	A61K47/665 A61K47/6898 A61K51/0497 A61P25/00 A61P35/00 B82Y5/00 C07K16/30 A61K47/50 A61K51/10 C07K14/435 C07K14/46		
优先权	102002900999702 2002-03-08 IT		
其他公开文献	CN1638807B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了抗生物素蛋白和链霉抗生物素的二聚体(二抗生物素蛋白), 其中接头是辛二酸酯, 其依次结合到生物素的不同官能基团(-NH₂或-COOH)。与抗生物素蛋白相比, 当在采用支持的人腱生蛋白、生物素化抗腱生蛋白单克隆抗体(Mab - B)、抗生物素蛋白/二抗生物素蛋白和生物素 - 3H的体外预靶向试验中使用, 二抗生物素蛋白显示出能增加在靶上标记的生物素的量。还描述了这种二抗生物素蛋白在基于三步预靶向放射免疫治疗程序的癌症诊断和抗癌治疗中的用途。

