

Даний винахід має відношення до аналізів зв'язування антитіл та комплексів введення радіоактивних ізотопів, приготування ліофілізованих клітин, реагентів та протоколів тестування клінічної ефективності терапевтичних антитіл для обробки/відображення пухлин та клітин пухлин. Більш конкретно, комплекти даного винаходу використовуються для створення і оцінки кон'югатів мічених антитіл, які будуть використані для обробки та відображення пухлин В-клітинної лімфоми методом цільового зв'язування поверхневого антигену В-клітин ВР35 ("CD20").

Всі наведені тут публікації та заявки на патенти включені як посилання в такому ж обсязі, як кожна індивідуальна публікація або заявка на патент була б конкретно та індивідуально включена як посилання.

Імунна система хребетних (наприклад, приматів, включаючи людей, людиноподібних мавп, просто мавп та інших) складається з ряду органів та типів В-клітин, які розвинулись для того, щоб: точно і специфічно розпізнавати чужорідні мікроорганізми ("антиген"), які вражають хребетну істоту - хазяїна; специфічно зв'язувати такі чужорідні мікроорганізми; та виводити/руйнувати такі чужорідні мікроорганізми. Лімфоцити виробляються в тимусі, селезінці та кістковому мозку (дорослих) і представляють близько 30% від всіх білих клітин крові, присутніх в кровоносній системі людини (дорослої).

Існують дві основні субпопуляції лімфоцитів: Т клітини та В-клітини. Т клітини відповідають за клітинний імунітет, в той час як В-клітини відповідають за продукцію антитіл (гуморальний імунітет). Однак Т клітини та В-клітини можна розглядати як взаємозалежні - в типовій імунній відповіді Т клітини активуються, коли рецептор Т клітини зв'язується з фрагментами антигену, які зв'язані з глікопротеїнами головного комплексу гістосумісності (ГКГ) на поверхні клітини, що представляє антиген; така активація є причиною вивільнення біологічних медіаторів ("інтерлейкінів"), які, власне кажучи, стимулюють В-клітини до диференціювання та продукування антитіла ("імуноглобулінів") проти антигену.

Кожна В-клітина в організмі містить на своїй поверхні специфічне антитіло, таким чином, одна В-клітина буде містити антитіло, специфічне до одного антигену, в той час як інша В-клітина буде містити антитіло, специфічне до іншого антигену. Таким чином, В-клітини є досить різними і ця відмінність є критичною для імунної системи. У людини кожна В-клітина може виробляти величезну кількість молекул антитіл (близько  $10^7$ - $10^8$ ). Таке продукування антитіл найчастіше типово припиняється (або значно зменшується), коли чужорідний антиген знищений. Однак іноді проліферація окремої В-клітини буде продовжуватись без послаблення; така проліферація може призводити до раку, який називають "В-клітинна лімфома".

Як Т клітини, так і В-клітини, містять клітинні поверхневі протеїни, які можуть бути використані як "маркери" для їх диференціювання та ідентифікації. Одним таким маркером В-клітини людини є рестриктований до В лімфоцитів антиген диференціювання людини Вр35, позначений як "CD20". CD20 з'являється під час раннього розвитку пре-В клітини і зберігається до стану диференціації плазматичної клітини. Більш конкретно, молекула CD20 може регулювати етап процесу активації, який є необхідним для ініціювання клітинного циклу та диференціювання, і зазвичай експресується в дуже великій кількості в неопластичних ("пухлинних") В-клітинах. CD20, за визначенням, є присутнім як в "нормальних" В-клітинах, так і в "злоякісних" В-клітинах, тобто в тих В-клітинах, чия неослаблена проліферація може призвести до В-клітинної лімфоми. Таким чином, поверхневий антиген CD20 є ймовірним кандидатом для цільового зв'язування В-клітинних лімфом.

Власне кажучи, таке цільове зв'язування може бути узагальнено наступним чином: антитіла, специфічні до поверхневого антигену CD20 В-клітин, наприклад, вводяться пацієнту. Ці анти-CD20 антитіла специфічно зв'язуються з клітинним поверхневим антигеном CD20 (очевидно) як нормальних, так і злоякісних В-клітин; анти-CD20 антитіла, зв'язані з поверхневим антигеном CD20, можуть привести до знищення та зменшення кількості неопластичних В-клітин. Додатково, хімічні реактиви або радіоактивні мітки, які мають можливість знищення пухлини, можуть бути кон'юговані з анти-CD20 антитілом таким чином, що агент специфічно доставляється в, наприклад, неопластичні В-клітини. Незалежно від підходу, головною метою є знищення пухлини: конкретний підхід може бути визначений окремим анти-CD20 антитілом, яке використовується, і, таким чином, можливі підходи до цільового зв'язування CD20 антигену можуть значно відрізнитись.

Наприклад, спроби такого цільового зв'язування поверхневого антигену CD20 наведені в літературі. Як повідомлено в літературі, моноклональне антитіло 1F5 миші (антитіло проти анти-CD20) вводили хворим на В-клітинну лімфому способом безперервного внутрішньовенного введення. Як було повідомлено, надзвичайно високої рівні (>2 грамів) 1F5 були потрібні для того, щоб пухлинні клітини в кровообігу вичерпалися, і результати були описані як "нестійкі". [Press et al., "Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas," Blood 69/2:584-591 (1987)].

Потенційною проблемою цього підходу є факт, що не людським моноклональним антитілами (наприклад, мишачим моноклональним антитілом) типово не вистачає людської ефекторної функціональності, тобто, вони не здатні, між іншим, опосередкувати комплемент-залежний лізис або руйнувати людські цільові клітини через антитіло-залежну клітинну токсичність або через фагоцитоз, опосередкований Fc-рецептором. Більш того, не людські моноклональні антитіла можуть бути розпізнані людським організмом як чужорідний білок; тому повторні ін'єкції таких чужорідних антитіл можуть призвести до індукції імунної відповіді, яка веде до шкідливої реакції гіперчутливості. У випадку мишачих моноклональних антитіл це часто називають Людською відповіддю на Анти-Мишачі Антитіла або "ЛАМА" відповіддю. На додаток, ці "чужорідні" антитіла можуть бути атаковані імунною системою організму таким чином, що вони дійсно нейтралізуються раніше, ніж досягають своїх цільових ділянок.

Лімфоцити та клітини лімфоми по суті чутливі до радіотерапії. Тому злоякісні В-клітини є привабливими цілями для радіоімунотерапії (РМТ) з кількох причин: локальна емісія іонізуючої радіації мічених антитіл може вбивати клітини з або без цільового антигену (тобто CD20) в близькому сусідстві з антитілом, зв'язаним з антигеном; проникаюча радіація, тобто бета-випромінювачі, можуть усунути проблему обмеженого доступу антитіл в великі або полівааскуляризовані пухлини; і загальна кількість необхідних антитіл може бути зменшена. Радіонукліди емітують радіоактивні частинки, які можуть пошкодити клітинну ДНК до стану, коли клітинні відновлювальні механізми не можуть дозволити клітині продовжувати жити; тому, якщо цільовими клітинами є пухлини, то радіоактивні мітки успішно вбивають пухлинні клітини. Мічені антитіла, за визначенням, включають використання радіоактивних речовин, які можуть вимагати

необхідність запобіжних заходів як для хворого (тобто можлива трансплантація кісткового мозку), так і для медичного працівника (тобто необхідність виконання суворих заходів безпеки при роботі з радіоактивними речовинами).

Тому підхід до поліпшення здатності мишачих моноклональних антитіл здійснювати лікування захворювань В-клітин повинен включати кон'югацію радіоактивної мітки до антитіла так, щоб ця мітка або токсин були локалізовані в місці пухлини. Токсини (тобто хіміотерапевтичні агенти, такі як доксорубіцин або мітоміцин С) також повинні бути кон'юговані з антитілами. [Див., наприклад, опубліковану заявку РСТ WO 92/07466 (опубліковано 14 Травня 1992)].

"Химерні" антитіла, тобто антитіла, які містять частини з двох або більше різних видів (наприклад, миші та людини), були розроблені як альтернатива "кон'югованим" антитілам. Були створені химерні антитіла миша/людина і показано, що вони проявляють характеристики зв'язування вихідних мишачих антитіл і ефекторні функції, асоційовані з константною ділянкою людських антитіл. [Див., наприклад, Cabilly et al., U.S. Patent 4,816,567; Shoemaker et al., U.S. Patent 4,978,745; Beavers et al., U.S. Patent 4,975,369; та Boss et al., U.S. Patent 4,816,397, які всі включені тут як посилання]. Загалом, ці химерні антитіла конструюють шляхом приготування геномної генної бібліотеки з ДНК екстрагованої з існуючої мишачої гібридоми, [Nishimura et al. (1987) Cancer Research 47: 999]. Після цього бібліотека перевіряється на наявність варіабельних ділянок генів важких та легких ланцюгів, які проявляють правильні типи перебудови фрагментів антитіл. Після цього клоновані варіабельні ділянки генів вшиваються у вектор експресії, який містить клоновані касети людського гену константної ділянки відповідного важкого або легкого ланцюгу. Потім химерні гени експресують в обрану клітинну лінію, звичайно в лінію мишачої мієломи.

Наприклад, [Liu, A.Y., et al., "Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity", J. Immun. 139/10:3521-3526 (1987)], описує химерне антитіло людина/миша, спрямоване проти антигену CD20, [Див. також РСТ Publication No. WO 88/04936]. Однак це посилання не забезпечує інформацію щодо здатності, ефективності або практичних сторін використання химерних антитіл Liu для лікування В-клітинних захворювань.

Необхідно помітити, що функціональні аналізи *in vitro* (наприклад, комплемент-залежний лізис ("КЗЛ"); антитіло-залежна клітинна цитотоксичність ("АЗКЦ")) не можуть, по суті, пророкувати здатність будь-якого антитіла *in vivo* руйнувати або вичерпувати цільові клітини, що експресують специфічний антиген. [Див., наприклад, Robinson, R.D., et al., "Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate different anti-tumor cell biological activities," Hum. Antibod. Hybridomas, 2:84-93 (1991)] (химерні антитіла людина-миша, які мають АЗКЦ активність, що не виявляється). Тому потенційна терапевтична ефективність антитіл може бути, безсумнівно, оцінена тільки експериментом *in vivo*.

З цією метою заявки, що розглядаються, [08/475,813, 08/475,815 та 08/478,967], наведені тут як посилання в усій повноті, описують мічені анти-CD20 кон'югати для діагностичного "відображення" пухлин В-клітинної лімфоми перед використанням терапевтичних антитіл. "In2B8" кон'югат містить мишаче моноклональне антитіло 2B8, специфічне до людського антигену CD20, яке приєднане до індію [111] ( $^{111}\text{In}$ ) через біфункціональний комплексон, тобто МХ-ДТПК (діетилентриамінпентаоцтова кислота), який містить суміш 1:1 1-ізотіоціанатобензил-3-метил-ДТПК і 1-метил-3-ізотіоціанатобензил-ДТПК. Індій-[111] вибраний як діагностичний радіонуклід тому, що він випромінює гамма-випромінювання і знаходить першочергове використання як агент, що проявляє.

Патенти, які мають відношення до комплексонів і кон'югатів комплексонів, відомі в галузі. Наприклад, [U.S. Patent No. 4,831,175, Gansow], направлений на хелати полізаміщеної діетилентриамінпентаоцтової кислоти та білкові кон'югати, які містять цю кислоту, та способи їх приготування. [U.S. Patent Nos. 5,099,069, 5,246,692, 5,286,850, and 5,124,471, Gansow] також відносяться до хелатів полізаміщеної ДТПК. Ці патенти наведені тут в їх повноті.

Специфічний біфункціональний комплексон, використаний для полегшення хелатоутворення в заявках [08/475,813, 08/475,815 та 08/478,967], був вибраний тому, що він має високу спорідненість до тривалентних металів і забезпечує підвищене значення співвідношення пухлина-не пухлина, зменшене поглинання кісткою та велике втримання радіонукліду *in vivo* на цільових ділянках, тобто ділянках пухлини В-клітинної лімфоми. Однак в галузі відомі інші біфункціональні комплексони, і вони можуть бути успішно використані в терапії пухлин.

Мічені терапевтичні антитіла для цільового зв'язування і руйнування В-клітинних лімфом та пухлинних клітин описані також в заявках [08/475,813, 08/475,815 та 08/478,967]. Зокрема, Y2B8 кон'югат містить таке ж мишаче моноклональне антитіло 2B8 проти CD20 людини, приєднане до ітрію-[90] ( $^{90}\text{Y}$ ) за допомогою такого ж біфункціонального комплексону. Цей радіонуклід був вибраний для терапії з деяких причин. Період напіврозпаду  $^{90}\text{Y}$ , 64 години, є достатньо довгим для акумуляції антитіла пухлиною і, на відміну, наприклад, від  $^{131}\text{I}$ , він є чистим бета-випромінювачем високої енергії, яка не супроводжується гамма-випромінюванням при його розпаді в області від 100 до 1000 діаметрів клітини. Мінімальна кількість проникаючого випромінювання дозволяє амбулаторне використання  $^{90}\text{Y}$ -мічених антитіл. Більш того, інтерналізація мічених антитіл не є необхідною для того, щоб вбити клітину, і локальна емісія іонізуючої радіації буде летальною для сусідніх пухлинних клітин, які мають нестачу цільового антигену.

Тому що  $^{90}\text{Y}$  радіонуклід був приєднаний до антитіла 2B8 з використанням такої ж молекули МХ-ДТПК біфункціонального комплексону, кон'югат Y2B8 має такі ж самі переваги, як розглянуті вище, наприклад, підвищене утримання радіонукліду в цільовій ділянці (пухлині). Однак, на відміну від  $^{111}\text{In}$ , він не може бути використаний для цілей відображення з-за відсутності гамма-випромінювання, асоційованого з цим процесом. Таким чином, діагностичний радіонуклід "відображення", такий як  $^{111}\text{In}$ , може бути використаний для визначення розташування і відносного розміру пухлини до і/або наступного використання терапевтичних химерних або  $^{90}\text{Y}$ -мічених антитіл з метою зменшення пухлини. На додаток, індій-мічені антитіла дають можливість виконати дозиметричну оцінку.

В залежності від запланованого використання антитіл, тобто як діагностичного або терапевтичного реагенту, в галузі відомі і використовуються для схожих цілей інші радіомітки. Наприклад, радіонукліди, які використовують в клінічному діагнозі, включають  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ , так само як  $^{111}\text{In}$ . Антитіла також містять різними радіонуклідами для потенційного використання в цільовій імунотерапії [Peirersz et al. (1987)]

The use of monoclonal antibody conjugates for the diagnosis and treatment of cancer. *Immunol. Cell Biol.* 65: 111-125]. Ці радіонукліди включають  $^{188}\text{Re}$  і  $^{186}\text{Re}$ , а також  $^{90}\text{Y}$ , і в меншій мірі  $^{199}\text{Au}$  і  $^{67}\text{Cu}$ . I-[131] також використовують для терапевтичних цілей. У [Патенті США No. 5,460,785], наведеному тут як посилання, надано перелік таких радіоізотопів.

Як повідомлено в заявках, що розглядаються, [08/475,813, 08/475,815 і 08/478,967], використання міченого кон'югату Y2B8, так само як неміченого химерного анти-CD20 антитіла, приводило до значного зменшення пухлини у мишей, які мали В-клітинну лімфобластну пухлину. Крім того, клінічні випробування на людині показали значне зменшення В-клітин у хворих на лімфому, яким вводили химерні анти-CD20 антитіла. Фактично, химерне 2B8 нещодавно було оголошено першим національним затвердженням FDA анти-раковим моноклональним антитілом з найменуванням Rituxan®. Таким чином, було показано, що принаймні одне химерне анти-CD20 антитіло продемонструвало терапевтичну ефективність в лікуванні В-клітинної лімфоми.

На додаток, [у заявці США, серійний No. 08/475,813], наведений тут як посилання, описується послідовне використання Rituxan®, химерного анти-CD20, з обома або з кожним індій-міченим або ітрій-міченим мишачими моноклональними антитілами. Хоча мічені антитіла, використані в цій комбінованій терапії, є мишачими антитілами, початкова обробка химерними анти-CD20 значно зменшує популяцію В-клітин так, що ЛАМА відповідь знижується, таким чином сприяючи комбінованому терапевтичному і діагностичному режиму.

Таким чином, в цьому контексті комбінованої імунотерапії, мишачі антитіла можуть знайти використання як діагностичні реагенти. Крім того, в [Заявці США 08/475,813] було показано, що терапевтично ефективне дозування ітрій-міченого анти-CD20 антитіла, яке слідує за використанням Rituxan®, є достатнім для (а) очистки будь-яких В-клітин периферійної крові, які залишилися не очищеними химерним анти-CD20 антитілом; (б) початку спустошення лімфовузлів щодо В-клітин; або (в) початку спустошення інших тканин щодо В-клітин.

Таким чином, сполучення радіоміток з раковими терапевтичними антитілами забезпечує цінний клінічний інструмент, який може бути використаний для оцінки потенційної терапевтичної ефективності таких антитіл, для створення діагностичних реагентів для контролю прогресу лікування, і для розробки додаткових терапевтичних реагентів, які можуть бути використані для посилення початкового потенціалу химерного антитіла до знищення пухлини. За умов доведеної ефективності анти-CD20 антитіла в лікуванні лімфоми, що не є лімфомою Ходжкіна, і відомої чутливості лімфоцитів до радіоактивності, було б великою перевагою, щоб такі терапевтичні антитіла стали комерційно доступними у вигляді комплекту, за допомогою якого вони можуть бути легко модифіковані радіомітками і використані прямо для хворого в клінічних умовах.

Хоча існує багато методів та реагентів для виконання радіомічення антитіл, в галузі все ж не вистачає зручних носіїв для розміщення цих реагентів в клінічних умовах таким шляхом, щоб вони могли бути легко отримані і введені хворому до того, як відбудеться значний розпад радіомітки або значне руйнування антитіла з-за радіомітки. Нестача таких зручних засобів комерціалізації цієї цінної технології можлива завдяки поганій ефективності зв'язування, яку продемонстрували деякі відомі протоколи мічення і необхідності наступної очистки реагентів на колонці після процедури радіомічення. Затримка в розробці таких комплектів також може частково спричинятися завдяки недоступності у минулому чистих комерційних радіоізотопів, які могли бути використані для створення ефективно мічених продуктів, що не потребують наступної очистки. Альтернативно, можливою причиною загальної недоступності таких комплектів є недостатня кількість антитіл, що були здатні досягти визнання або ефективності, якої Rituxan® досяг в лікуванні лімфоми у хворих людей.

Наприклад, як описано в [Патенті США 4,636,380], який наведений тут як посилання, в науковому товаристві існувала загальна думка, що для клінічного використання радіопрепарату він повинен бути підданий тривалому та кропіткому процесу розділення та очищення. Дійсно, введення хворому незв'язаного радіоміченого препарату було б не бажаним. Необхідність додаткового етапу очищення робить процес радіомічення антитіл в клінічних умовах неможливим, особливо для лікарів, які не мають ні обладнання, ні часу очищати їх власні ліки.

Більш того, радіомічені білки, по суті, можуть бути нестабільними, особливо мічені радіолітичними ізотопами, такими як  $^{90}\text{Y}$ , які мають тенденцію викликати пошкодження антитіла тим більше, чим довше вони знаходяться з ним в близькому сусідстві. В свою чергу, такий радіоліз стає причиною ненадійної ефективності препарату через втрати радіомітки і/або зменшеного зв'язку з цільовим антигеном і може призвести до небажаної імунної відповіді, спрямованої до денатурованого білку. Дотепер, клініцисти без обладнання для мічення і очищення антитіл на місці не мають іншого вибору, аніж замовляти вже мічені терапевтичні антитіла, або мітити їх поза клінікою на відповідному обладнанні і транспортувати для введення пацієнту. Всі ці маніпуляції додають дорожочинний час до періоду між міченням та введенням препарату, таким чином сприяючи нестабільності препарату, і насправді зменшуючи корисність комплектів для радіомічення в клінічних умовах.

Інші безуспішно намагались розробити комплекти для радіомічення антитіл, які були б достатньо досконалими, щоб відмовитись від окремого етапу очищення антитіл. Наприклад, CytoGen нещодавно випустив комерційний комплект для радіомічення мишачих моноклональних антитіл, спрямований на пухлина-асоційований глікопротеїн TAG-72, Однак антитіло CytoGen в певній мірі не відповідає рецептурі комплекту через тенденцію до створення мікрочастинок під час зберігання повинні бути видалені на етапі додаткової фільтрації. Більш того, антитіло CytoGen викликало у пацієнтів шкідливу реакцію через ЛАМА відповідь.

Інші заявили про розробку протоколів радіомічення, які можливо перетворити в формат комплекту, в якому окремих етап очистки буде непотрібний [Richardson et al. (1987) Optimization and batch production of DTPA-labeled antibody kits for routine use in  $^{111}\text{In}$  immunoscintigraphy. *Nuc. Med. Commun.* 8: 347-356; Chinol and Hnatowich (1987) Generator-produced yttrium-[90] for radioimmunotherapy. *J. Nucl. Med.* 28(9): 1465-1470]. Однак у таких протоколах не було досягнуто такого рівня зв'язування, якого автори винаходу досягли,

використовуючи описані тут протоколи, які включають ефективність зв'язування принаймні 95%. Такий рівень зв'язування забезпечує додаткову перевагу щодо підвищення безпеки, яка полягає в тому, що завдяки низькому зв'язуванню радіонуклідів незв'язана мітка фактично не буде введена пацієнту.

Згідно з протоколами, включеними в комплекти даного винаходу, можна проводити швидке мічення, яке може бути проведено приблизно за півгодини або, в залежності від мітки, всього за 5 хвилин. Більш того, протоколи комплексу даного винаходу мають ефективність мічення більше 95%, таким чином, не виникає потреби в подальшому очищенні. Без необхідності подальшої очистки, період напіврозпаду радіомітки і неущкодженість антитіла зберігаються для досягнення тої терапевтичної мети, для якої воно було мічене.

У даному винаході описані зручні комплекти і способи, за допомогою яких діагностичні і терапевтичні антитіла можуть бути мічені радіоактивною міткою і введені пацієнту відтворюваним, надійним і зручним способом. Комплекти даного винаходу трансформують процес радіомічення антитіл в безперешкодний, надійний, стандартизований процес, який значно полегшує протоколи лікування хворого. Даний комплект має переваги над попередніми, які полягають в тому, що були визначені оптимальні параметри мічення і терапевтичного та діагностичного введення, таким чином зменшуючи вартість виробів. Завдяки тому, що описаний тут комплект забезпечує оптимальні параметри, відповідні індивідуальній мітці, використання комплекту, розробленого для індивідуальної мітки, буде також зводити до мінімуму розукомплектування, яке відбувається, коли невідповідний комплект використовується для індивідуальної мітки. Уникнення розукомплектування, в свою чергу, також забезпечує оптимальну ефективність мічення. Більш того, протоколи і стерильні апірогенні речовини, включені в кожний комплект, сприяють зручнішому для використання процесу, тому що тестування стерильності, пірогенності та очищення реагентів після мічення не потрібні.

Даний винахід включає комплект для мічення радіоактивною міткою діагностичних або терапевтичних антитіл перед їх введенням пацієнту, який містить принаймні (i) пляшечку, яка містить комплексон-кон'юговане антитіло, (ii) пляшечку, яка містить підібраний буфер для стабілізації та введення радіоміченого антитіла, і (iii) інструкції для мічення антитіла, де названі компоненти в пляшечках поставляються в таких кількостях і таких концентраціях, що коли вони поєднуються з радіоактивною міткою достатньої чистоти і активності, відповідно до інструкцій комплекту, то подальша очистка міченого антитіла не потрібна перед введенням названому пацієнту. Більш того, коли антитіло мітило відповідно до інструкцій комплекту і з радіоізотопом достатньої чистоти і активності, то таке зв'язування ізотопу може сягати рівнів вище, ніж 95% і навіть до 98% або вище.

Найкраще, якщо антитіло, включене в комплект, є анти-CD20 антитілом. Антитіло поставляється в формі, де воно є приєднаним до біфункціонального комплексону. Краще, коли антитіло зв'язано з МХ-ДТПК, але можуть бути використані інші комплексони, такі як феніл- або бензил-кон'юговані ДТПК, циклогексил-ДТПК, похідні EDTA і DOTA. Згідно з даним винаходом, комплексоном може бути будь-який комплексон, який є принаймні біфункціональним, тобто який має принаймні два місця зв'язування (принаймні одне місце для утворення комплексу з іоном металу і принаймні одне місце для з'єднання з білковим лігандом).

В залежності від використаного антитіла, кон'юговане антитіло типово поставляється в концентрації від 0,5 до 30 мг/мл, найкраще 2 мг/мл. Об'єм кон'югованого антитіла буде залежати від концентрації і кількості, які необхідні для оптимального мічення в залежності від радіомітки. Однак кон'юговане антитіло повинно поставлятися в такому об'ємі і концентрації, щоб весь об'єм був доданий до реакційної пляшечки, використовуючи стерильний шприц і асептичну техніку. Це буде передбачати підвищену відтворюваність і легкість використання. Всі реагенти комплекту, описані тут, є стерильними, апірогенними і спеціально спроектовані для простоти і швидкості в просуванні прямо від тестування антитіла до введення. З деякими мітками необхідність тестування ефективності мічення може бути непотрібною.

Особливо сприятливим компонентом комплекту є підібраний буфер для стабілізації проти ефектів радіолізу і введення мічених кон'югованих антитіл пацієнту. Підібраний буфер є фармацевтично прийнятним носієм, який служить як розчинником для міченого антитіла, так і буфером введення. Хоча будь-який фармацевтично прийнятний розчинник може бути використаний для введення терапевтичних або діагностичних антитіл пацієнту, підібраний буфер даного винаходу є особливо підходящим для введення мічених радіоактивною міткою антитіл.

Наприклад, підібраний буфер даного винаходу містить радіопротектор, такий як людський сироватковий альбумін (ЛСА) або аскорбат, який мінімізує радіоліз від ітрію і в меншій мірі від індію. Інші радіопротектори, відомі в галузі, тобто поглиначі вільних радикалів (феноли, сульфіти, глутатон, цистеїн, гентизинова кислота, нікотинова кислота, аскорбіл пальмітат,  $\text{HO}(\text{:O})\text{H}_2$ , гліцерин, натрій формальдегід сульфоксилат,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , і  $\text{SO}_2$ , та інше) також можуть бути використані в підбраному буфері даного винаходу.

Слід зазначити, що в той час, як радіопротектори звичайно використовуються в підбраному буфері для захисту антитіл від радіолізу, можливо, що можна буде впливати на подальший захист включенням радіопротектору також в реакційний буфер. Взагалі цього раніше не робили, наприклад, з ЛСА, через присутність металів, які будуть перешкоджати процесу мічення. Однак використовуючи хелатні смоли, можливо "очистити" ЛСА так, щоб ЛСА міг би бути включеним також і в реакційний буфер. Аскорбат або інші радіопротектори можуть також потребувати обробки для видалення забруднюючих металів.

Підібраний буфер даного винаходу також містить надлишок некон'югованого комплексону. Метою включення некон'югованого комплексону є те, що цей комплексон служить для поглинання будь-яких не зв'язаних с білком радіоміток у пацієнта і впливати на виділення радіоміток, таким чином зменшуючи накопичення у кістках пацієнта "остеотропних" ізотопів, тобто  $^{90}\text{Y}$ . Наприклад, коли антитіло комплекту кон'юговане з ДТПК комплексоном, надлишок ДТПК або будь-якого іншого комплексону може бути включений в підібраний буфер. Підібраний буфер також найкраще поставляти в такому об'ємі, щоб весь вміст був перенесений в реакційну пляшечку. Як обговорювалось вище, це призводить до підвищеної легкості використання і відтворюваності через те, що точні об'єми не треба відмірювати і переносити.

Найкращий підібраний буфер містить забуферений фосфатом або фізіологічний сольовий розчин, людський сироватковий альбумін і ДТПК. Кращою концентрацією людського сироваткового альбуміну є від приблизно 1% до 25% (вага/об'єм), і найкращою - приблизно 7,5% (вага/об'єм). Найкращою концентрацією ДТПК є приблизно 1 мМ. Аскорбат може бути використаний як альтернатива людському сироватковому

альбуміну і типово використовується в концентрації приблизно від 1 до 100мг/мл. Хоча може бути використаний більш широкий діапазон концентрацій без компромісу щодо безпеки пацієнта.

Антитіло комплексу радіомічення легко мітиться обраним радіоактивним ізотопом за допомогою біфункціонального комплексону відповідно до способів даного винаходу. В цьому контексті, для подальшого спрощення комплект даного винаходу може також включати пляшечку, яка містить буфер для регулювання pH розчину радіоізоотопу, і стерильну скляну реакційну пляшечку для виконання мічення і після цього для поміщення остаточно міченого антитіла в підібраний буфер. Типово достатньо реакційної пляшечки об'ємом 10мл, але також можуть бути використані пляшечки, які вміщають від 5 до 20мл. Найкращий буфер - це розчин ацетату натрію з низьким вмістом металу в концентрації від 10 до 1000мМ, найкраще 50мМ.

Конкретний комплект даного винаходу містить антитіло, кон'юговане з МХ-ДТПК, 2В8-МХ-ДТПК. 2В8 - це анти-CD20 антитіло, яке виявило вплив на вичерпання В-клітин при введенні хворим на лімфому. Однак, спеціалісту повинно бути очевидним те, що комплект радіомічення даного винаходу може бути оптимізований для радіомічення інших анти-CD20 антитіл або будь-якого іншого антитіла, яке було кон'юговано з ДТПК або іншим полівалентним комплексом. Найкращий комплект даного винаходу може містити принаймні (i) пляшечку, яка містить МХ-ДТПК-кон'юговане 2В8 антитіло, в розчині або ліофілізоване (потребує розведення); і (ii) пляшечку, яка містить підібраний буфер для введення радіоміченого антитіла пацієнту. Найкращий комплект буде також містити (iii) буфер для регулювання pH ізотопу і (iv) реакційну пляшечку. Альтернативно, ще краще, якщо буфер поставляється в реакційній пляшечці, таким чином уникаючи етапу відмірювання і переносу буферу і підвищуючи простоту, послідовність і стерильність компонентів комплексу. Однак, можна собі уявити інші втілення винаходу, тобто де буфер спочатку додають до ізотопної пляшечки і тоді ізотоп з буфером переноситься до реакційної пляшечки. В цьому випадку реакційна пляшечка може бути поставлена з необхідним об'ємом антитіла. Альтернативно, пляшечка ізотоп/буфер може бути зроблена достатньо великою для того, щоб постачати додаток кон'югату антитіла, тобто прямо до пляшечки постачальника. Це дозволило би виключити необхідність реакційної пляшечки.

Як описано вище, інша найкраща конфігурація комплексу здійснюється так, що реакційна пляшечка сама по собі містить необхідний об'єм кон'югованого антитіла (тобто, 1 або 1,5мл для  $^{111}\text{In}$  і  $^{90}\text{Y}$ , відповідно). Антитіло може бути поставлено в буфері, що забезпечує підходяще pH радіомічення відповідно до індивідуального бажаного ізотопу (тобто, pH 3-6 для  $^{111}\text{In}$ , pH 3-5 для  $^{90}\text{Y}$ ). В залежності від ізотопу, можуть бути використані різні буфери (тобто, ацетат натрію для  $^{90}\text{Y}$ , цитрат натрію для  $^{111}\text{In}$ ). Склад і pH буферу можуть також змінюватись в залежності від природи ліганду зв'язування, в який необхідно ввести мітку (тобто, мічення пептидів може дозволяти використання <pH 3). Тоді по суті ізотоп переносився би прямо до реакційної пляшечки, як і підібраний буфер. Обмеження використання комплексу двома етапами переносу додатково збільшило би відтвореність і простоту та додатково зменшило би шанс забруднення стерильних препаратів під час маніпуляції компонентами комплексу.

Комплекти радіомічення даного винаходу можуть додатково містити пляшечку радіоізоотопу, або радіоізоотоп може бути замовлений окремо від підходящого постачальника. Кращими радіоізоотопами даного винаходу є  $^{111}\text{In}$  хлорид і  $^{90}\text{Y}$  хлорид в HCl, хоча розкриті методи не обмежені цими ізотопами. Інші радіонукліди, що були використані з метою відображення пухлин, відомі в галузі, тобто, як описано в [Патенті США Nos. 4,634,586, 5,460,785 і 5,766,571], які наведені тут як посилання. Індій-[111] має особливі переваги при відображенні В-клітинних пухлин, і бета-емітери, такі як  $^{90}\text{Y}$ , є особливо корисні в якості радіотерапевтичних агентів. Хоча інші радіоізотопи зручні для цих або інших цілей, тобто, альфа-емітери, можуть бути використані в залежності від комплексону, використаного для кон'югації антитіла.

За умови доведеної ефективності комбінованих терапевтичних режимів, розкритих в [Заявці США Serial No. 08/475,813], подальше втілення комплексу буде також включати окрему пляшечку химерного антитіла, тобто, Rituxan®, яке буде введено до або після радіоміченого анти-CD20 антитіла. Коли химерне антитіло вводиться до радіоміченого антитіла, ЛАМА відповідь, яка загалом може відбуватися у відповідь на введення мишачого анти-CD20 антитіла, може бути значно зменшена, таким чином підвищуючи терапевтичну корисність радіомічених мишачих антитіл. Більш того, коли химерні анти-CD20 застосовуються для видалення циркулюючих В-клітин, наступні діагностичні образи (зображення), отримані з  $^{111}\text{In}$ -міченими антитілами, можуть бути більш чіткими.

Також очевидно, що як діагностичне радіомічене антитіло, так і терапевтичне радіомічене антитіло, можуть бути використані разом в комбінованому терапевтичному режимі. В цьому випадку, діагностичне антитіло може бути використано до або після терапевтичного антитіла для візуалізації розміру пухлини до і після лікування. В цьому випадку комплект даного винаходу може включати окремі, можливо кодовані різними кольорами, пляшечки з індивідуально підібраними буферами відповідно до вимог оптимального pH для радіомічення антитіл індивідуальними ізотопами, які необхідно використати. Така система давала би гарантію, що підходящий буфер був використаний для кожної мітки і надавала би клініцисту однакову легкість в радіоміченні двох антитіл, як яки були куплені два комплекти. Такий комплект по ефективності поєднує компоненти двох комплектів в один.

Компоненти комплексу радіомічення даного винаходу поставляються в підходящих концентраціях і pH, так що стерильність легко підтримується до введення антитіла і існує невелика потреба в додаткових буферах або середовищах. Однак, спеціалісту повинно бути очевидно, що деякі реагенти можуть бути приготовані, стерилізовані і тестовані на стерильність на місці. Таким чином, можна уявити варіації комплексу винаходу в залежності від бюджету та переваг споживача.

Комплект радіомічення даного винаходу може бути використаний в методі радіомічення комплексон-кон'югованих антитіл для введення пацієнту. Відповідно до даного винаходу, такий метод, загалом, включає (i) змішування комплексон-кон'югованих антитіл з розчином, який містить радіоізоотоп; (ii) витримка суміші потрібний час при відповідній температурі; і (iii) розведення міченого антитіла до відповідної концентрації в підбраному буфері, такому що радіомічене антитіло може бути прямо введено пацієнту без подальшої очістки.

Найкраще, коли антитіло - це анти-CD20 антитіло, і зокрема, анти-CD20 антитіло може бути 2В8,

Антитіло може бути кон'юговане з будь-яким підходящим комплексом, тобто, МХ-ДТПК, СНХ-ДТПК, феніл- або бензил-ДТПК, DOTA, EDTA похідними, та ін. МХ-ДТПК є найкращим. Методи впливу на кон'югацію антитіла відомі в галузі [Kozak et al. (1989); Mirzadeh et al. (1990), Brachbiel et al. (1986)].

Автори винаходу винайшли, що метод радіомічення комплексон-кон'югованого антитіла працює найкраще там, де розчин, який містить радіомітку, має рН, встановлене між, приблизно, 3,0 і 6,0, найкраще 4,2, перед змішуванням з комплексон-кон'югованим антитілом. Найкращим для регулювання рН є ацетат натрію з низьким вмістом металу. Найкраща концентрація ацетату натрію знаходиться в діапазоні між 10 та 1000мМ, найкраще 50мМ.

Коли радіоізотопом є  $^{111}\text{In}$  хлорид, то об'ємна кількість  $^{111}\text{In}$  хлориду, яку слід використати для приготування однієї дози для введення, є типово приблизно 5,5мКі, поділене на концентрацію радіоактивності під час мічення. Типова діагностична доза  $^{111}\text{In}$  для введення пацієнту складає приблизно від 2 до 10мКі. Кількість ацетату натрію, використаного для регулювання рН, відрізняється в залежності від концентрації ацетату натрію і розчину носію ізотопу, і може, таким чином, знаходитись в широкому інтервалі. Коли концентрація ацетату натрію є 50мМ, кількість, потрібна для регулювання рН, складає типово 1,2 об'ємної кількості  $^{111}\text{In}$  хлориду, хоча можуть бути використані більші об'єми. Слід розуміти, що відношення кількостей ацетату натрію та  $\text{HCl}$  є дуже важливою величиною, і кількість ацетату натрію буде змінюватись в залежності від кількості і концентрації  $\text{HCl}$  в буфері. Тоді приблизно 1мл комплексон-кон'югованого антитіла в концентрації приблизно 2мг/мл змішують з ацетатним розчином радіомітки і суміш витримують приблизно 30 хвилин або час, достатній для досягнення оптимального мічення антитіла. Цей час може знаходитись в діапазоні від 30 секунд до 60 хвилин. Тоді додають підібраний буфер в кількості, необхідній для досягнення загального кінцевого об'єму 10мл.

Оптимальний час, необхідний для мічення антитіла, може змінюватись в залежності від використаних антитіла, індивідуальної радіомітки і індивідуального кон'югату. Головним фактором оптимізації часу, виділеного для радіомічення, є співвідношення комплексону і антитіла в реагенті, який повинен бути міченим. Наприклад, відношення комплексону до антитіла повинне бути достатньо великим для досягнення терапевтично корисного рівня з'єднання, тобто від 90 до 95%, в залежності від радіоізотопу, але в той же час не повинно бути настільки великим, щоб піддавати загрозі структурну цілісність або імунореактивність антитіла. Це потребує певного врівноваження процесу, що в деяких випадках може вести до знижених рівнів кон'югованого комплексону і більшого часу мічення.

Наприклад, для 2В8 і МХ-ДТПК було показано, що мічення може бути закінчено протягом п'яти хвилин для  $^{90}\text{Y}$  і протягом 30 хвилин для  $^{111}\text{In}$  для досягнення бажаного рівня з'єднання ізотопу при молярному співвідношенні комплексону до антитіла лише від  $1\frac{1}{2}$  до 1. Таким чином, нема потреби збільшувати співвідношення комплексону до антитіла, тому що був досягнутий бажаний рівень зв'язування ізотопу. Більш того, не було ніяких переваг в збільшенні кількості кон'югованого комплексону, тому що це могло вплинути на імунореактивність антитіла. Такі параметри можуть бути визначені емпірично для інших антитіл при розробці комплектів, таких як комплект, описаний в даному винаході.

Коли радіоізотопом є  $^{90}\text{Y}$  хлорид, то об'ємна кількість  $^{90}\text{Y}$  хлориду, яку слід використати для приготування однієї дози для введення, є типово приблизно від 10 до 50мКі, найкраще 45мКі, яку поділено на концентрацію радіоактивності під час мічення. Кількість ацетату натрію, використаного для регулювання рН, відрізняється в залежності від концентрації ацетату натрію і розчину носію ізотопу, і може, таким чином, знаходитись в широкому інтервалі. Коли концентрація ацетату натрію є 50мМ, і  $^{90}\text{Y}$  поставляється в 50мМ  $\text{HCl}$ , кількість, потрібна для регулювання рН, складає типово 1,2 об'ємної кількості використаного  $^{90}\text{Y}$  хлориду. Тоді приблизно 1,5мл комплексон-кон'югованого антитіла в концентрації приблизно 2мг/мл змішують з ацетатним розчином радіомітки, і суміш витримують приблизно 5 хвилин або час, достатній для досягнення оптимального мічення антитіла. Цей час може знаходитись в діапазоні від 30 секунд до 60 хвилин. Тоді додають підібраний буфер в кількості, необхідній для досягнення загального кінцевого об'єму 10мл.

Найкраще метод радіомічення винаходу виконується при використанні описаного тут комплекту радіомічення. Однак, для спеціаліста в галузі повинно бути очевидним, що найкращі компоненти і умови - це тільки прийнятні керуючі принципи використання способу винаходу, і вони можуть бути змінені до деякої міри відповідною оптимізацією. Умови, які відхиляються від найкращих умов, але все ще досягають цілі способу, розглядаються як ті, що знаходяться в межах винаходу.

Комплект радіомічення даного винаходу може також поставлятися з реагентами, підходящими для зручної перевірки спорідненості зв'язування антитіла після радіомічення. В такому випадку комплект винаходу також може бути використаний для визначення відсотку зв'язування радіоміченого антитіла з його цільовою клітиною перед введенням антитіла пацієнту. Автори винаходу також визначили, що конкретний описаний комплект аналізу зв'язування може бути корисним для тестування спорідненості будь-якого антитіла, для якого, загалом, нема в наявності очищеного антигену. Відповідно, компоненти аналізу зв'язування можуть бути продані як окремий комплект.

Взагалі, комплект радіомічення і аналізу зв'язування містить (i) принаймні одну пляшечку ліофілізованих клітин, які експресують антиген, який розпізнається антитілом комплекту; (ii) пляшечку, яка містить комплексон-кон'юговане антитіло; (iii) пляшечку, яка містить підібраний буфер, і (iv) такі інструкції з радіомічення антитіла, що радіомічене антитіло може бути введено прямо пацієнту без необхідності наступного очищення. Як і описаний вище комплект радіомічення, цей комплект також може включати пляшечку, яка містить буфер для регулювання рН радіоізотопу і стерильну скляну реакційну пляшечку. Найкращим буфером є розчин ацетату натрію з низьким вмістом металу з концентрацією між приблизно 10 і 1000мМ, і скляна реакційна пляшечка, що вміщує об'єм принаймні 5мл. Найкращим антитілом є анти-CD20 антитіло, і найкращим комплексом є МХ-ДТПК. Можуть бути використані інші комплекси, як описано раніше. Найкращим кон'югованим антитілом є 2В8-МХ-ДТПК, хоча може бути мічене будь-яке комплексон-кон'юговане антитіло і визначена його спорідненість. Підібраний буфер - це забуферений фосфатом сольовий розчин, який містить радіопротектор і некон'югований комплексон, як описано вище, і радіоізотоп може бути або може не бути включеним, і найкращими ізотопами є  $^{111}\text{In}$  хлорид або  $^{90}\text{Y}$  хлорид. В залежності від комплексону можуть бути використані інші радіоізотопи.

Різниця між комплектом аналізу зв'язування/радіомічення і комплектом радіомічення, який описаний вище, є включення антиген-позитивних клітин, які служать як цільовий субстрат для тестування спорідненості антитіла. Коли антигеном є CD20, то найкращими CD20-позитивними клітинами є SB клітини (ATCC # CCL 120), але можуть бути використані будь-які CD20-позитивні клітини, комплект аналізу зв'язування і радіомічення може в подальшому включати антиген-негативні клітини для використання в якості негативного контролю. Найкращими CD20-негативними клітинами є HSB клітини (ATCC # CCL 120,1), але можуть бути використані будь-які CD20-негативні клітини.

Зрозуміло, що комплект радіомічення і аналізу зв'язування може в подальшому містити пляшечку химерного анти-CD20 антитіла на додаток до антитіла, яке необхідно мітити, з метою посилення комбінованого терапевтичного режиму, або для кліренсу периферійних В-клітин перед отриманням діагностичного зображення. Таким окремим найкращим антитілом є Rituxan®, але може бути будь-яке антитіло, яке показало ефективне знищення пухлинних клітин. Фактично, два різні типи антитіл можна об'єднати в один комплект, тобто антитіла, спрямовані до двох різних антигенів В-клітини, за умови, що комбінований терапевтичний режим спрямований на один тип клітин, тобто В-клітинну лімфому.

Так само, як компоненти комплекту можна використати для мічення інших антитіл, інші клітини для тестування спорідненості антитіла можна приготувати в залежності від цільового антигену. Однак для анти-CD20 антитіл, комплект аналізу зв'язування і радіомічення цього винаходу є особливо підходящим для комерційного набору, в якому цільові клітини поставляються в ліофілізованій формі. Це дозволяє виконувати контроль ефективності антитіла просто і систематично і уникнути труднощів та витрат на підтримання лабораторій культур тканин. Загалом, ліофілізовані клітини поставляються в аліквотах між  $0,5$  і  $500 \times 10^6$  клітин на пляшечку, відповідно до способів винаходу.

Можливо, що конкретна лабораторія буде віддавати перевагу замовленню антитіл, які вже були радіомічені, в такому випадку такої лабораторії потрібні реагенти аналізу зв'язування для того, щоб мати впевненість, що антитіла зберігають цільову спорідненість. В цьому випадку, даний винахід також передбачає комплект аналізу зв'язування для визначення відсотку зв'язування радіомічених антитіл з їх цільовою клітиною. Такий комплект включає принаймні одну пляшечку фіксованих і/або ліофілізованих антиген-позитивних клітин і може не обов'язково містити антиген-негативні клітини, як описано вище для комплекту аналізу зв'язування і радіомічення. Більш того, очевидно, варіанти такого комплекту можуть включати немічене контрольне антитіло для перевірки специфічності зв'язування антитіла споживача методом конкурентного аналізу.

Знову, коли антиген - це CD20, то найкращі CD20-позитивні клітини - це SB клітини (ATCC # CCL 120), а найкращі CD20-негативні клітини - це HSB клітини (ATCC # CCL 120,1), які поставляються в ліофілізованій формі в аліквотах між  $0,5$  і  $50 \times 10^6$  клітин. В цьому випадку найкращим антитілом є МХ-ДТПК кон'югат 2В8, мічений  $^{111}\text{In}$  або  $^{90}\text{Y}$ .

З точки зору розкритих тут додаткових втілень комплекту, слід наголосити, що однією з переваг комплекту радіомічення і способу даного винаходу є те, що подальший етап очистки є непотрібним і радіомічене антитіло може бути введено прямо пацієнту, таким чином зберігається цінний час і збільшується стабільність антитіла. Внаслідок цього слід підкреслити, що поки для клініцистів може бути бажаним тестувати або перевіряти специфічність зв'язування і спорідненість радіомічених антитіл перед введенням, такий тест може бути неминучим з індивідуальними ізотопами, якщо стабільність антитіла і інгібування радіолізу є дуже важливими, так само, як з ітрієм. Забезпечуючи втілення комплекту, де спорідненість зв'язування і специфічність можна тестувати, автори винаходу ніяким чином не припускають, що такі тести абсолютно необхідні в способах або комплектах винаходу. Можливість тестувати такі важливі параметри антитіл в цілому залежить від вибору клініциста.

Автори винаходу також визначили, що спосіб, використаний для приготування фіксованих та ліофілізованих клітин для комплектів аналізу зв'язування даного винаходу є особливо зручним для приготування клітин для комерційних комплектів. Клітини можуть бути фіксовані до ліофілізації для покращення структури/стабільності. Зокрема, клітини даного винаходу демонструють високу відтворюваність, коли використовуються для аналізів зв'язування антитіла.

Зокрема, даний винахід включає спосіб приготування ліофілізованих клітин, який включає (i) збір клітин центрифугуванням при щільності клітин від  $0,5$  до  $2 \times 10^6$  клітин на мл; (ii) відмивку клітин принаймні один раз в збалансованому сольовому розчині, тобто, HBSS; (iii) повторне суспендування зібраних клітин в буфері ліофілізації, який містить збалансований сольовий розчин, білок носій і принаймні один тип цукру; (iv) розподіл аліквот повторно суспендованих клітин в пробірці мікроцентрифуги або скляну пляшечку; і (v) ліофілізація клітин 12-96 годин і найкраще 24-72 години при 30-60 мілітор. Спосіб є особливо зручним для приготування ліофілізованих клітин, де названі клітини - це SB клітини (ATCC # CCL 120) або HSB клітини (ATCC # CCL 120,1), але може бути придатним також для інших типів В-клітин.

Найкращий буфер, загалом, містить бичачий сироватковий альбумін, як білок - носій, в концентрації 1% (вага/об'єм), і маніт в концентрації 10%. Однак, ймовірно, можливе використання інших білків-носіїв, тобто ЛСА, і інших цукрів. Клітини збирають центрифугуванням при швидкості приблизно 1300 обертів на хвилину, і додають сольовий розчин HBSS (збалансований сольовий розчин Хенка). Загалом клітини повторно суспендують в концентрації  $50 \times 10^6$  клітин на мл. Однак для спеціаліста в галузі очевидно, що наведені вище умови можуть бути злегка модифікованими без значного компромісу щодо життєздатності клітин. Більш того, наведені вище умови можуть бути доповнені додатковими процедурами, розробленими для оптимізації процесу для більших кількостей клітин, наприклад, діалізацією в тангенціальному потоці для переведення клітин в буфер ліофілізації.

Комплект аналізу зв'язування даного винаходу може бути використаний в аналізі для визначення спорідненості зв'язування радіоміченого антитіла. Такий аналіз також є предметом даного винаходу. Аналіз зв'язування для визначення відсотку зв'язування радіоміченого антитіла з його цільовою клітиною загалом містить наступні етапи: (i) змішування принаймні однієї аліквоти радіоміченого антитіла з принаймні однією аліквотою антиген-позитивних клітин; (ii) змішування принаймні однієї аліквоти радіоміченого антитіла, ідентичного аліквоті етапу (i), з принаймні однією аліквотою буферу розведення такого ж об'єму, як аліквота

антиген-позитивних клітин в етапі (i) як контроль; (iii) збирання клітин центрифугуванням; (iv) вимірювання радіоактивності в надосадовій рідині зібраних клітин і контролю; і (v) порівняння кількості радіоактивності В-клітинної надосадової рідини з кількістю радіоактивності в контролі.

Оскільки комплекти радіомічення даного винаходу звичайно містять  $^{111}\text{In}$  хлорид або  $^{90}\text{Y}$  хлорид, аналіз зв'язування даного винаходу типово виконується з антитілами, міченими  $^{111}\text{In}$  або  $^{90}\text{Y}$ . Коли міткою є  $^{111}\text{In}$ , радіоактивність в пробірках аналізу вимірюють за допомогою гамма-лічильника. Коли міткою є  $^{90}\text{Y}$ , радіоактивність вимірюють за допомогою сцинтиляційного лічильника, хоча можна використати і гамма-лічильник.

Для аналізу зв'язування даного винаходу найкращим антитілом є анти-CD20 антитіло, і найкращим анти-CD20 антитілом є 2B8, де антитіло 2B8 мітиться використовуючи комплект радіомічення даного винаходу. Однак, будь-яке радіомічене антитіло може бути тестовано за умов наявності клітин, які експресують специфічний антиген. Коли CD20 є антигеном, то найкращими клітинами для виконання аналізу є SB клітини (ATCC # CCL 120), однак, аналіз також може бути оптимізованим і виконуватись з будь-яким радіоміченим антитілом і відповідною цільовою клітиною.

Буфер розведення, використаний для аналізу, повинен підтримувати зв'язування антитіла, тобто фізіологічний буфер, який можливо містить білок-носії, наприклад, БСА, для мінімізації неспецифічного зв'язування з клітинами. Хоча пробірка з буфером розведення служить як контроль, додатковий контроль з використанням антиген-негативних клітин може бути включеним в аналіз. В цьому випадку аналіз зв'язування містить додатково наступні етапи: (i) змішування принаймні однієї аліквоти радіоміченого антитіла з принаймні однією аліквотою антиген-негативних позитивних клітин; (ii) збирання антиген-негативних клітин центрифугуванням; (iv) вимірювання радіоактивності в надосадовій рідині зібраних антиген-негативних клітин; і (v) порівняння кількості радіоактивності в антиген-негативній клітинній надосадовій рідині з кількістю радіоактивності в антиген-позитивній клітинній надосадовій рідині і в контролі. Порівняння радіоактивності, отриманої з цієї пробірки, з контрольним буфером розведення, буде служити як міра кількості неспецифічного зв'язування з антиген-позитивними клітинами. Коли CD20 є антигеном і CD20-позитивними клітинами є SB клітини, то найкращими CD20-негативними клітинами є HSB клітини (ATCC # CCL 120,1).

Як описано вище, ліофілізовані клітини даного винаходу забезпечують простий, ефективний і відтворюваний стандарт тестування ефективності зв'язування радіомічених антитіл. Отже, аналіз зв'язування даного винаходу найкраще виконується, використовуючи ліофілізовані клітини, включені в комплект аналізу зв'язування даного винаходу. Додатково, аналізи радіомічення даного винаходу можна комбінувати з аналізами зв'язування даного винаходу, де антитіло спочатку мітиться способом мічення комплексон-кон'югованого антитіла, як описано в даному винаході. Ще краще аналіз зв'язування даного винаходу виконувати, використовуючи один з описаних тут комплексів аналізу зв'язування і радіомічення.

Можуть існувати деякі приклади, коли спорідненість антитіл слід тестувати і перевіряти, але радіомітка ще не була приєднана. Наприклад, за деяких обставин може бути корисним тестувати спорідненість зв'язування антитіла перед радіоміченням. Для такого випадку даний винахід також здійснює конкурентний аналіз зв'язування для оцінки спорідненості зв'язування антитіла, що тестують, з цільовою клітиною, який містить (i) приготування рутеній-міченого контрольного антитіла, використовуючи відоме антитіло, специфічне до такого ж антигену; (ii) витримка зростаючих кількостей тест-антитіла і зростаючих кількостей неміченого контрольного антитіла з фіксованою концентрацією цільових клітин і слідовими кількостями рутеній-міченого антитіла, де кожна окрема концентрація тест-антитіла і кожна окрема концентрація контрольного антитіла знаходяться в окремих пробірках, відповідно; (iii) визначення кількості зв'язування в кожній реакційній пробірці, основане на відносній електрохемілюмінесценції (ЕХЛ), використовуючи апаратуру ORIGEN; і (iv) обчислення середньої величини спорідненості тест-антитіла. Середня величина спорідненості може бути обчислена з величин EC50 і відомих концентрацій слідового антитіла, використовуючи спосіб Мюллера (Muller) [J. Immunological Methods (1980) 34:345] або будь-який інший підходящий спосіб. Слід відмітити, що цей аналіз також може бути використаний для тестування спорідненості радіомічених антитіл або будь-якого антитіла, для якого антиген не може бути очищений і клітини необхідні як джерело антигену. Фіксовані, ліофілізовані клітини даного винаходу можуть бути використані як цільові клітини.

Коли виконується конкурентний аналіз зв'язування даного винаходу для тестування спорідненості анти-CD20 антитіл, контрольним антитілом може бути 2B8 або будь-яке інше некон'юговане анти-CD20 антитіло. Контрольне антитіло може бути комплексон-кон'югованим антитілом. Тест-антитіло також може бути комплексон-кон'югатом контрольного антитіла. Альтернативно, тест-антитіло може бути іншим анти-CD20 антитілом, чия спорідненість зв'язування з CD20 є цікавою в порівнянні з 2B8, Однак аналіз може бути адаптованим для використання з антитілами, які мають інші специфічності, за умов наявності підходящої цільової клітини.

В конкурентному аналізі зв'язування даного винаходу кращими цільовими клітинами є CD20-позитивні клітини, найкращими SB клітини, (ATCC # CCL 120), і найкращими є повторно суспендовані ліофілізовані SB клітини, приготовані відповідно до способу даного винаходу. Клітини, ліофілізовані за допомогою інших способів, або фіксовані клітини також можуть бути використані. Рутеній-мічене антитіло типово готують за допомогою процесу, який включає витримку контрольного антитіла з N-гідроксисукцинімідним ефіром рутеній (II) тріс-біпіридин комплексону (TAG-NHS), хоча, також, можна собі уявити інший відомий спосіб мічення антитіл. З метою мічення контрольне антитіло і TAG-NHS краще витримувати при молярному співвідношенні 1:15.

Ці та інші аспекти даного винаходу будуть краще зрозумілі з наведених далі малюнків, прикладів та опису винаходу.

Фігура 1. Імунореактивність природного 2B8 порівнювали з комерційно наявними анти-CD20 антитілами B1 (Coulter) і Leu 16 (Becton Dickinson) способом прямої конкуренції в радіоімунному аналізі, використовуючи  $^{125}\text{I}$ -мічений B1. Антиген-позитивні SB клітини (100,000) додавали до кожної лунки фільтрових планшетів V&P; 10нг радіоміченого B1 змішували з різними концентраціями неміченого конкуренту і суміш додавали до клітин. Антитіла інкубували з клітинами одну годину при кімнатній



температурі; визначення проводили тричі. Після цього лунки відмивали, сушили і визначали фільтр-асоційовану радіоактивність. Наведені дані коригували щодо радіоактивного фону і брали середнє арифметичне трьох вимірювань.

Фігура 2. Зростаючі кількості некон'югованих 2B8 аналізували на зв'язування з людськими В-клітинами (SB) використовуючи FACS аналіз. Порівняння робили з комерційно наявним анти-CD20 моноклональним антитілом (B1) і з двома антитілами стороннього ізотипу. Цапінний анти-мишачий IgG-FITC F(ab)<sub>2</sub> використовували як вторинний реагент. Результати показують, що 2B8 є специфічним до CD20 антигену і що воно проявляє більше зв'язування, ніж B1.

Фігура 3. Людські В-клітини (SB) інкубували зі зростаючими кількостями <sup>125</sup>I-міченого 2B8, Три зразки інкубували одну годину і визначали радіоактивність, зв'язану з клітинами після фільтрації для збору клітин. Аналіз Скетчарда дозволив обчислити уявну константу спорідненості  $4,3 \times 10^{-9} \text{ M}$ .

Фігура 4. Імунореактивність природних 2B8, 2B8-MX-ДТПК і B1. Антитіло B1 мітили, як описано в розділі "Способи". Десять нанограм радіоміченого B1 змішували зі зростаючими концентраціями конкуренту і суміш додавали в лунки фільтрових пластин V&P, які містили 100,000 антиген-позитивних SB клітин кожна; всі вимірювання проводили тричі. Після однієї години інкубації при кімнатній температурі клітини ретельно відмивали. Після цього фільтри сушили і асоційовану радіоактивність вимірювали гамма-лічильником; всі величини коригували щодо фону. Наведені величини є середнім арифметичним з трьох вимірювань.

Фігура 5. Антитіло 2B8 було взято в кінцевій концентрації 10мг/мл в нормальному фізіологічному розчині або в нормальному фізіологічному розчині, який містив 10мМ гліцин-HCl, pH 6,8, Потім подвійний набір зразків помістили в пляшечки з гвинтовими кришечками, пляшечки продули азотом і закрили. Потім зразки інкубували 12 тижнів при температурі 4°C або 30°C; імунореактивність зразків оцінювали раз на тиждень. Не спостерігалось втрати імунореактивності жодним з зразків 2B8 протягом 12-тижневого вивчення. На малюнку зображені імунореактивності для 1 (Фіг.5А), 6 (Фіг.5Б) і 12 (Фіг.5В) тижнів.

Фігура 6. Аналіз зв'язування для визначення імунореактивності <sup>111</sup>In-міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого в PBS, pH 7,4, який містить 50мг/мл людського сироваткового альбуміну (48-годинна інкубація).

Фігура 6А. Незмінну кількість радіоміченого антитіла (5нг/мл) інкубували з зростаючими об'ємами SB клітин ( $20 \times 10^6$  клітин/мл). Кількість радіоактивності (срт, р/хв), зв'язаної з клітинами, викреслювали проти об'єму доданої суспензії клітин.

Фігура 6Б. На малюнку зображено відношення загальної взятої радіоактивності до зв'язаної радіоактивності (АТ/В). Лінійна екстраполяція дозволила обчислити перетинання осі у (0,997). Обернене число перетинання осі у Х 100 дало величину імунореактивності 100% при нескінченному надлишку антигену.

Фігура 7. Ауторадіограми, отримані з SDS-PAGE аналізу <sup>90</sup>Y-міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при 4°C в PBS, pH 7,4, який містить 75мг/мл людського сироваткового альбуміну і 1мМ ДТПК. В показаний час зразки піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови, денатуруючі умови (SDS). Зразки наносили по 5мкл (треки 1, 2) і 10мкл (треки 5, 6). Гелі експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі та фотографували.

Фігура 8. Денситометричне сканування ауторадіограми нульового часу, отриманої з SDS-PAGE аналізу <sup>90</sup>Y-міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при 4°C в PBS, pH 7,4, який містить 75мг/мл людського сироваткового альбуміну і 1мМ ДТПК. Зразки піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#2) дорівнювала 96,2%.

Фігура 9. Денситометричне сканування ауторадіограми 48 годин, отриманої з SDS-PAGE аналізу <sup>90</sup>Y-міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при 4°C в PBS, pH 7,4, який містить 75мг/мл людського сироваткового альбуміну і 1мМ ДТПК. Зразок піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#2) дорівнювала 95,5%.

Фігура 10. Ауторадіограми, отримані з SDS-PAGE аналізу <sup>111</sup>In-міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при 4°C в PBS, pH 7,4, який містить 50мг/мл людського сироваткового альбуміну. В показаний час зразки піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл (треки 1, 2), 10мкл (треки 3, 4) і 20мкл (треки 5, 6). Гелі експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і фотографували. (Примітка: Ауторадіограму 48 годин отримували використовуючи посилюючий екран, що дає більш інтенсивний сигнал порівняно з ауторадіограмою нульового часу.)

Фігура 11. Денситометричне сканування ауторадіограми нульового часу, отриманої з SDS-PAGE аналізу <sup>111</sup>In-міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при 4°C в PBS, pH 7,4, який містить 50мг/мл людського сироваткового альбуміну. Зразок піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#3) дорівнювала 95,9%.

Фігура 12. Денситометричне сканування ауторадіограми 48 годин, отриманої з SDS-PAGE аналізу <sup>111</sup>In-міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при 4°C в PBS, pH 7,4, який містить 50мг/мл людського сироваткового альбуміну. Зразок піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа радіоміченого кон'югату дорівнювала 97,0% (об'єднані площі піків #2, 3 і 4).

Фігура 13. Ауторадіограми, отримані з SDS-PAGE аналізу <sup>90</sup>Y-міченого 2B8-MX-ДТПК інкубованого при 37°C в людській сироватці. В показаний час зразки піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі,

використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл (треки 1, 2), 10мкл (треки 3, 4) і 20мкл (треки 5, 6). Гелі експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і фотографували.

Фігура 14. Денситометричне сканування ауторадіограми нульового часу, отриманої з SDS-PAGE аналізу  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при 37°C в людській сироватці. Зразки піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#2) дорівнювала 97,9%.

Фігура 15. Денситометричне сканування ауторадіограми 98 годин, отриманої з SDS-PAGE аналізу  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при 37°C в людській сироватці. Зразок піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#2) дорівнювала 94,7%.

Фігура 16. Ауторадіограми отримані з SDS-PAGE аналізу  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК інкубованого при 37°C в людській сироватці. В показаний час зразки піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл (треки 1, 2), 10мкл (треки 3, 4) і 20мкл (треки 5, 6). Гелі експонували до рентгенівської плівки приблизно 16-20 годин при кімнатній температурі і фотографували.

Фігура 17. Денситометричне сканування ауторадіограми нульового часу, отриманої з SDS-PAGE аналізу  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при 37°C в людській сироватці. Зразок піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 16-20 годин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#3) дорівнювала 95,3%.

Фігура 18. Денситометричне сканування ауторадіограми 96 годин, отриманої з SDS-PAGE аналізу  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при 37°C в людській сироватці. Зразок піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 16-20 годин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#3) дорівнювала 94,0%.

Фігура 19. Яванським макакам робили ін'єкції внутрішньовенно кожні 48 годин, всього сім ін'єкцій; введені кількості наведені на Фігурі. Рівні циркулюючих Т- і В-клітин визначали FACS аналізом, використовуючи анти-CP2 (Т-клітина), анти-Mo-IgG (2B8), анти-CD20 (Leu 16) і анти-людський-IgG (В-клітина). Не спостерігали ніякого впливу на рівні циркулюючих Т-клітин. (Група тварин V отримала одну дозу).

Фігура 20. За відновленням рівнів циркулюючих В-клітин у тварин, які отримали 2B8, спостерігали за допомогою FACS аналізу, використовуючи антитіла, мічені флуоресцентними мітками, коротко описані в описі до Фіг.19, Тварин у групах III і IV не спостерігалось тому, що їх умертвили на 13 день.

Фігура 21. Яванським макакам робили внутрішньовенні ін'єкції  $^{89}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК, який приготували, використовуючи 2B8-MX-ДТПК клінічної якості. Тварини отримували дозу кожні 48 годин в кількостях, наведених вище для семи доз. На 0, 2, 7, 10 і 14 дні мавпам пускали кров і оцінювали хімічну гематологію сироватки і рівні циркулюючих В-клітин (на 10 день сироватки не аналізували на вміст В-клітин). Окрім зменшення загальної кількості лімфоцитів у всіх тварин, виключаючи одну тварину в групі II, під час експерименту ніяких значних відхилень від норми не відмічали.

Фігура 22. Методом ELISA, який слідував за однократною ін'єкцією 10мг/кг в нульовий день, вивчали кліренс мишачих анти-CD20 антитіл 2B8 з яванських макак. Як показано на Фіг.22А, антитіло показало  $\beta$   $t_{1/2}$  величину приблизно через 4,5 дня. Кліренс 2B8 антитіла і його MX-ДТПК кон'югату із кровообігу мишей BALB/c показаний на Фіг.22Б. Мишам внутрішньовенно робили ін'єкцію 25мкг природного або кон'югованого 2B8 і протягом 264 годин після ін'єкції брали зразки крові в різні відрізки часу; потім сироватку аналізували імуноферментним аналізом, використовуючи SB клітини в якості агенту захвату. Як природне, так і кон'юговане антитіло показали величини кліренсу 8,75 днів.

Фігура 23. Кожна з двадцяти BALB/c мишей отримувала ін'єкцію 1,1мкКі радіоміченого кон'югату (100мл), розчиненого в PBS, pH 7,4, який містить 50мг/мл ЛСА. Групи, кожна з п'яти мишей, були вбиті на 1, 24, 48 і 72 години і потім кров і різні тканини приготували і аналізували на асоційовану радіоактивність.

Фігура 24. Кожна з двадцяти BALB/c мишей отримувала внутрішньовенно ін'єкцію приблизно 1,0мкКі (в 100мл) радіоміченого кон'югату, розчиненого в 1 X PBS, pH 7,4, який містить 75мг/мл людського сироваткового альбуміну і 1мМ МДПК. Групи, кожна з п'яти мишей, були вбиті через 1, 24, 48 і 72 години, і потім їх кров і різні тканини приготували і аналізували на асоційовану радіоактивність.

Фігура 25. Безтимусні миші, які мають В-клітинні пухлини Ramos, отримували внутрішньовенно ін'єкцію 24 мкКі  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-ДТПК і групи, кожна з трьох мишей, були вбиті через 0, 24, 48 і 72 години. Після приготування тканини і визначення асоційованої радіоактивності величини відсотка введеної дози на грам тканини були визначені та побудовано вказану криву.

Фігура 26. Аналіз зв'язування для визначення імунореактивності "mix&shoot" («змішай-і-отримай»)  $^{90}\text{Y}$ -міченої 2B8-MX-ДТПК системи, інкубованої в PBS, pH 7,4, яка містить 50-75мг/мл людського сироваткового альбуміну (інкубація 48 годин).

Панель А. Незмінну кількість  $^{90}\text{Y}$ -міченого антитіла (приблизно 1нг/мл) інкубували із зростаючими кількостями SB клітин. Кількість радіоактивності (р/хв.), зв'язаної з клітинами, відкладали на графіку як функцію концентрації клітин.

Панель Б. Загальна введена радіоактивність  $^{90}\text{Y}$  була представлена в залежності від зв'язаної радіоактивності (АТ/В). Лінійна екстраполяція дозволила обчислити точку перетину з віссю Y (1,139). Обернене значення Y в точці перетину X 100 дає величину імунореактивності 87,9% при нескінченному

надлишку антигену. Ніякого зв'язування не спостерігали з CD20-негативними клітинами (HSB).

Фігура 27. Ауторадіограми, отримані з SDS-PAGE аналізу  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при  $4^{\circ}\text{C}$  в PBS, pH 7,4, який містить 75мг/мл людського сироваткового альбуміну і 1мМ ДТПК. В показаний час зразки піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови, денатуруючі умови (SDS). Зразки наносили по 5мкл (треки 1, 2) і 10мкл (треки 5, 6). Гелі експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і фотографували.

Фігура 28. Денситометричне сканування ауторадіограми нульового часу, отриманої з SDS-PAGE аналізу  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при  $4^{\circ}\text{C}$  в PBS, pH 7,4, який містить 75мг/мл людського сироваткового альбуміну і 1мМ ДТПК. Зразки піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#2) дорівнювала 96,1%.

Фігура 29. Денситометричне сканування ауторадіограми 48 годин, отриманої з SDS-PAGE аналізу  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при  $4^{\circ}\text{C}$  в PBS, pH 7,4, який містить 75мг/мл людського сироваткового альбуміну і 1М ДТПК. Зразок піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#2) дорівнювала 94,1%.

Фігура 30. Ауторадіограми, отримані з SDS-PAGE аналізу «mix&shoot»  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при  $37^{\circ}\text{C}$  в людській сироватці. В показаний час зразки піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл (треки 1, 2), 10мкл (треки 3, 4) і 20мкл (треки 5, 6). Гелі експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і фотографували.

Фігура 31. Денситометричне сканування ауторадіограми нульового часу, отриманої з SDS-PAGE аналізу «mix&shoot»  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при  $37^{\circ}\text{C}$  в людській сироватці. Зразки піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#2) дорівнювала 89,1%.

Фігура 32. Денситометричне сканування ауторадіограми 72 годин, отриманої з SDS-PAGE аналізу «mix&shoot»  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого при  $37^{\circ}\text{C}$  в людській сироватці. Зразок піддавали електрофорезу в 4-20% тріс-гліциновому гелі, використовуючи невідновлюючі умови. Зразки наносили по 5мкл, 10мкл і 20мкл в подвійні лунки. Гель експонували до рентгенівської плівки приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі і один з треків сканували, використовуючи денситометр. Відносна площа піку радіоміченого кон'югату (#2) дорівнювала 88,8%.

Фігура 33. Кожна з двадцяти BALB/c мишей отримувала внутрішньовенно ін'єкцію 5мкКи  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, розчиненого в 1 X PBS, pH 7,4, який містить 75мг/мл людського сироваткового альбуміну і 1мМ МДПК. Групи, кожна з п'яти мишей, були вбиті через 1, 24, 48 і 72 години і потім їх кров і різні тканини приготували і аналізували на асоційовану радіоактивність.

Фігура 34. Зростаючі кількості CHO-похідних мічених антитіл 2B8 інкубували з фіксованою концентрацією свіже-зібраних CD20-позитивних В-клітин (SB) або CD20-негативних Т-клітин (HSB). Кількість антитіл, які зв'язані з клітинами, оцінювали, використовуючи FACS аналіз, використовуючи цитиний анти-мишачий IgG-FITC F(ab) $_2$ , як описано тут. Порівняння робили з антитілом стороннього ізо типу (S004). Тільки CHO-похідні антитіла 2B8 показали помітне зв'язування з CD20-позитивними SB клітинами.

Фігура 35. Імунореактивність CHO-похідних 2B8 порівнювали з 2B8-49 батьківським антитілом, яке виробляється в гібридомній клітинній лінії, способом прямої конкуренції в аналізі ORIGIN. Зростаючі кількості антитіла інкубували з фіксованою концентрацією CD20-позитивних В-клітин (SB) і слідовими кількостями рутеній-міченого CHO 2B8. Після інкубації протягом трьох годин при кімнатній температурі, зв'язування, виражене як відносна електрохемілюмінесценція (ЕХЛ), визначали, використовуючи прибор ORIGIN, як описано в розділі Матеріали і Способи. Значення є середнім арифметичним двох вимірів. Обчислені середні константи спорідненості для CHO 2B8 і 2B8-49 дорівнювали  $1,3 \times 10^{-10}\text{M}$  і  $2,5 \times 10^{-10}\text{M}$ , відповідно. Порівняння робили з антитілом стороннього ізо типу (S004).

Фігура 36. Зв'язування 2B8-MX-ДТПК кон'югатів, які приготували з CHO-похідних 2B8, порівнювали з некон'югованим антитілом способом прямої конкуренції в аналізі ORIGIN. Кон'югати готували інкубацією 2B8 з MX-ДТПК 8, 17 і 24 години перед видаленням хелату, який не прореагував. Для аналізу зв'язування антитіла інкубували з фіксованими концентраціями CD20-позитивних В-клітин (SB) і слідовими кількостями рутеній-міченого CHO 2B8. Після інкубації протягом трьох годин при кімнатній температурі, зв'язування, виражене як відносна електрохемілюмінесценція (ЕХЛ), визначали, використовуючи прибор ORIGIN, як описано в розділі Матеріали і Способи. Значення є середнім арифметичним з двох вимірів. Препарати кон'югатів показали схоже зв'язування в порівнянні з некон'югованим антитілом 2B8.

Фігура 37. А. Клітини SB відмивали і повторно суспендували до  $90 \times 10^6$  клітин/мл в буфері розведення (1X PBS, pH 7,4, який містить 1% (вага/об'єм) бичачого сироваткового альбуміну). Зростаючі концентрації клітин інкубували 3 години з 7,5нг/мл In2B8, який приготували, використовуючи 2B8-MX-ДТПК партія 0165A. Б. Графік в подвійних обернених координатах концентрації клітин від зв'язаної радіоактивності/загальної радіоактивності (В/АТ). Імунореактивність була обчислена як обернене значення Y у точці перетину X 100. Величини імунореактивності і коефіцієнту кореляції (R) дорівнювали 80,6% і 0,981, відповідно.

Фігура 38. А. Клітини SB відмивали і повторно суспендували до  $90 \times 10^6$  клітин/мл в буфері розведення (1X PBS, pH 7,4, який містить 1% (вага/об'єм) бичачого сироваткового альбуміну). Зростаючі концентрації клітин інкубували 3 години з 2нг/мл Y2B8, який приготували, використовуючи 2B8-MX-ДТПК, партія # 0165A. Б. Графік в подвійних обернених координатах концентрації клітин від зв'язаної радіоактивності/загальної радіоактивності (В/АТ). Імунореактивність була обчислена як обернене значення Y у точці перетину X

100значення обчислена як  $1/y$ -перетин  $\times 100$ , Величини імунореактивності і коефіцієнту кореляції (R) дорівнювали 72,2% і 0,999, відповідно.

#### Визначення

Якщо не вказано інше, всі технічні і наукові терміни, які використані тут, мають таке ж саме значення, як звичайно розуміє кваліфікована в галузі людина, який підходить цей винахід. Хоча будь-які способи і матеріали, схожі або еквівалентні описаним тут способам, можуть бути використані в практиці або тестуванні даного винаходу, але кращі способи і матеріали описані тут. Для цілей даного винаходу, нижче визначені наступні терміни.

низький вміст металу - відноситься до реагентів, оброблених з метою зменшення забруднення металом до рівня, який не впливає на приєднання радіомітки.

антиген-позитивний - означає експресію антигену, який розпізнається специфічним антитілом винаходу таким чином, що антитіло здатне до зв'язування.

% приєднання радіомітки - відноситься до кількості радіомітки з реакції радіомічення, яка зв'язується з антитілом, по відношенню до сумарної кількості радіомітки, спочатку доданої до реакції.

% зв'язування - відноситься до кількості антитіла із зразка, яка зв'язується з цільовим антигеном, з або без специфічності.

% імунореактивності або специфічність зв'язування - відноситься до такої кількості зразка антитіла, яка специфічно зв'язується з цільовим антитілом.

діагностичне антитіло - відноситься до антитіла, кон'югованого з радіоміткою, такою як  $^{111}\text{I}$ , яке може виконувати діагностичну візуалізацію пухлин і антиген-позитивних клітин.

терапевтичне антитіло - відноситься до антитіла, кон'югованого з альфа-або бета-випромінюючою радіоміткою (такою як  $^{90}\text{Y}$ ), яке може виконувати знищення клітин, коли воно зв'язано з цільовим антигеном.

Доклінічна розробка мишачих моноклональних анти-CD20 антитіл 2B8, кон'югованих 2B8,  $^{111}\text{In}$ - і  $^{90}\text{Y}$ -мічених 2B8

I. Матеріали і способи для розробки мишачих моноклональних анти-CD20 антитіл 2B8, кон'югатів 2B8-MX-ДТПК,  $^{111}\text{In}$ -мічених 2B8-MX-ДТПК і очищених HPLC  $^{90}\text{Y}$ -MX-ДТПК

#### A. Матеріали.

##### 1. Клітини.

Людські клітинні лінії SB і HSB отримали з Американської Колекції Типів Культур (American Type Culture Collection) і вирощували на RPMI-1640, яка містила 10% ембріональної бичачої сироватки. CD20-позитивна клітинна лінія SB - це В лімфобластоїдна клітинна лінія, похідна з світлого шару згустку периферійної крові пацієнтів з гострою лімфобластичною лейкемією (1). Антиген-негативна клітинна лінія HSB - це Т лімфобластоїдна клітинна лінія, отримана від новонароджених сірійських хом'яків (2). Мишача мієломна клітинна лінія SP2/0 підтримувалась на RPMI-1640, яка містила 10% ембріональної бичачої сироватки.

##### 2. Антитіла.

Анти- CD20 антитіла B1 і Leu 16 отримували від Coulter Immunology та Becton/Dickinson, відповідно.  $^{125}\text{I}$ -мічені цапині анти-мишачі IgG та цапині анти-людські IgG антитіла отримували від ICN. Цапині F(ab')<sub>2</sub> анти-мишачих IgG отримували від Carpel.

##### 3. Реагенти.

Повні та неповні ад'юванти Фройнда купували у Sigma Chemical Company. Поліетиленгліколь, НАТ концентрат і НТ концентрат отримували від Boehringer Mannheim. Флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC) купували у Sigma Chemical Company. Індій-[111] хлорид і  $^{90}\text{Y}$  хлорид отримували від Amersham або NEN Dupont. Ітрій-[89] хлорид купували у Aldrich Chemical Company. Всі інші реагенти отримували із стандартних джерел.

Реагенти, використані для кон'югації і протоколів радіомічення, обробляли з метою видалення забруднення іонами важких металів, які можуть конкурувати з радіоізотопами під час етапу радіомічення. Типово реагенти обробляли, пропускаючи розчин через колонку іонообмінної смоли Chelex 100 (BioRad Industries) або в періодичному процесі способом додавання Chelex 100 до розчину, який приготували. Для всіх приготувань і розчинів використовували або Milli-Q-очищену або Water for Irrigation (WFIr) воду з низьким вмістом металу. Розчини, вільні від металу, стерилізували фільтруванням і збирали в стерильні пластикові контейнери.

#### Б. Способи

##### 1. Отримання і перевірка супернатантів гібридами 2B8 методом RIA.

Десять BALB/c мишей імунізували 20 мільйонами SB клітин, суспендованих в PBS, який містив повний ад'ювант Фройнда. Клітини вводили як підшкірно, так і внутрішньочеревно, в декількох місцях на тілі тварини. Після 2 тижнів періоду покою мишам другий раз вводили SB клітини, емульговані в неповному ад'юванті Фройнда. Посилюючі послідовні імунізації виконували щотижня SB клітинами, суспендованими в PBS. Мишей імунізували протягом періоду від 6 тижнів до 4 місяців.

Двох тварин зразу умертвляли способом цервікальної дислокації та їх селезінки видаляли для злиття з мишачою мієломою SP2/0. Тварин обирали, базуючись на здатності пост-імунної сироватки ефективно інгібувати зв'язування радіоміченого Coulter B1 анти-CD20 антитіла з людськими SB клітинами. За три дні до кожного злиття обрані тварини отримували одну останню ін'єкцію внутрішньовенно (хвостова вена) 20 мільйонів SB клітин в PBS. По смерті тварин селезінки видаляли за антисептичних умов і спленоцити зливали з SP2/0 клітинами в співвідношенні 5:1 (спленоцити: SP2/0). Злиті клітини відмивали в середовищі для культур тканин і розподіляли в 96-лункові пластини, які містили селективне середовище НАТ. Гібридами перевіряли інгібіторним радіоімунним аналізом, використовуючи Coulter B1 антитіло після 10-14 днів.

Перевірка гібридів, які виділяли анти-CD20 антитіло, виконували, використовуючи прийняті способи радіоімунологічного аналізу. Коротко, Coulter B1 анти-CD20 антитіло очищали афінною хроматографією на Білку А. П'ятдесят мікрограм очищеного антитіла з'єднували з  $^{125}\text{I}$  коротким окисненням в присутності iodobeads (Pierce Chemical Co.), виконуючи процедури виробника. Радіомічене антитіло було знесолене на амберлітовій смолі та зберігалось в буфері розведення (PBS, pH 7,4, який містить 0,2% желатину, 0,02% азида натрію і 1,0% BSA). Десять нанограм радіоміченого антитіла поміщали в кожен лунку попередньо блокованого планшета для аналізу на фільтрах (буфер, що блокує: буфер розведення, який містить 10%

FBS) разом з 50мкл супернатанту гібридами із тестових лунок і 100000 SB клітин, суспендованих в 50мкл буферу розведення. Суспензію інкубували одну годину при кімнатній температурі. Планшети ретельно відмивали буфером для промивання (PBS, pH 7,4, який містить 0,2% желатину і 0,02% азиду натрію), на вакуумному пристрої фірми V&P Scientific і фільтри, які містили захоплені SB клітини, переносили в гамма-лічильник. Лунки, які містили тільки середовище HAT і мічене B1 антитіло, використовували як фоновий контроль, і ідентичні лунки, які містили SB клітини, використовували як позитивний контроль. Контролі інгібування містили радіомічене B1 і різні кількості неміченого B1 антитіла в діапазоні від 2мкг до 2нг.

2. Вивчення способом проточної цитометрії.

а. Клітинні лінії.

Попередні дослідження способом проточної цитометрії виконували з супернатантами з культур гібридами 2B8. Сто мікролітрів супернатанту гібридами інкубували з SB клітинами одну годину при кімнатній температурі; після цього додавали вторинне антитіло (F(ab')<sub>2</sub> цапиних анти-мишачих IgG; Cappel), яке використовували в розведенні 1/400, і інкубацію продовжували одну години в темряві. Клітини промивали 5 разів. Контрольні зразки включали тільки клітини (без первинного або вторинного антитіла), за допомогою яких визначали аутофлуоресценцію, клітини тільки з вторинним антитілом для визначення неспецифічного зв'язування і комерційно наявні флуоресцеїн ізотіоціанат-кон'юговані B1 (B1-FITC) для контролю CD20 популяції.

Для деяких експериментів флуоресцеїн зв'язували з очищеним антитілом 2B8 реакцією аміногруп з флуоресцеїн ізотіоціанатом (FITC). Коротко, антитіло 2B8 (1,2мг/мл) інкубували в 0,1М натрій карбонатному буфері pH 9,5 з 150-200мкг FITC на мг білку. Розчин інкубували 2 години при кімнатній температурі і отриманий кон'югат 2B8-FITC очищали на колонці Sephadex G-25. Інші реагенти, використані в цьому дослідженні, такі як B1 і Leu 16, купували у Coulter або Becton Dickinson у вигляді кон'югатів флуоресцеїну.

Клітини, які необхідно аналізувати, збирали і промивали три рази PBS, який містив 0,2% БСА і 0,1% азиду натрію. Життєздатність визначали за допомогою виключення трипанового синього за вимоги життєздатності >90%. Концентрації клітин доводили до 3млн/мл і додавали по 50мкл на лунку в 96-лункові планшети з U-подібним дном. Первинне антитіло (50мкл) додавали до відповідних лунок і суміш інкубували від 30 хвилин до 1 години при кімнатній температурі; після цього клітини промивали 5 разів 200мкл/лунка PBS, який містив 0,2% БСА і 0,02% азиду натрію. Планшети з клітинами центрифугували при 1300 обертів на хвилину 1 хвилину в центрифугі Sorvall і супернатанти видаляли обережним "нахилом" планшетів. Якщо необхідно, додавали вторинне антитіло і додатково інкубували від 30 хвилин до 1 години при кімнатній температурі в темряві; потім клітини промивали як описано вище. Нарешті, 200мкл фіксуєчого буферу (0,15М хлориду натрію, який містив 1% параформальдегіду, pH 7,4) додавали до кожного зразку і оброблені клітини переносили в 12×75мм пробірки для аналізу.

б. Кров яванських макак у цілому

Після видалення плазми клітини промивали двічі центрифугуванням і повторним суспендуванням в HBSS. Додавали ембріональну бичачу сироватку (2мл) і клітини знову суспендували. Після цього сто мікролітрів суспендованих клітин поміщали в кожну з 6 15-мл конічних центрифужних пробірок. Флуоресцентно-мічені моноклональні антитіла додавали за наступною схемою:

Пробірка № 1: Мишачі aHTH-CD2-FITC (AMAC), 2,5мкг/мл, 5мкг;

Пробірка № 2: Цапині анти-людські IGM-FITC (Fisher), 2,5мкг/мл, 5мкг;

Пробірка № 3: Цапині анти-мишачі IgG-RPE (Fisher), 2,5мкг/мл, 5мкг;

Пробірка № 4: Цапині анти-людські IgM-FITC + Цапині анти-мишачі IgG-RPE (абсорбовані), 2,5мкг/мл, 5мкг;

Пробірка № 5: Анти-людські CD20-FITC (анти-Leu 16, Becton Dickinson), 5мкг;

Пробірка № 6: Тільки клітини (аутофлуоресценція).

Мічені антитіла і клітини центрифугували дві хвилини при 1500об/хв для перемішування клітин і антитіл і після цього всі 6 зразків поміщали на лід і інкубували 30хв. Потім пробірки забирали із льоду і додавали буфер лізису (попередньо підігрітий до 37°C) до об'єму 12мл. Після цього зразки інкубували 15хв. при кімнатній температурі, центрифугували 5хв. 1500об/хв. при 4°C і видаляли супернатант. Потім осади клітин промивали двічі в буфері мічення (PBS, який містить 1% БСА і 0,05% азиду натрію).

Далі клітини фіксували додаванням 0,5мл фіксуєчого буферу (0,15М хлориду натрію, pH 7,4, який містить 1% параформальдегіду) до кожної пробірки і аналізували на приборі Becton Dickinson FACScan, використовуючи аутокомпенсацію і попереднє калібрування за допомогою калібрувальних кульок. Зелено флуоресценцію від флуоресцеїну вимірювали в режимі FL1, а червону флуоресценцію від фікоеритрину вимірювали в режимі FL2. Дані подавали в логарифмічній формі. Спочатку життєздатні популяції лімфоцитів ідентифікували в координатах прямого світлорозсіювання проти світлорозсіювання під прямим кутом на точковому графіку. Загальна популяція лімфоцитів була потім ізольована відсіканням всіх інших подій. Отримані в результаті флуоресцентні вимірювання відбивали тільки такі специфічні події, які мали місце у вибраній області.

Для вивчення фармакології/токсикології високих доз, визначали попередні (до експерименту) рівні лімфоцитів для кожної мавпи і використовували як величини вихідних рівнів. Обчислювали відсотки T- і В-клітин і T:В співвідношення та використовували їх як точки відліку для вичерпання. Попередня популяція (до експерименту) В-клітин була перелічена з Leu 16 і антитілами проти людських IgM.

Після ін'єкцій мавпам 2B8, коли CD20 антиген був насичений 2B8, відсоток В-клітин в загальній популяції оцінювали використовуючи цапині анти-людський IgM-FITC, анти-мишачі IgG-RPE і подвійно забарвлену популяцію, яка містила обидва ці маркери. Подвійно забарвлену популяцію використовували для кількісного аналізу, поки всі 2B8 не були видалені з периферійної крові тварин. Відсоток Т-клітин в загальній популяції лімфоцитів оцінювали, використовуючи анти-CD2-FITC. Обчислювали середнє з вимірювань трьох зразків, 10000 вимірювань було зроблено для кожного зразку. Клітини з кожного з обраних зразків крові оцінювали, відповідно, перелічуванням в кожному випадку субпопуляцій Т- і В-клітин в загальній популяції лімфоцитів. Також перевіряли співвідношення Т:В. Зменшення кількості В-клітин обчислювали як відсоток зменшення В-клітин по відношенню до початкових рівнів В-клітин для кожної мавпи.

3. Мічення радіоактивним йодом та імунопреципітація CD20, Сто мільйонів SB клітин поділили на дві рівні частини після поверхневого мічення йодом з  $^{125}\text{I}$  і йодованими кульками (Iodobeads) (Pierce Chemical Co.). Клітини промивали багаторазно центрифугуванням, поки рівні радіоактивності в супернатанті не повернулись до фону. Сто мікрограм 2B8 або B1 (Coulter Immunology) антитіл додавали до будь-якого з двох зразків мічених В-клітин. Антитіла і SB клітини інкубували протягом ночі і після цього промивали три рази центрифугуванням, поки всі незв'язані антитіла не були видалені. Клітинні осад, які містили зв'язані 2B8 і B1, потім були розкладені і екстраговані додаванням 1% детергенту NP-40 в 0,1М тріс-НСІ, рН 8,0, з наступним інкубуванням при кімнатній температурі одну годину. Екстракт центрифугували в мікроцентрифугу 30хв. на високій швидкості і супернатант переносили в нові пробірки. Білок А-Сефарозу (300мкл) додавали до кожної пробірки і осаджували центрифугуванням. Потім білок А-Сефарозу промивали 20 разів для видалення неспецифічно зв'язаного білку, міченого йодом. Коли відношення радіоактивності кулька - супернатант досягало величини 100, концентрат екстрагували буфером зразку SDS PAGE і нагрівали до кипіння. Після охолодження приблизно 15000р/хв. кожного з екстрактів додавали до лунки 10% поліакриламідного гелю. Попередньо пофарбований стандарт низької молекулярної ваги (BioRad Inc.) додавали до окремої лунки і використовували для оцінки молекулярної ваги. Білки були розділені електрофорезом і гель сушили та експонували до рентгенівської плівки 24 години при  $-70^{\circ}\text{C}$ ; після чого плівку проявляли і аналізували.

#### 4. Аналіз зв'язування 2B8 методом Скетчарда

Уявну спорідненість очищеного 2B8 оцінювали шляхом аналізу Скетчарда. Радіомічене 2B8 приготували реакцією з  $^{125}\text{I}$  в присутності йодованих кульок. Після видалення вільного йоду радіомічене антитіло інкубували в різних концентраціях, в двох повторах, від 5000нг на лунку до 35нг/лунка з 10,000 SB клітинами. Кількість зв'язаного з клітинами антитіла обчислювали з специфічної активності  $^{125}\text{I}$ -міченого 2B8, Співвідношення зв'язане/вільне антитіло представляли як графік залежності від молярної концентрації зв'язаного антитіла і уявну константу спорідненості визначали з співвідношення перетинів з Х і Y осями.

#### 5. Приготування 2B8-МХ-ДТПК а. Джерело МХ-ДТПК

Для деяких доклінічних досліджень мічена вуглецем-14 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (МХ-ДТПК) була надана у вигляді сухої твердої речовини доктором Отто Гансов (Otto Gansow) з Національного Інституту Здоров'я і зберігалась зневодненою при  $4^{\circ}\text{C}$  та захищеною від світла. Вихідні розчини хелату готували на воді, яку очищали Milli-Q, і концентрацію визначали, оцінюючи радіоактивність і використовуючи специфічну активність речовини. Вихідні розчини загалом мали концентрацію 2-5мМ і зберігались при  $-70^{\circ}\text{C}$  в поліпропіленових пробірках. Для інших досліджень МХ-ДТПК отримували від Coulter Immunology у вигляді двохлаїдрової солі в воді і зберігали при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### б. Підтримування вільних від металу умов.

На додаток до використання реагентів, вільних від металу, всі маніпуляції з реагентами виконували таким чином, щоб звести до мінімуму можливість забруднення металом. Коли це можливо, використовували поліпропіленові пластикові контейнери, такі як колби, стакани і мірні циліндри. Перед використанням вони були промиті Alconox і ретельно промиті водою, яку очищали Milli-Q. На додаток, для точної маніпуляції маленькими об'ємами використовували вільні від металу наконечники піпеток (BioRad). Для маніпуляції більшими об'ємами реагентів використовували стерильні пластикові серологічні піпетки (наявні розміри від 1 до 25мл). Реакції було зручно виконувати в поліпропіленових пробірках для мікроцентрифуги з гвинтовою кришечкою (Sardstedt Industries; місткість 1,5мл) або в поліпропіленових конічних пробірках (Costar; 15мл і 50мкл). При маніпулюванні пробірками для діалізу одягали одноразові хірургічні рукавички, попередньо промиті водою, яку очищали Milli-Q.

#### в. Приготування антитіла.

Мишаче анти-CD20 антитіло 2B8 спочатку очищали із асцитів Білком А і QAE хроматографією. Для подальших експериментів 2B8 очищали із супернатантів біореактору пустотілих волокон, використовуючи схожий процес очищення. Тепер антитіла, отримані на пустотілих волокнах, замінені з метою комерціалізації СНО-похідними антитілами, які описані в Прикладі 2,

Для кон'югації антитіло готували переносом його в вільний від металу 50мМ бісін-NaOH, рН 8,6, який містив 150мМ NaCl, використовуючи діаліз або підсилювали, використовуючи багаторазову ультрафільтрацію за допомогою фільтрів для центрифугування (30,000D MWCO) Centricon 30 (Amicon). Загалом, 50-200мкл білку (10мг/мл) додавали до фільтрувального елементу і додавали 2мл біцінового буферу. Фільтри центрифугували при  $4^{\circ}\text{C}$  на Sorval SS-34 роторі при 6,000об/хв. протягом 45хв. Об'єм, який зберігався, складав приблизно 50-100мкл. Цей процес повторювали двічі з тим же самим фільтром. Об'єм, який зберігався, переносили в 1,5мл поліпропіленову пробірку з гвинтовою кришечкою, перевіряли на білок, розводили до 10,0мг/мл і зберігали при  $4^{\circ}\text{C}$  перед використанням для кон'югації. Для деяких досліджень білок переносили в 50мМ цитрат натрію, рН 5,5, який містив 150мМ NaCl і 0,05% азиду натрію, використовуючи протокол, описаний вище, г. Протокол кон'югації.

Кон'югацію 2B8 з МХ-ДТПК виконували в поліпропіленових пробірках при кімнатній температурі. Заморожені вихідні розчини МХ-ДТПК були розморожені безпосередньо перед використанням. Типово, 50-200мкл антитіла в концентрації 10мг/мл реагували з хелатом (комплексом) при молярному співвідношенні хелат:білок 4:1, Реакції ініціювали додаванням вихідного розчину хелату і обережним перемішуванням; кон'югація продовжувалась протягом ночі, загалом від 14 до 20 годин при кімнатній температурі. Хелат, який не прореагував, видаляли з кон'югату діалізом або багаторазовою ультрафільтрацією, як описано вище, в вільний від металу нормальний сольовий розчин (0,9% вага/об'єм), який містив 0,05% азиду натрію. Концентрацію білку доводили до 10мг/мл і зберігали до радіомічення в поліпропіленовій пробірці при  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### д. Визначення приєднання хелату.

Приєднання хелату визначали сцинтиляційним лічильником і порівнянням величини, отриманої з очищеним кон'югатом, з питомою активністю хелату, міченого вуглецем-14. Для подальших досліджень, в яких використовували нерадіоактивний хелат, отриманий від Coulter Immunology, приєднання хелату оцінювали інкубуванням кон'югату з надлишком радіоактивного розчину-носія  $^{90}\text{Y}$  відомої концентрації і

питомої активності.

Коротко, вихідний розчин хлориду ітрію відомої концентрації готували в вільній від металу 0,05N HCl, до якої додавали вільний від носія  $^{90}\text{Y}$  (хлориста сіль). Аліквоту цього розчину аналізували рідинним сцинтиляційним лічильником для визначення точної питомої активності цього реагенту. Об'єм реагенту хлориду ітрію рівний трьохкратній кількості молів хелату, який буде приєднаний до антитіла, типово 2моль/моль антитіла, додавали в поліпропіленову пробірку і рН доводили до 4,0-4,5 2М ацетатом натрію. Після цього додавали кон'юговане антитіло і суміш інкубували 15-30хв. при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням 20мМ EDTA до кінцевої концентрації 1мМ і рН розчину доводили до приблизно рН 6 2М ацетатом натрію.

Після 5хв. інкубації весь об'єм очищали високоефективною гель-хроматографією, як описано нижче. Елюйовані фракції, які містять білок, збирали, визначали концентрацію білку і аліквоту оцінювали на радіоактивність. Приєднання хелату обчислювали використовуючи питому активність препарату хлориду  $^{90}\text{Y}$  і концентрацію білку.

#### е. Імунореактивність 2B8-MX-ДТПК.

Імунореактивність кон'югованого 2B8 оцінювали, використовуючи суцільно-клітинний ELISA. SB клітини середини логарифмічного росту виділяли з культури центрифугуванням і промивали двічі 1X HBSS. Клітини були розбавлені в HBSS до  $1\text{--}2 \times 10^6$  клітин/мл, розподілені в 96 лункові полістирольні мікролітрові планшети в кількості 50,000-100,000 клітин/лунка. Планшети сушили в вакуумі 2 години при 40-45°C для фіксації клітин на пластику. Планшети зберігались сухими при -20°C до використання. Безпосередньо перед використанням для аналізу планшети нагрівали до кімнатної температури, і після цього блокували 1X PBS, рН 7,2-7,4, який містив 1% BSA (2 години). Зразки для аналізу розчиняли в 1X PBS/1% BSA, поміщали на планшети і серійно розчиняли (1:2) в такому ж буфері. Після інкубації протягом 1 години при кімнатній температурі планшети промивали тричі в 1X PBS. Вторинне антитіло (цапиний анти-мишачий IgG1-специфічний HRP кон'югат) (50мкл) додавали до лунок (1:1500 розведення в 1X PBS/1% BSA) і інкубували 1 годину при кімнатній температурі. Планшети промивали чотири рази в 1X PBS з наступним додаванням розчину субстрату ABTS (50мМ цитрат натрію, рН 4,5, який містив 0,01% ATBS і 0,001%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Планшети зчитували після 15-30хв. інкубації при довжині хвилі 405нм. Антиген-негативні HSB клітини включили в аналіз для контролю неспецифічного зв'язування. Імунореактивність кон'югату обчислювали побудовою графіку величин поглинання проти відповідного фактору розведення і порівнянням цих величин з величинами, отриманими, використовуючи природне антитіло (яке репрезентує 100% імунореактивність), яке тестували на тому ж планшеті. Порівнювали кілька величин на лінійній частині профілю титрування і визначали середню величину.

#### е. Стабільність природного 2B8 і 2B8-MX-МДТПК In Vitro

Для оцінки стабільності антитіла і кон'югату протягом 12 тижнів, аліквоти антитіла 2B8 і 2B8-MX-ДТПК розчиняли або в нормальному сольовому розчині або в нормальному сольовому розчині, який містив 10мМ гліцин-HCl, рН 6,8. Подвійні набори зразків інкубували як при 4, так і при 30°C і зразки оцінювали щотижня, використовуючи наступні методи: SDS-PAGE (відновлюючі і невідновлюючі умови), імунореактивність методом суцільно-клітинного імуноферментного аналізу, використовуючи SB (антиген-позитивні) або HSB (антиген-негативні) клітини як захват, і ізоелектрофокусування в гелі (рН діапазон, 3-10). На додаток, ефективність радіомічення кон'югату оцінювали на 4, 8 і 12 тижні радіоміченням кон'югату  $^{90}\text{Y}$  аналізуючи продукт методом SDS-PAGE і ауторадіографічним аналізом. Нарешті, в окремому дослідженні, аліквоти 2B8-MX-ДТПК, які інкубували при 4° і 30°C протягом 10 тижнів, мітили радіоізотопом  $^{111}\text{In}$  і оцінювали в дослідженні біорозподілення в BALB/c мишах, як описано нижче.

#### ж. Імуногістологічні дослідження.

Імуногістологічні дослідження як з природними, так і з кон'югованими (2B8-MX-ДТПК) антитілами виконувалися IMPATH Laboratories, використовуючи розрізи тканин людини, фіксовані ацетоном. Антитіла очищали із супернатантів біореактору пустотілих волокон хроматографією на білку A і Q Sepharose. Кон'югат клінічної якості готували, використовуючи MX-ДТПК від Coulter Immunology, відповідно до протоколу, описаного вище.

#### з. Імунореактивність радіоміченого 2B8-MX-ДТПК In Vitro.

Для деяких експериментів використовували протокол суцільно-клітинного ELISA, використаний для неміченого 2B8-MX-ДТПК. В пізніших експериментах імунореактивність  $^{111}\text{In}$  і  $^{90}\text{Y}$ -мічених кон'югатів (кожний готували в IDEC Pharmaceuticals або, альтернативно, в MPI Pharmacy Services, Inc.) визначали, використовуючи модифіковану версію суцільно-клітинного аналізу зв'язування, описану Lindmo (3). Коротко, зростаючі концентрації антиген-позитивних SB клітин або антиген-негативних HSB клітин середини логарифмічного росту [ $20\text{--}30 \times 10^6$  клітин/мл в буфері розведення [PBS, рН 7,4, який містив 1% BSA, 0,1% желатину і 0,02% азиду натрію]] додавали до подвійного набору пробірок. Радіомічений кон'югат розбавляли до кінцевої концентрації антитіла 1-5нг/мл буфером розведення і 0,35мл додавали до кожної пробірки. Після періоду інкубації 75-90хв. при кімнатній температурі клітини осаджували центрифугуванням і супернатант збирали. Радіоактивність, яка залишилась в фракції супернатанту, визначали гамма- або сцинтиляційним лічильником. Дані представляли на графіку як частку від загальної доданої радіоактивності, поділеної на радіоактивність, зв'язану клітинами, в залежності від оберненої кількості клітин на пробірку. Значення у точці перетину з віссю Y, таким чином, репрезентує величину імунореактивності.

#### и. In Vitro Стабільність радіоміченого 2B8-MX-ДТПК в сироватці людини.

Стабільність in vitro  $^{111}\text{In}$ - і  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК оцінювали інкубацією в сироватці людини при 37°C протягом 96 годин. Кон'юговане антитіло готували і мітили  $^{111}\text{In}$  (протокол "mix&shoot") або  $^{90}\text{Y}$ , як описано вище. Питома активність  $^{111}\text{In}$ - і  $^{90}\text{Y}$ -міченого кон'югатів складала 2,5 і 14,6мКи/мг, відповідно; радіомічені кон'югати суспендували в буфері, який містив 75мг/мл людського сироваткового альбуміну (ЛСА) і 1мМ ДТПК (ітрій-мічений кон'югат), або буфері, який містив 50мг/мл ЛСА (індій-мічений кон'югат). Радіомічені кон'югати розбавляли 1:10 нормальною сироваткою людини (не інактивованою теплом) і аліквоти поміщали в стерильні пробірки з кришечками в асептичних умовах; після цього ці пробірки інкубували при 37°C протягом періоду до 96 годин. В обрані періоди часу зразки кон'югатів видаляли і

аналізували методом невідновлюючого SDS-PAGE в 4-20% градієнтному гелі з наступною авторадіографією і миттєвою хроматографією в тонкому шарі.

і. In Vitro стабільність  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-ДТПК клінічного складу.

Кон'югат 2B8-MX-ДТПК мітили радіоізотопом  $^{111}\text{In}$  і використовували без очищення методом HPLC (протокол «mix&shoot»). Радіомічене антитіло розводили в PBS і додавали людський сироватковий альбумін (ЛСА) до кінцевої концентрації 50мг/мл. Питома активність клінічного радіоміченого кон'югату складала 2,2мКі/мг. Клінічний кон'югат інкубували при 4°C протягом 48 годин і аліквоти аналізували в періоди часу 0, 24 і 48 годин, використовуючи невідновлюючий SDS-PAGE в 4-20% градієнтному гелі з наступною авторадіографією і миттєвою хроматографією в тонкому шарі. Імунореактивність в кожний відрізок часу оцінювали, використовуючи аналіз суцільно-клітинної суспензії, описаний в розділі 1 вище, і. In Vitro стабільність  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК клінічного складу.

Кон'югат 2B8-MX-ДТПК мітили радіоізотопом  $^{90}\text{Y}$  і очищали хроматографією за виключенням по розміру на HPLC, використовуючи 1X PBS як буфер елюювання. Фракції радіоміченого кон'югату збирали і додавали людський сироватковий альбумін і ДТПК до кінцевих концентрацій 75мг/мл і 1мМ, відповідно. Питома активність клінічного радіоміченого кон'югату складала 14,6мКі/мг. Клінічний кон'югат інкубували при 4°C протягом 48 годин і аліквоти аналізували в періоди часу 0, 24 і 48 годин, використовуючи невідновлюючий SDS-PAGE в 4-20% градієнтному гелі з наступною авторадіографією і миттєвою хроматографією в тонкому шарі. Імунореактивність в кожний відрізок часу оцінювали, використовуючи аналіз суцільно-клітинної суспензії, описаний в розділі 1 вище.

2. Дослідження на тваринах.

а. Дослідження фармакології/токсикології великих доз 2B8 на приматах.

Антитіло 2B8 оцінювали в дослідженні фармакології великих доз, яке виконувалось по правилам GLP в White Sands Research Center (Номер Дослідження 920111). Були використані дорослі мавпи Яванських макак; кожна досліджувана група складалась з одного самця і однієї самки. Антитіло вводили внутрішньовенно кожні 48 годин, загалом 7 ін'єкцій. Досліджували п'ять груп: Група I (сольовий розчин); Група II (0,6мг/кг); Група III (2,5мг/кг); Група IV (10мг/кг); і Група V (10мг/кг тільки в день 0).

Перед началом дослідження була взята кров у всіх 10 тварин і використана для визначення фону реагентів і початкової популяції В-клітин. Всі наступні зразки крові брались перед кожною ін'єкцією антитіла. Групи III і IV умертвили на 13 день для повного розтину і гістопатології.

У тварини в групах I, II і V брали кров на 0, 1,3, 7, 13, 21, 37 і 52 дні; приблизно 5мл цілісної крові було взято в гепаринізовану пробірку. Цілісну кров тримали при 4°C і аналізували протягом 24 годин. Кров кожної тварини центрифугували 5хв. при 2000об./хв. і супернатантна плазма видалялась для аналізу рівнів 2B8 в сироватці методом RIA (Див. процедуру RIA для методів специфічного аналізу). Концентрований матеріал, який містив PBLs та RBCs, повторно суспендували в FCS для FACS аналізу.

б. Дослідження фармакокінетики 2B8 і 2B8-MX-ДТПК.

Середню величину бета-напіврозпаду 2B8 у сироватці Яванських макак визначали, використовуючи тварин Групи V (Див. вище). Цапінний анти-мишачий IgG1 (Fisher Scientific) розводили до 2,0мг на мл в 10мМ боратному буфері, pH 9,6, і 50мкл додавали до кожної лунки 96-лункового планшету. Антитіло залишали зв'язуватись з планшетом протягом нічної інкубації при 4°C, або 2 годин при кімнатній температурі. Кожний планшет блокували 30хв. при кімнатній температурі 150мкл на лунку PBS, який містив 1% БСА. Планшети промивали дистильованою водою і зразки сироватки або плазми в трьох повторях розміщали в індивідуальних лунках в початковому розведенні 1:100, з наступним послідовним розведенням 1:2. Очищений 2B8 додавали до неімунної сироватки і розводили для використання в якості стандартної кривої починаючи з 0,5мг/мл; зразки розводили 1:100 і потім послідовно розводили як і інші зразки. Планшети інкубували 1 годину при кімнатній температурі і промивали 4 рази дистильованою водою. Після цього додавали вторинний реагент (цапінний анти-мишачий IgG1-HRPO) в розведенні 1:4000 і інкубували при кімнатній температурі додаткову годину. Планшети знову промивали дистильованою водою і додавали 0,1мл субстрату пероксидази, який містив перекис водню. Реакцію проводили 20хв для проявлення кольору; поглинання визначали на довжині хвилі 405нм, використовуючи зчитувач ELISA для мікропланшетів. Результати представляли в мкг антитіла на мл сироватки.

На додаток, визначали величини  $\beta$  t<sub>1/2</sub> 2B8 і 2B8-MX-ДТПК у BALB/c мишей. Некон'югований 2B8, який зберігали при -70°C в 1X PBS, pH 7,4/10% гліцерині, нагрівали, розводили до 0,5мг/мл і фільтрували в стерильних умовах. Кон'юговане антитіло готували за стандартними протоколами, але з хелатом, міченим вуглецем [14]; інкорпорування хелату становило 1,5моля на моль антитіла. Очищений кон'югат розводили до 0,5мг/мл в нормальному фізіологічному розчині, фільтрували в стерильних умовах і до використання зберігали з природним антитілом при 4°C.

Мишам, віком від 6 до 8 тижнів, робили ін'єкції по 100мкл очищеного антитіла 2B8 в концентрації 250мкг/мл. Згодом у мишей брали кров ретро-очною пункцією в різні інтервали часу від 0 до 264 годин і їх сироватку аналізували на присутність природного і кон'югованого антитіла 2B8 суцільно-клітинним імунферментним аналізом, використовуючи антиген-позитивну В-клітинну лінію SB як захват. Отримані результати викреслювали як концентрації 2B8 або 2B8-MX-ДТПК проти часу; з цих результатів отримували графік лінійної регресії і нахил використовували для визначення величин  $\beta$  t<sub>1/2</sub>.

в. Дослідження Фармакології/токсикології [89]-Y-2B8-MX-ДТПК у Яванського макака.

2B8-MX-ДТПК, яке несе Ітрій-[89], готували, використовуючи протокол, описаний для введення  $^{90}\text{Y}$ , виключаючи те, що не використовували HPLC очистку. Нерадіоактивний кон'югат, який ніс метал, приготували в 1X PBS, який містив 75мг/мл ЛСА і 1мМ ДТПК і оцінювали в дослідженні GLP номер 920611 в White Sands Research Center. Одного самця і одну самку мавпи включили в кожну з чотирьох груп. Тваринам робили ін'єкції внутрішньовенно кожні 48 годин, загалом 7 ін'єкцій, з наступними кількостями препарату: група I (фізіологічний розчин); група II (0,003мг/кг); група III (0,03мг/кг); і група IV (0,3мг/кг). Стан тварин протягом дослідження оцінювали, визначаючи вагу і температуру тіла, споживання води і їжі, виділення, хімію сироваток, гематологію, аналіз сечі і фізичні кондиції. У тварин в групах з I по IV брали кров перед ін'єкцією на 0, 2, 7, 10 і 14 дні, і кров аналізували на рівні циркулюючих В-клітин FACS аналізом.

г. Біорозподілення радіоміченого 2B8-MX-ДТПК.



В попередньому дослідженні оцінювали  $^{111}\text{In}$ -мічений 2B8-MX-ДТПК на біорозподілення в тканинах BALB/c мишей віком від шести до восьми тижнів. Радіомічений кон'югат готували, використовуючи 2B8-MX-ДТПК клінічної якості за протоколом «mix&shoot», який описаний вище. Питома активність кон'югату становила 2,3мКі/мг і кон'югат розчинили в PBS, pH 7,4, який містив 50мг/мл ЛСА. Мишам робили ін'єкції внутрішньовенно 100мл  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК (приблизно 21мКі) і групи з трьох мишей вбивали способом цервікальної дислокації через 0, 24, 48, і 72 години. Після смерті хвіст, серце, легені, печінку, нирки, селезінку, м'язи і стегно видаляли, промивали, зважували; також брали для аналізу зразок крові. Радіоактивність, зв'язану з кожним зразком, визначали гамма-лічильником і визначали відсоток введеної дози на грам тканин. Не робили спроб врахувати вклад активності, яку представляла кров, асоційована з індивідуальними органами.

В окремому протоколі аліквоти 2B8-MX-ДТПК, які інкубували при 4° і 30°C 10 тижнів, мітили радіоактивним ізотопом  $^{111}\text{In}$  до питомої активності 2,1мКі/мг для обох препаратів. Потім ці кон'югати використовували в дослідженні біорозподілення у мишей, як описано вище.

Для дозиметричних досліджень 2B8-MX-ДТПК мітили радіоактивним ізотопом  $^{111}\text{In}$  до питомої активності 2,3мКі/мг і приблизно 1,1мКі вводили кожній з 20 BALB/c мишей. Потім членів груп, кожна з п'яти мишей, вбивали через 1, 24, 48 і 72 години і їх органи видаляли та готували для аналізу. На додаток, частини шкіри, м'язів і кісток були видалені і оброблені для аналізу; сечу і фекалії також збирали і аналізували в точках часу 24-72 години.

Використовуючи схожий підхід, 2B8-MX-ДТПК також мітили радіоактивним ізотопом  $^{90}\text{Y}$  і його біологічне розподілення оцінювали у BALB/c мишей через період часу 72 години. Після очистки HPLC хроматографією за виключенням по розміру, чотири групи по п'ять мишей отримали внутрішньовенно ін'єкції приблизно 1мКі кон'югату клінічної рецептури (питома активність: 12,2мКі/мг); члени групи були вбиті через 1, 24, 48 і 72 години та їх органи і тканини аналізували, як описано вище. Радіоактивність, зв'язану з кожним зразком тканини, визначали вимірюванням енергії гальмівного випромінювання гамма-сцинтиляційним лічильником. Величини активності виражали як відсоток введеної дози на грам тканини або відсоток введеної дози на орган. В той час, як органи і тканини були багатократно промиті для видалення зовнішньої крові, перфузію органів не робили. Таким чином, величини активності органів не враховують вклад активності, яку репрезентує внутрішньо асоційована кров, д. Пухлинна локалізація  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК.

Локалізацію радіоміченого 2B8-MX-ДТПК визначали на бестимусних мишах, які несуть В-клітинні пухлини Ramos. Бестимусні миші віком від шести до восьми тижнів отримували підшкірно ін'єкцію (лівий задній бік) 0,1мл RPMI-1640, яка містила  $1,2 \times 10^7$  клітин пухлини Ramos, які були попередньо адаптовані для росту у бестимусних мишей. Пухлини росли два тижні і мали вагу від 0,07 до 1,1 грамів. Миші отримували ін'єкцію внутрішньовенно 100мкл  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК (16,7мКі) і групи з трьох мишей умертвили способом цервікальної дислокації через 0, 24, 48, і 72 години. Після смерті хвіст, серце, легені, печінку, нирки, селезінку, м'язи і стегно видаляли, промивали, зважували; також брали для аналізу зразок крові. Радіоактивність, зв'язану з кожним зразком, визначали гамма-лічильником і визначали відсоток введеної дози на грам тканин.

### 3. Дозиметричні обчислення.

Використовуючи дані біорозподілення, одержані з використанням BALB/c мишей, які отримали ін'єкцію або  $^{111}\text{In}$  або  $^{90}\text{Y}$ -мічених 2B8-MX-ДТПК (Таблиці 1-4 і 5-8), оцінки дози радіації, абсорбованої з дози в 1,0мКі, введеної пацієнту вагою 70кг, були обчислені, використовуючи підхід, формалізований Медичним комітетом по внутрішнім дозам опромінення Товариства Ядерної Медицини (Medical Internal Radiation Dose (MIRD) Committee of the Society of Nuclear Medicine). Біологічний період напіврозпаду радіомічених кон'югатів визначали з величин введених доз на орган, визначених з даних біорозподілення для кожного радіоімунокон'югата. Для деяких тканин, наприклад, крові, припускали, що біологічний розклад радіоімунокон'югату відповідає моделі двох комірок з експонентним розкладом з цих комірок. Для інших тканин, наприклад, печінки, чиї рівні активності залишались майже незмінними протягом 72 годин дослідження біорозподілення, припускали, що біологічний період напіврозпаду був дуже великим і йому встановили значення 1000 годин.

Таблиця 1

Розподіл активності через 1,0 годину після В. В. введення  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-ДТПК у нормальних BALB/c мишей.  
Середнє значення  $\pm$  СВ

Зразок	Вага органу Грам	% ВД/ Грам	% ВД на орган
Кров	1,47 $\pm$ 0,17	40,3 $\pm$ 5,32	58,4 $\pm$ 3,1
Серце	0,087 $\pm$ 0,01	5,88 $\pm$ 0,76	0,51 $\pm$ 0,05
Легені (2)	0,149 $\pm$ 0,01	14,2 $\pm$ 1,4	2,10 $\pm$ 0,17
Нирка (1)	0,127 $\pm$ 0,02	9,82 $\pm$ 0,86	1,22 $\pm$ 0,12
Печінка	1,06 $\pm$ 0,20	10,32 $\pm$ 1,58	10,76 $\pm$ 1,93
Селезінка	0,090 $\pm$ 0,01	6,94 $\pm$ 1,17	0,61 $\pm$ 0,03
М'язи	8,39 $\pm$ 0,98	0,70 $\pm$ 0,25	5,67 $\pm$ 1,35
Кістки	3,15 $\pm$ 0,35	2,97 $\pm$ 0,71	9,10 $\pm$ 1,09
Шкіра	3,15 $\pm$ 0,35	0,96 $\pm$ 0,29	3,0 $\pm$ 1,12
Кишечник	2,58 $\pm$ 0,31	6,10 $\pm$ 2,00	7,80 $\pm$ 1,80
Сеча			-
Фекалії			-
		Разом	99,04 $\pm$ 4,8

Кількість мишей = 5

Середня вага = 20,97±2,46грам

Таблиця 2

Розподіл активності через 24 години після В. В. введення  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-ДТПК у нормальних BALB/c мишей.  
Середнє значення  $\pm$  СВ

Зразок	Вага органу Грам	% ВД/ Грам	% ВД на орган
Кров	1,47±0,07	21,97±1,87	32,22±1,35
Серце	0,128±0,03	4,02±0,23	0,38±0,01
Легені (2)	0,152±0,02	7,90±1,61	1,20±0,18
Нирка (1)	0,128±0,01	5,94±0,40	0,76±0,04
Печінка	1,11±0,10	10,08±1,83	11,20±2,23
Селезінка	0,082±0,01	5,04±0,75	0,40±0,02
М'язи	8,41±0,38	1,24±0,05	10,44±0,76
Кістки	3,15±0,14	2,02±0,33	6,31±0,81
Шкіра	3,15±0,14	3,75±0,39	11,77±1,09
Кишечник	2,91±0,27	4,50±0,52	6,65±0,56
Сеча			0,98
Фекалії			2,54
		Разом	87,10±1,68

Кількість мишей = 5

Середня вага = 21,03±0,94грам

Таблиця 3

Розподіл активності через 48 години після В. В. введення  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-ДТПКу нормальних BALB/c мишей.  
Середнє значення  $\pm$  СВ

Зразок	Вага органу Грам	% ВД/ Грам	% ВД на орган
Кров	1,45±0,13	22,41±3,95	31,90±2,89
Серце	0,090±0,01	4,05±0,94	0,36±0,06
Легені (2)	0,155±0,02	8,45±0,53	1,31±0,19
Нирка (1)	0,125±0,01	6,16±1,15	0,76±0,07
Печінка	1,040±0,11	9,41±2,33	9,84±3,18
Селезінка	0,082±0,01	5,32±0,71	0,48±0,11
М'язи	8,26±0,77	1,42±0,58	11,62±4,67
Кістки	3,10±0,29	2,08±0,16	6,41±0,44
Шкіра	3,10±0,29	3,43±0,59	10,54±1,69
Кишечник	2,96±0,20	5,05±0,63	7,46±0,60
Сеча			1,46
Фекалії			6,41
		Разом	88,49±6,87

Кількість мишей = 5

Середня вага = 20,65±1,93грам

Таблиця 4

Розподіл активності через 72 години після В. В. введення  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-ДТПКу нормальних BALB/c мишей.  
Середнє значення  $\pm$  СВ

Зразок	Вага органу Грам	% ВД/ Грам	% ВД на орган
Кров	1,52±0,06	18,97±1,31	28,51±2,03
Серце	0,094±0,01	3,71±0,31	0,35±0,04
Легені (2)	0,161±0,01	7,60±0,30	1,18±0,09
Нирка (1)	0,135±0,01	5,55±0,53	0,76±0,09
Печінка	1,11±0,11	9,90±1,77	11,00±2,03
Селезінка	0,095±0,01	5,12±0,75	0,48±0,04
М'язи	8,58±0,34	1,04±0,09	8,95±0,68
Кістки	3,22±0,12	1,73±0,34	6,04±0,51
Шкіра	3,22±0,12	3,16±0,60	10,19±2,03
Кишечник	2,79±0,19	4,53±0,83	6,37±1,38
Сеча			2,49
Фекалії			11,50
		Разом	87,80±4,79

Кількість мишей = 5  
Середня вага = 21,46±0,84грам

Таблиця 5

Розподіл активності через 1,0 години після В. В. введення  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК у нормальних BALB/c мишей.  
Середнє значення  $\pm$  СВ

Зразок	Вага органу Грам	% ВД/ Грам	% ВД на орган
Кров	1,27±0,06	39,23±2,45	49,77±1,72
Серце	0,086±0,01	5,80±0,84	0,50±0,09
Легені (2)	0,137±0,01	12,11±1,08	1,66±0,17
Нирка (1)	0,120±0,01	10,23±1,30	1,15±0,12
Печінка	0,921±0,05	12,12±1,72	11,17±1,66
Селезінка	0,080±0,01	9,27±0,46	0,74±0,07
М'язи	7,27±0,32	0,78±0,13	5,72±1,05
Кістки	2,73±0,12	4,35±0,39	11,89±1,47
Шкіра	2,73±0,12	2,12±0,78	5,82±2,24
Кишечник	2,22±0,06	3,52±1,12	4,22±0,84
Сеча	-	-	-
Фекалії	-	-	-
		Разом	94,85±3,47

Кількість мишей = 5  
Середня вага = 18,17±0,81грам

Таблиця 6

Розподіл активності через 24 години після В. В. введення  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК у нормальних BALB/c мишей.  
Середнє значення  $\pm$  СВ

Зразок	Вага органу Грам	% ВД/ Грам	% ВД на орган
Кров	1,517±0,090	8,35±2,547	12,83±4,60
Серце	0,092±0,005	2,63±0,142	0,240±0,006
Легені (2)	0,141±0,005	4,56±0,393	0,644±0,047
Нирка (1)	0,138±0,007	5,63±0,222	0,779±0,040
Печінка	0,438±0,098	5,22±0,335	2,259±0,399
Селезінка	0,081±0,003	4,23±0,180	0,345±0,011
М'язи	8,668±0,514	0,976±0,164	8,55±1,945
Кістки	3,246±0,186	1,326±0,102	4,289±0,154

Кількість мишей = 3  
Середня вага = 21,671±1,11грам

Таблиця 7

Розподіл активності через 48 годин після В. В. введення  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК у нормальних BALB/c мишей.  
Середнє значення  $\pm$  СВ

Зразок	Вага органу Грам	% ВД/ Грам	% ВД на орган
Кров	1,33±0,06	17,34±2,0	23,03±1,95
Серце	0,088±0,01	3,56±0,31	0,31±0,04
Легені (2)	0,139±0,01	7,54±0,88	1,05±0,15
Нирка (1)	0,122±0,01	6,53±0,42	0,79±0,01
Печінка	0,968±0,04	9,05±1,70	8,92±1,57
Селезінка	0,087±0,01	6,52±1,13	0,57±0,07
М'язи	7,26±0,36	1,05±0,18	8,01±1,17
Кістки	2,86±0,14	3,34±0,42	9,53±1,08
Шкіра	2,86±0,14	4,13±0,76	11,75±1,82
Кишечник	2,84±0,19	2,74±0,34	3,80±0,30
Сеча	-	-	4,29
Фекалії	-	-	7,67
		Разом	79,72±3,23

Кількість мишей = 5  
Середня вага = 19,07±0,91грам

Таблиця 8

Розподіл активності через 72 години після В. В. введення  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК у нормальних BALB/c мишей.  
Середнє значення  $\pm$  СВ

Зразок	Вага органу Грам	% ВД/ Грам	% ВД на орган
Кров	1,35 $\pm$ 0,02	15,40 $\pm$ 1,63	20,71 $\pm$ 2,13
Серце	0,088 $\pm$ 0,01	3,12 $\pm$ 0,24	0,28 $\pm$ 0,01
Легені (2)	0,142 $\pm$ 0,01	8,23 $\pm$ 1,05	1,17 $\pm$ 0,20
Нирка (1)	0,123 $\pm$ 0,01	6,45 $\pm$ 0,57	0,79 $\pm$ 0,07
Печінка	0,02 $\pm$ 0,06	8,39 $\pm$ 1,04	8,58 $\pm$ 1,31
Селезінка	0,103 $\pm$ 0,01	5,90 $\pm$ 1,19	0,59 $\pm$ 0,08
М'язи	7,68 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 0,15	7,73 $\pm$ 1,05
Кістки	2,88 $\pm$ 0,05	3,20 $\pm$ 0,25	9,20 $\pm$ 0,61
Шкіра	2,88 $\pm$ 0,05	3,97 $\pm$ 0,49	11,42 $\pm$ 1,36
Кишечник	2,86 $\pm$ 0,18	2,90 $\pm$ 0,65	4,06 $\pm$ 0,93
Сеча	-	-	3,00
Фекалії	-	-	11,08
		Разом	78,62 $\pm$ 2,63

Кількість мишей = 5

Середня вага = 19,21 $\pm$ 0,27грам

Схожим способом призначали або обчислювали інші величини біологічних періодів напіврозпаду, використовуючи стандартні рівняння для обчислення  $t_{1/2}$  для експонентного розпаду. Коли ці величини були визначені, змінні  $T_{ue}$ ,  $T_{e1}$ ,  $T_{e2}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ , і  $A$ , перелічені в Таблицях 9 і 10, визначали для кожного радіоміченого кон'югату, використовуючи рівняння, наведені в верхній частині цих таблиць (вихідні змінні). Ці величини, а також ті, що наведені в наступних таблицях, обчислювали, використовуючи програму, написану в електронній таблиці Symphony spreadsheet (Lotus Development Corp.) Mr. Phillip Hagan, MS, Nuclear Medicine Service, VA Medical Center, La Jolla, CA 92161.

Таблиця 9

**Вхідні змінні**

$A_0$  = Введена доза  $T_{ue}$  = Ефективний напівперіод поглинання  
 $T_p$  = Фізичний період напіврозпаду радіонукліду  
 $T_u$  = Біологічний напівперіод поглинання  
 $T_{b1}$  = Біологічний напівперіод зникнення першого компоненту  
 $T_{b2}$  = Біологічний напівперіод зникнення другого компоненту  
 $f_1$  = Частина  $A_0$  з біологічним напівперіодом  $T_{b1}$   
 $f_2$  = Частина  $A_0$  з біологічним напівперіодом  $T_{b2}$   
 $S$  = Середня Доза/Одиницю Кумульованої Активності

**Вихідні змінні**

$T_{e1}$  = Ефективний напівперіод зникнення першого компоненту  
 $T_{e2}$  = Ефективний напівперіод зникнення другого компоненту  
 $A_1$  = Кумульована активність першого компоненту  
 $A_2$  = Кумульована активність другого компоненту  
 $A$  = Загальна кумульована активність  
 $T_{ue} = T_u * T_p / (T_u + T_p)$   $A_1 = 1,44 * f_1 * A_0 * T_{e1} * (T_{ue} / T_u)$   
 $T_{e1} = T_{b1} * T_p / (T_{b1} + T_p)$   $A_2 = 1,44 * f_2 * A_0 * T_{e2}$   
 $T_{e2} = T_{b2} * T_p / (T_{b2} + T_p)$   $A = A_1 + A_2$

Приклад:  $A_1$  для печінки -  $1,44 * 11,000\% * 1000 * 63,2 * 1,00 = 10007,5$  мікрокурі кумульованої активності

Таблиця вхідних та вихідних величин, які використані для оцінки кумульованої активності ( $A$ )

	$T_u$ (годин)	$f_1$	$f_2$	$T_{b1}$ (г.)	$T_{b2}$ (г.)	$T_{ue}$ (г.)	$T_{e1}$ (г.)	$T_{e2}$ (г.)	$A_1$ ( $\mu\text{Ki}$ -г.)	$A_2$ ( $\mu\text{Ki}$ -г.)	$A$ ( $\mu\text{Ki}$ -г.)
Надниркова залоза	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Вміст міхура	2,78E-04	1,000%	0,00%	4	0	2,78E-04	3,8	0,0	54,4	0,0	54
Вміст шлунку	2,78E-04	6,650%	0,00%	1,5	0	2,78E-04	1,5	0,0	140,5	0,0	141
Вміст тонкого кишечнику	2,78E-04	6,650%	0,00%	3,5	0	2,78E-04	3,3	0,0	318,6	0,0	319
Вміст ВТК*	2,78E-04	6,650%	0,00%	4,5	0	2,78E-04	4,2	0,0	404,0	0,0	404
Вміст НТК**	2,78E-04	6,650%	0,00%	4,2	0	2,78E-04	4,0	0,0	378,6	0,0	379
Нирки	2,78E-04	1,220%	0,00%	35	0	2,78E-04	23,0	0,0	404,8	0,0	405
Печінка	2,78E-04	11,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	10007,5	0,0	10008
Легені	2,78E-04	2,100%	1,20%	30	1000	2,78E-04	20,8	63,2	627,9	1091,7	1720
Інші тканин (Разом)	2,78E-04	0,000%									

\*ВТК – Верхня частина товстого кишечника; \*\*НТК – Нижня частина товстого кишечника

	Tu (годин)	f1	f2	Tb1 (г.)	Tb2 (г.)	Tue (г.)	Te1 (г.)	Te2 (г.)	A1 (yKi-г.)	A2 (yKi-г.)	A (yKi-г.)
М'язи	2,78E-04	10,400%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	9461,7	0,0	9462
Жирова тканина	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Кров	2,78E-04	58,400%	32,22%	15	1000	2,78E-04	12,3	63,2	10319,2	29313,1	39632
Мозок	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Серце	2,78E-04	0,510%	0,38%	57	1000	2,78E-04	30,9	63,2	226,9	345,7	573
Яечники	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Підшлункова залоза	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Кістяк (Разом)	2,78E-04	0,000%									
Трубчаста кістка	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Зріла кісткова тканина	2,78E-04	9,100%	6,30%	45	1000	2,78E-04	27,0	63,2	3536,8	5731,6	9268
Кістковий мозок	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
(Червоний)											
Кістковий мозок	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
(Жовтий)											
Хрящі	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Інші складові	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Шкіра	2,78E-04	11,770%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	10708,1	0,0	10708
Селезінка	2,78E-04	0,610%	0,40%	39	1000	2,78E-04	24,7	63,2	217,1	363,9	581
Яечка	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Щитовидна залоза	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Тіло разом	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000							

Таблиця 10

#### Вхідні змінні

A0 = Введена доза  
 Tr = Фізичний період напіврозпаду радіонуклідів  
 Tu = Біологічний напівперіод поглинання  
 Tb1 = Біологічний напівперіод зникнення першого компоненту  
 Tb2 = Біологічний напівперіод зникнення другого компоненту  
 f1 = Частина A0 з біологічним напівперіодом Tb1  
 f2 = Частина A0 з біологічним напівперіодом Tb2  
 S = Середня Доза/Одиницю Кумульованої Активності

#### Вихідні змінні

Te1 = Ефективний напівперіод зникнення першого компоненту  
 Te2 = Ефективний напівперіод зникнення другого компоненту  
 A1 = Кумульована активність першого компоненту  
 A2 = Кумульована активність другого компоненту  
 A = Загальна кумульована активність  
 $Tue = Tu * Tr / (Tu + Tr)$   
 $A1 = 1,44 * f1 * A0 * Te1 * (Tue / Tu)$   
 $Te1 = Tb1 * Tr / (Tb1 + Tr)$   
 $A2 = 1,44 * f2 * A0 * Te2$   
 $Te2 = Tb2 * Tr / (Tb2 + Tr)$   
 $A = A1 + A2$

Приклад: A1 для печінки -  $1,44 * 9,000\% * 1000 * 60,2 * 1,00 = 7795,5$  мікрокурі кумульованої активності  
 Таблиця вхідних та вихідних величин, які використані для оцінки кумульованої активності (A)

	Tu (годин)	f1	f2	Tb1 (г.)	Tb2 (г.)	Tue (г.)	Te1 (г.)	Te2 (г.)	A1 (yKi-г.)	A2 (yKi-г.)	A (yKi-г.)
Надниркова залоза	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Вміст міхура	2,78E-04	1,000%	0,00%	4	0	2,78E-04	3,8	0,0	54,2	0,0	54
Вміст шлунку	2,78E-04	4,220%	0,00%	1,5	0	2,78E-04	1,5	0,0	89,1	0,0	89
Вміст тонкого кишечника	2,78E-04	4,220%	0,00%	3,5	0	2,78E-04	3,3	0,0	201,7	0,0	202
Вміст ВТК*	2,78E-04	4,220%	0,00%	4,5	0	2,78E-04	4,2	0,0	255,5	0,0	255
Вміст НТК**	2,78E-04	4,220%	0,00%	4,2	0	2,78E-04	3,9	0,0	239,5	0,0	240
Нирки	2,78E-04	1,150%	0,87%	70	1000	2,78E-04	33,4	60,2	553,6	753,6	1307
Печінка	2,78E-04	9,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	7795,5	0,0	7795
Легені	2,78E-04	2,100%	1,20%	30	1000	2,78E-04	20,8	63,2	627,9	1091,7	1720
Інші тканин (Разом)	2,78E-04	0,000%									

\*ВТК – Верхня частина товстого кишечника; \*\*НТК – Нижня частина товстого кишечника

	Tu (годин)	f1	f2	Tb1 (г.)	Tb2 (г.)	Tue (г.)	Te1 (г.)	Te2 (г.)	A1 (yKi-г.)	A2 (yKi-г.)	A (yKi-г.)
М'язи	2,78E-04	8,720%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	7552,9	0,0	7553
Жирова тканина	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Кров	2,78E-04	49,770%	25,90%	13	1000	2,78E-04	10,8	60,2	7743,9	22433,7	30178
Мозок	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Серце	2,78E-04	0,500%	0,36%	51	1000	2,78E-04	28,4	60,2	204,4	311,8	516
Яечники	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Підшлункова залоза	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Кістяк (Разом)	2,78E-04	0,000%									
Трубчаста кістка	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Зріла кісткова тканина	2,78E-04	11,890%	9,28%	67	1000	2,78E-04	32,7	60,2	5604,4	8038,0	13642
Кістковий мозок	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
(Червоний)											
Кістковий мозок	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
(Жовтий)											
Хрящі	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Інші складові	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Шкіра	2,78E-04	15,600%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	13512,1	0,0	13512
Селезінка	2,78E-04	0,740%	0,56%	60	1000	2,78E-04	31,0	60,2	330,0	485,1	815
Яечка	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Щитовидна залоза	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Тіло разом	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0

Використовуючи значення Загальної Кумульованої Активності (A) з Таблиць 9 і 10, значення S, які надані MIRД Pamphlet Number 11 (Таблиці 11 і 12, 13 і 14), оцінки адсорбованої дози радіації визначали для кожного радіоміченого кон'югату для перелічених тканин (Таблиці 15, 16, 17 і 18). В визначеннях оцінок сумарної дози радіації для індій-міченого кон'югату, перелічених в Таблиці 19, дозу даного органу

підсумовували з адсорбованою дозою, яка генерована активністю в прилягаючих органах або тканинах. Однак в обчисленнях величин оцінки доз радіації, які характеризували ітрій-мічений кон'югат (Таблиця 20), для перелічених тканин (наприклад, надниркова залоза) відсутні деякі величини. Це відбувалось через коротшу довжину пробігу вивільненої частинки <sup>131</sup>I, по відношенню до довжини пробігу емітованої <sup>90</sup>Y частинки, і тому забезпечується незначний вклад активності від прилягаючих тканин, і через відсутність первинних даних біорозподілення для цих тканин.

Таблиця 11

С. адсорбована доза на одиницю кумульованої активності, (RAD/UCI-H)

Індій-[<sup>111</sup>In] період напіврозпаду 67,44 годин.

Органи-цілі	Надниркова залоза	Вміст міхура	Органи-джерела							
			Кишковий Тракт				Нирки	Печінка	Легені	Інші Тканини (М'язи)
			Шлунок	Si	ВТК	НТК				
			Вміст	Вміст	Вміст	Вміст				
Надниркова залоза	7,4E-03	5,7E-07	7,3E-06	4,4E-06	2,8E-06	1,3E-06	3,4E-05	1,5E-05	7,6E-06	4,8E-06
Стінка міхуру	3,6E-07	4,5E-04	7,5E-07	8,0E-06	6,4E-06	2,0E-05	9,3E-07	5,2E-07	1,5E-07	5,5E-06
Кістки	5,2E-06	2,3E-06	2,3E-06	3,2E-06	2,9E-06	4,2E-06	3,7E-06	2,9E-06	3,8E-06	3,2E-06
GI (Стінка шлунку)	8,8E-06	8,5E-07	3,4E-04	1, 1E-05	1,2E-05	5,4E-06	1,0E-05	5,8E-06	5,7E-06	4,3E-06
GI (SI)	2,5E-06	8,6E-06	7,9E-06	2, 1E-04	5,4E-05	3,0E-05	8,6E-06	5,0E-06	6, 1E-07	4,8E-06
GI (Стінка ВТК)	2,8E-06	6,9E-06	1, 1E-05	8,3E-05	3,3E-04	1,4E-05	8,6E-06	7,5E-06	7,4E-07	5,0E-06
GI (Стінка НТК)	7,1E-07	2,2E-05	3,8E-06	2,4E-05	9,5E-06	4,7E-04	2,5E-06	7,3E-07	3,0E-07	5,2E-06

Органи-цілі	Надниркова залоза	Вміст міхура	Органи-джерела							
			Кишковий Тракт				Нирки	Печінка	Легені	Інші Тканини (М'язи)
			Шлунок	Si	ВТК	НТК				
			Вміст	Вміст	Вміст	Вміст				
Нирки	3,7E-05	8,5E-07	1,1E-05	9,2E-06	8,3E-06	2,8E-06	5,2E-04	1,2E-05	2,7E-06	4,4E-06
Печінка	1,5E-05	6,3E-07	5,9E-06	5,6E-06	7,8E-06	8,4E-07	1,2E-05	1,3E-04	7,7E-06	3,4E-06
Легені	7,6E-06	8,2E-08	5,2E-06	7,5E-07	8,3E-07	2,6E-07	2,5E-06	7,8E-06	1,4E-04	4,2E-06
Кістковий мозок (Червоний)	9,4E-06	5,3E-06	4,0E-06	1,1E-05	9, 1E-06	1,3E-05	9,6E-06	4,1E-06	4,8E-06	5,3E-06
Ін. Тк. (М'язи)	4,8E-06	5,5E-06	4,3E-06	4,8E-06	4,5E-06	5,2E-06	4,4E-06	3,4E-06	4,4E-06	7,5E-06
Яєчники	1,8E-06	2,3E-05	1,3E-06	3,3E-05	3,7E-05	6,4E-05	3,6E-06	1,4E-06	3,6E-07	6,3E-06
Підшлункова залоза	2,6E-05	8,6E-07	5,7E-05	6, 1E-06	7,1E-06	2, 1E-06	2,0E-05	1,2E-05	7,7E-06	5,7E-06
Шкіра	1,8E-06	1,7E-06	1,4E-06	1,4E-06	1,4E-06	1,6E-06	1,8E-06	1,6E-06	1,8E-06	2,5E-06
Селезінка	2,0E-05	7,6E-07	3, 1E-05	4,6E-06	4,2E-06	2,4E-06	2,8E-05	2,8E-06	7,1E-06	4,6E-06

Яєчка	1,4E-07	1,4E-05	1,8E-07	1,0E-06	9,8E-07	5,9E-06	3,4E-07	2,5E-07	3,9E-08	3,6E-06
Щитовидна залоза	4,7E-07	1,2E-08	3,5E-07	6,9E-08	7,5E-08	2,7E-08	2,0E-07	6,2E-07	2,6E-06	4,3E-06

Органи-джерела										
Органи-цілі	Надниркова залоза	Вміст міхура	Кишковий Тракт				Нирки	Печінка	Легені	Інші Тканини (М'язи)
			Шлунок	Si	ВТК	НТК				
			Вміст	Вміст	Вміст	Вміст				
Матка (NONGRVD)	5,8E-06	4,9E-05	2,4E-06	2,9E-05	1,5E-05	2,1E-05	3,1E-06	1,2E-06	2,8E-07	7,4E-06
Тіло разом	6,6E-06	6,2E-06	6, 1E-06	7,3E-06	6,8E-06	6,9E-06	6,6E-06	6,6E-06	5,9E-06	5,6E-06

Посилання - MIRD PAMPHLET NO. 11, С. 164

**Таблиця 12**  
**С. адсорбована доза на одиницю кумульованої активності, (RAD/UCI-H)**  
**Індій-[111] період напіврозпаду 67,44 годин.**

Органи-джерела										
Органи-цілі	Яєчники	Підшлункова залоза	Кістяк			Шкіра	Селезінка	Яєчка	Щитовидна залоза	Тіло Разом
			Ч. Кістк. Мозок	Зріла кістк. тканина	Трубчас. кістка					
Надниркова залоза	1,1E-06	2,6E-05	7,9E-06	3,9E-06	3,9E-06	2,4E-06	2,0E-05	1,4E-07	4,7E-07	7,0E-06
Стінка міхура	2,1E-05	4,7E-07	2,4E-06	1,5E-06	1,5E-06	1,6E-06	4,7E-07	1,5E-05	1,2E-08	6,9E-06
Кістки	3,8E-06	3,6E-06	1,2E-05	3,0E-05	2,6E-05	2,9E-06	2,9E-06	2,4E-06	2,6E-06	6,9E-06
GI (Стінка шлунку)	2,4E-06	5,9E-05	3,2E-06	1,7E-06	1,1E-06	1,7E-06	3,0E-05	1,5E-07	1,5E-07	7,1E-06
GI (SI)	3,8E-05	5,5E-06	7,9E-06	2,3E-06	2,3E-06	1,5E-06	4,2E-06	1,2E-06	4,2E-08	7,5E-06
GI (Стінка ВТК)	3,7E-05	6,6E-06	6,4E-06	2,2E-06	2,2E-06	1,4E-06	3,8E-06	1,1E-06	3,3E-08	7,0E-06
GI (Стінка НТК)	4,8E-05	1,7E-06	9,0E-06	3,2E-06	3,2E-06	1,5E-06	1,9E-06	8,3E-06	2,2E-08	6,7E-06
Нирки	2,9E-06	1,9E-05	6,8E-06	2,7E-06	2,7E-06	2,0E-06	2,8E-05	1,7E-07	1,2E-07	6,6E-06
Печінка	1,7E-06	1,3E-05	2,9E-06	2,0E-06	2,0E-06	1,7E-06	3,0E-06	1,2E-07	3,5E-07	6,5E-06
Легені	2,2E-07	7,6E-06	3,7E-06	3,0E-06	3,0E-06	1,9E-06	6,9E-06	3,4E-08	2,9E-06	5,9E-06
Кістковий мозок (Червоний)	1,3E-05	6,8E-06	7,5E-05	1,3E-05	2,6E-05	2,7E-06	4,4E-06	1,9E-06	2,9E-06	7,7E-06
Ін. Тк. (М'язи)	6,3E-06	5,7E-06	3,8E-06	3,2E-06	3,2E-06	2,5E-06	4,6E-06	3,6E-06	4,3E-06	5,6E-06

Органи-джерела										
Органи-цілі	Яєчники	Підшлункова залоза	Кістяк			Шкіра	Селезінка	Яєчка	Щитовидна залоза	Тіло Разом
			Ч. Кістк. Мозок	Зріла кістк. тканина	Трубчас. кістка					
Яєчники	1,0E-02	1,0E-06	7,7E-06	2,2E-06	2,2E-06	1,4E-06	1,7E-06	0,0E+00	2,5E-08	7,0E-06
Підшлункова залоза	1,5E-06	1,6E-03	4,9E-06	3,1E-06	3,1E-06	1,7E-06	6,1E-05	2,1E-07	3,0E-07	7,8E-06
Шкіра	1,4E-06	1,3E-06	2,0E-06	2,3E-06	2,3E-06	3,7E-05	1,5E-06	4,9E-06	2,5E-06	3,7E-06
Селезінка	1,6E-06	6,2E-05	2,7E-06	2,0E-06	2,0E-06	1,7E-06	9,1E-04	8,9E-08	3,5E-07	6,8E-06
Яєчка	0,0E+00	2,1E-07	1,0E-06	1,9E-06	1,9E-06	3,4E-06	2,0E-07	3,6E-03	3,3E-09	4,9E-06
Щитовидна залоза	2,5E-08	4,5E-07	2,2E-06	2,8E-06	2,8E-06	2,4E-06	3,4E-07	3,3E-09	5,8E-03	5,2E-06
Матка (NONGRVO)	6,5E-05	1,9E-06	6,7E-06	1,8E-06	1,8E-06	1,2E-06	1,2E-06	0,0E+00	2,4E-08	7,8E-06
Тіло разом	7,7E-06	7,5E-06	6,4E-06	5,9E-06	5,9E-06	3,8E-06	6,6E-06	5,6E-06	5,3E-06	5,8E-06

Посилання - MIRD PAMPHLET NO. 11, С. 165

Таблиця 13

С. адсорбована доза на одиницю кумульованої активності, (RAD/UCI-H)

Ігрій-[90] період напіврозпаду 64 годин.

Органи-цілі	Надниркова залоза	Вміст міхуру	Органи-джерела				Нирки	Печінка	Легені	Інші Тканини (М'язи)
			Кишковий Тракт							
			Шлунок Вміст	Si Вміст	ВТК Вміст	НТК Вміст				
Надниркова залоза	1,4E-01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Стінка міхура	0,0	5,0E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Кістки	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (Стінка шлунку)	0,0	0,0	4,0E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (SI)	0,0	0,0	0,0	2,5E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (Стінка ВТК)	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (Стінка НТК)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4E-03	0,0	0,0	0,0	0,0
Нирки	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,4E-03	0,0	0,0	0,0
Печінка	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1E-03	0,0	0,0
Легені	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0E-03	0,0
Кістковий мозок (Червоний)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Органи-цілі	Надниркова залоза	Вміст міхуру	Органи-джерела				Нирки	Печінка	Легені	Інші Тканини (М'язи)
			Кишковий Тракт							
			Шлунок Вміст	Si Вміст	ВТК Вміст	НТК Вміст				
Ін. Тк. (М'язи)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7, 1E-05
Яєчники	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Підшлункова залоза	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Шкіра	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Селезінка	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Яєчка	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Щитовидна залоза	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Матка (NONGRVD)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Тіло разом	2,8E-05	3,2E-06	8,5E-05	2,3E-05	1,4E-05	1,7E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05

Посилання - MIRD PAMPHLET NO. 11, С. 144



Таблиця 14

С. адсорбована доза на одиницю кумульованої активності, (RAD/UCI-H)

Ітрій-[90] період напіврозпаду 64 годин.

Органи-джерела										
Органи-цілі	Яєчники	Підшлункова залоза	Кістяк			Шкіра	Селезінка	Яєчка	Щитовидна залоза	Тіло Разом
			Ч. Кістк. Мозок	Зріла кістк. тканина	Трубчас. кістка					
Надниркова залоза	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Стінка міхура	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Кістки	0,0	0,0	1, 1E-04	4,0E-04	2,3E-04	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
GI (Стінка шлунку)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
GI (SI)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
GI (Стінка ВТК)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
GI (Стінка НТК)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Нирки	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Печінка	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Легені	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Кістковий мозок (Червоний)	0,0	0,0	8,6E-04	3,3E-05	5,7E-04	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Ін. Тк. (М'язи)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Органи-джерела										
Органи-цілі	Яєчники	Підшлункова залоза	Кістяк			Шкіра	Селезінка	Яєчка	Щитовидна залоза	Тіло Разом
			Ч. Кістк. Мозок	Зріла кістк. тканина	Трубчас. кістка					
Яєчники	1,8E-01	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Підшлункова залоза	0,0	2,0E-02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Шкіра	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6E-04	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Селезінка	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1E-02	0,0	0,0	2,8E-05
Яєчка	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,7E-02	0,0	2,8E-05
Щитовидна залоза	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,9E-02	2,8E-05
Матка (NONGRVO)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Тіло разом	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05

Посилання - MIRD PAMPHLET NO. 11, С. 145

Таблиця 15

Адсорбована доза радіації (RAD = A \* S)

Індій [111] період напіврозпаду 67,44 години.

Органи-джерела										
Органи-цілі	Надниркова залоза	Вміст міхура	Кишковий Тракт				Нирки	Печінка	Легені	Інші Тканини (М'язи)
			Шлунок	Si	BTK	HTK				
			Вміст	Вміст	Вміст	Вміст				
Надниркова залоза	0,0E+00	3,1E-05	1,0E-03	1,4E-03	1,1E-03	4,9E-04	1,4E-02	1,5E-01	1,3E-02	2,4E-01
Стінка міхура	0,0E+00	2,4E-02	1,1E-04	2,5E-03	2,6E-03	7,6E-03	3,8E-04	5,2E-03	2,6E-04	2,7E-01
GI (Стінка шлунку)	0,0E+00	4,6E-05	4,8E-02	3,5E-03	2,2E-02	2,0E-03	4,0E-03	5,8E-02	9,8E-03	2,1E-01
GI (SI)	0,0E+00	4,7E-04	1,1E-03	6,7E-03	2,2E-02	1,1E-02	3,5E-03	5,0E-02	1,0E-03	2,4E-01
GI (Стінка BTK)	0,0E+00	3,8E-04	1,5E-03	2,6E-02	1,3E-01	5,3E-03	3,5E-03	7,5E-02	1,3E-03	2,5E-01
GI (Стінка HTK)	0,0E+00	1,2E-03	5,3E-04	7,6E-03	3,8E-03	1,8E-01	1,0E-03	7,3E-03	5,2E-04	2,6E-01
Нирки	0,0E+00	4,6E-05	1,5E-03	2,9E-03	3,4E-03	1,1E-03	2,1E-01	1,2E-01	4,6E-03	2,2E-01
Печінка	0,0E+00	3,4E-05	8,3E-04	1,8E-03	3,2E-03	3,2E-04	4,9E-03	1,3E+00	1,3E-02	1,7E-01
Легені	0,0E+00	4,5E-06	7,3E-04	2,4E-04	3,4E-04	9,8E-05	1,0E-03	7,8E-02	2,4E-01	2,1E-01
Інші Тканини										
М'язи	0,0E+00	3,0E-04	6,0E-04	1,5E-03	1,8E-03	2,0E-03	1,8E-03	3,4E-02	7,6E-03	3,7E-01

Органи-джерела										
Органи-цілі	Надниркова залоза	Вміст міхура	Кишковий Тракт				Нирки	Печінка	Легені	Інші Тканини (М'язи)
			Шлунок	Si	BTK	HTK				
			Вміст	Вміст	Вміст	Вміст				
Жирова тканина	0,0E+00	3,0E-04	6,0E-04	1,5E-03	1,8E-03	2,0E-03	1,8E-03	3,4E-02	7,6E-03	3,7E-01
Кров	0,0E+00	3,0E-04	6,0E-04	1,5E-03	1,8E-03	2,0E-03	1,8E-03	3,4E-02	7,6E-03	3,7E-01
Мозок	0,0E+00	3,0E-04	6,0E-04	1,5E-03	1,8E-03	2,0E-03	1,8E-03	3,4E-02	7,6E-03	3,7E-01
Серце	0,0E+00	4,1E-05	4,4E-03	1,5E-03	1,7E-03	9,1E-04	1,1E-02	2,8E-02	1,2E-02	3,7E-01
Яєчники	0,0E+00	1,3E-03	1,8E-04	1,1E-02	1,5E-02	2,4E-02	1,5E-03	1,4E-02	6,2E-04	2,8E-01
Підшлункова залоза	0,0E+00	4,7E-05	8,0E-03	1,9E-03	2,9E-03	8,0E-04	8,1E-03	1,2E-01	1,3E-02	1,2E-01
Кістяк										
Зріла кісткова тканина	0,0E+00	1,3E-04	3,2E-04	1,0E-03	1,2E-03	1,6E-03	1,5E-03	2,9E-02	6,5E-03	1,6E-01
Трубчаста кістка	0,0E+00	1,3E-04	3,2E-04	1,0E-03	1,2E-03	1,6E-03	1,5E-03	2,9E-02	6,5E-03	1,6E-01
Кістковий (Червоний)	мозок 0,0E+00	2,9E-04	5,6E-04	3,5E-03	3,7E-03	4,6E-03	3,9E-03	4,1E-02	8,3E-03	2,6E-01
Кістковий (Жовтий)	мозок 0,0E+00	2,9E-04	5,6E-04	3,5E-03	3,7E-03	4,9E-03	3,9E-03	4,1E-02	8,3E-03	2,6E-01
Хрящі	0,0E+00	1,3E-04	3,2E-04	1,0E-03	1,2E-03	1,6E-03	1,5E-03	2,9E-02	6,5E-03	1,6E-01
Інші складові	0,0E+00	1,3E-04	3,2E-04	1,0E-03	1,2E-03	1,6E-03	1,5E-03	2,9E-02	6,5E-03	1,6E-01
Шкіра	0,0E+00	9,2E-05	2,0E-04	4,5E-04	5,7E-04	6,1E-04	7,3E-04	1,6E-02	3,1E-03	1,2E-01

Органи-джерела										
Органи-цілі	Надниркова залоза	Вміст міхура	Кишковий Тракт				Нирки	Печінка	Легені	Інші Тканини (М'язи)
			Шлунок	Si	BTK	HTK				
			Вміст	Вміст	Вміст	Вміст				
Селезінка	0,0E+00	4,1E-05	4,4E-03	1,5E-03	1,7E-03	9,1E-04	1,1E-02	2,8E-02	1,2E-02	2,3E-01
Яєчка	0,0E+00	7,6E-04	2,5E-05	3,2E-04	4,0E-04	2,2E-03	1,4E-04	2,5E-03	6,7E-05	1,8E-01
Щитовидна залоза	0,0E+00	6,5E-07	4,9E-05	2,2E-05	3,0E-05	1,0E-05	8,1E-05	6,2E-03	4,5E-03	2,1E-01
Матка (NONGRVD)	0,0E+00	3,4E-04	8,6E-04	2,3E-03	2,7E-03	2,6E-03	2,7E-03	6,6E-02	1,0E-02	3,7E-01
Тіло разом	0,0E+00	2,7E-03	3,4E-04	9,2E-04	6,1E-03	8,0E-03	1,3E-03	1,2E-02	4,8E-04	2,8E-01

Таблиця 16

Адсорбована доза радіації (RAD = A \* S)

Індій [111] період напіврозпаду 67,44 години.

Органи-джерела										
Органи-цілі	Яєчники	Підшлункова залоза	Кістяк			Шкіра	Селезінка	Яєчка	Щитовидна залоза	Тіло Разом
			Ч. Кістк. Мозок	Зріла кістк. тканина	Трубчас. кістка					
Надниркова залоза	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,6E-02	2,6E-02	1,2E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Стінка міхура	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+0	1,4E-02	1,7E-02	2,7E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (Стінка шлунку)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,6E-02	1,8E-02	1,7E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (SI)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,1E-02	1,6E-02	2,4E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (Стінка ВТК)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,0E-02	1,5E-02	2,2E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Органи-джерела										
Органи-цілі	Яєчники	Підшлункова залоза	Кістяк			Шкіра	Селезінка	Яєчка	Щитовидна залоза	Тіло Разом
			Ч. Кістк. Мозок	Зріла кістк. тканина	Трубчас. кістка					
GI (Стінка НТК)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	1,6E-02	1,1E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Нирки	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,5E-02	2,1E-02	1,6E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Печінка	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,9E-02	1,8E-02	1,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Легені	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,8E-02	2,0E-02	4,0E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Інші Тканини										
М'язи	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-02	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Жирова тканина	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-02	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Кров	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-02	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Мозок	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-02	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Органи-джерела										
Органи-цілі	Яєчники	Підшлу нкова залоза	Кістяк			Шкіра	Селезін ка	Яєчка	Щитови дна залоза	Тіло Разом
			Ч. Кістк. Мозок	Зріла кістк. тканина	Трубчас. кістка					
Серце	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-02	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Яєчники	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,0E-02	1,5E-02	9,9E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Підшлункова залоза	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,9E-02	1,8E-02	3,5E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Кістяк										
Зріла кісткова тканина	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,4E-01	3,1E-02	1,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Трубчаста кістка	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,4E-01	3,1E-02	1,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Кістковий (Червоний)	мозок 0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,4E-01	2,9E-02	2,6E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Кістковий (Жовтий)	мозок 0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,4E-01	2,9E-02	2,6E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Хрящі	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,4E-01	3,1E-02	1,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Органи-джерела										
Органи-цілі	Яєчники	Підшлу нкова залоза	Кістяк			Шкіра	Селезін ка	Яєчка	Щитови дна залоза	Тіло Разом
			Ч. Кістк. Мозок	Зріла кістк. тканина	Трубчас. кістка					
Інші складові	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,4E-01	3,1E-02	1,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Шкіра	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,1E-02	4,0E-01	8,7E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Селезінка	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,9E-02	1,8E-02	5,3E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Яєчка	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,8E-02	3,6E-02	1,2E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Щитовидна залоза	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,6E-02	2,6E-02	2,0E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Матка (NONGRVD)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,7E-02	0,0E+00	7,0E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Тіло разом	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	5,5E-02	4,1E-02	3,8E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Ітрій [90] період напіврозпаду 64 години.

[illegible]

[illegible]

Органи-джерела										
Органи-цілі	Яєчники	Підшлункова залоза	Кістяк			Шкіра	Селезінка	Яєчка	Щитовидна залоза	Тіло Разом
			Ч. Кістк. Мозок	Зріла кістк. тканина	Трубчас. кістка					
М'язи	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Жирова тканина	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Кров	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Мозок	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Серце	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Яєчники	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Підшлункова залоза	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Кістяк										
Зріла кісткова тканина	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,1E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Трубчаста кістка	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,1E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Кістковий мозок (Червоний)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	7,8E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Кістковий мозок (Жовтий)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	7,8E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Хрящі	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,1E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Інші складові	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,1E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Органи-джерела										
Органи-цілі	Яєчники	Підшлункова залоза	Кістяк			Шкіра	Селезінка	Яєчка	Щитовидна залоза	Тіло Разом
			Ч. Кістк. Мозок	Зріла кістк. тканина	Трубчас. кістка					
Шкіра	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,0E+01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Селезінка	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	9,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Яєчка	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Щитовидна залоза	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Матка (NONGRVD)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Тіло разом	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,8E-01	3,8E+01	2,3E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Таблиця 19

Результати оцінки дози радіації з введеного Індій-[111] міченого 2B8-MX, рівномірно розподіленого в стандартній людині (70кг), і на основі даних розподілення у тварин через 72 години після ін'єкції

Кількість активності = 1000 мікроКюрі/Доза пацієнту			
	Рад		Рад
Надниркова залоза	0,493	Яєчники	0,387
Стінка міхуру	0,348	Підшлункова залоза	0,362
Стінка шлунку	0,412	Кістяк	
Тонкий кишечник	0,434	Зріла кісткова тканина	0,474
Стінка ВТК	0,533	Трубчаста кістка	0,474
Стінка НТК	0,505	Кістковий мозок (Червоний)	0,602
Нирки	0,625	Кістковий мозок (Жовтий)	0,602
Печінка	1,533	Хрящі	0,474
Легені	0,582	Інші складові	0,474
Інші тканини		Шкіра	0,564
М'язи		Селезінка	0,854
Жирова тканина		Яєчка	0,239
Кров		Щитовидна залоза	0,276
Мозок		Матка (NONGRVD)	0,473
Серце		Тіло разом	0,417

Посилання: A Schema for Absorbed-dose Calculation for Biologically Distributed Radionuclides, MIRD J. of Nucl. Med./Suppl. #1, 2/68  
Обчислення виконували, використовуючи шаблон електронної таблиці Symphony (Lotus Development Corporation), який створив Phillip L. Hagan, MS Nuclear Medicine Service VA Hospital San Diego, CA 92161

Таблиця 20

Результати оцінки дози радіації з введеного Ітрій-[90] міченого 2B8-MX, рівномірно розподіленого в стандартній людині (70кг), і на основі даних розподілення у тварин через 72 години після ін'єкції

Кількість активності = 1000 мікроКюрі/Доза пацієнту
---

	Рад		Рад
Надниркова залоза	0,000	Яєчники	0,000
Стінка міхуру	0,271	Підшлункова залоза	0,000
Стінка шлунку	0,356	Кістяк	
Тонкий кишечник	0,504	Зріла кісткова тканина	3,138
Стінка ВТК	1,150	Трубчаста кістка	3,138
Стінка НТК	1,772	Кістковий мозок (Червоний)	7,776
Нирки	8,366	Кістковий мозок (Жовтий)	7,776
Печінка	8,575	Хрящі	3,138
Легені	2,079	Інші складові	3,138
Інші тканини		Шкіра	10,269
М'язи	2,716	Селезінка	8,965
Жирова тканина	2,716	Яєчка	0,000
Кров	2,716	Щитовидна залоза	0,000
Мозок	2,716	Матка (NONGRVD)	0,304
Серце	2,176	Тіло разом	1,854

Посилання: A Schema for Absorbed-dose Calculation for Biologically Distributed Radionuclides, MIRD J. of Nucl. Med./Suppl. #1, 2/68

Обчислення виконували, використовуючи шаблон електронної таблиці Symphony (Lotus Development Corporation), який створив Phillip L Hagan, MS Nuclear Medicine Service VA Hospital San Diego, CA 92161

## 1. II. Результати

### A. In Vitro Дослідження 2B8 і 2B8-MX-ДТПК

1. Продегування і характеризування анти-CD20 антитіла 2B8 Всього дев'ять злиттів дали в результаті три гібридоми, які продукували антитіла, що ефективно конкурували з радіоміченим антитілом Coulter B1, В кожному випадку гібридому розсіювали в 24-лунковий планшет. У перших двох антитіл, виділених з злиттів 3 та 4, було визначено ізотип і обидва були ідентифіковані як IgM. Третє антитіло, отримане в злитті 5 і позначене 2B8, було визначено як IgG1 каппа ізотип і було обрано для подальших досліджень. Клон 2B8,H11 розмножили і помістили на тривале зберігання в рідкий азот. Клон 2B8,H11 був субклонований з метою отримання клону 2B8,H11,G3, і знову для отримання клону 2B8, H11, G3, G9. Цей клон розмножили для подальших досліджень і антитіло очищали афінною хроматографією на білку А.

Конкурентний аналіз з використанням неміченого 2B8, B1, Leu 16 і радіоміченого Coulter B1 продемонстрував, що 2B8 було здатне інгібувати зв'язування B1 з CD20 більш ефективно, ніж рівні концентрації як B1, так і Leu 16 (Фіг.1). Схожі результати отримали (дані не показані) в дослідженні конкуренції, використовуючи FITC-кон'юговане 2B8, природний B1 і невідповідні антитіла UPC-10 і S-003 (IgG 2a і 1 ізоטיפи, відповідно).

Пряме зв'язування з клітинним антигеном CD20 антитіл 2B8 і B1 порівнювали FACS аналізом, використовуючи CD20-позитивні SB клітини і CD20-негативні HSB клітини. Результати, представлені на Фіг.2, показують, що для порівнянних кількостей антитіл більше 2B8 ніж B1 було зв'язано з SB клітинами. Спостерігали незначне зв'язування SB клітин з невідповідними антитілами. Спостерігали тільки фонову флуоресценцію з будь-яким реагентом, який використовували з HSB клітинами. Ці результати підтверджують специфічність взаємодії 2B8 з антигеном CD20 і припускають, що 2B8 може мати більш високу спорідненість до клітинного поверхневого антигену, ніж B1.

Для визначення уявної спорідненості 2B8, очищене антитіло мітили радіоізотопом <sup>125</sup>I і зростаючі концентрації міченого антитіла інкубували з антиген-позитивними SB клітинами; радіоактивність, асоційовану з клітинами, визначали після 1 години періоду інкубації (Фіг.3). Результати показують, що антитіло 2B8 зв'язується з антигеном CD20 з константою уявної спорідненості  $4,3 \times 10^{-9}$  M.

Дослідження методом проточної цитометрії людських нормальних лімфоцитів периферійної крові показали, що 2B8 було специфічним до В-клітин і не реагувало з іншими типами лімфоцитів (наприклад, Т-клітинами, моноцитами, макрофагами). FITC-мічене 2B8 порівнювали з B1-FITC і Leu 16-FITC, використовуючи таку ж саму популяцію людських лімфоцитів. Результати, наведені в Таблиці 21, показують, що 2B8 реагувало з приблизно 14 відсотками лімфоцитів периферійної крові проти приблизно 12 відсотків для Leu 16 і 11 відсотків для B1. Популяція лімфоцитів, оснований на іншому маркері В лімфоцитів (CD-19), була (мала величини) між 11 і 14 відсотків. Нарешті, коли людські лімфоцити периферійної крові інкубували з 2B8 і B1 або Leu 16, і потім порахували пофарбовані клітини з маркером CD19 (Becton/Dickinson), подвійно пофарбована популяція В лімфоцитів складала 9 відсотків з 2B8 і 10 відсотків з B1 або Leu 16. Ці результати підтверджують схожість цих реагентів.



Таблиця 21

**Зв'язування 2B8 з людськими лімфоцитами периферійної крові порівняно з іншими В- і Т-лімфоцит специфічними реагентами.**

Маркер Антитіла

А-Одне фарбування: Відсоток CD45-позитивних лімфоцитів

Нема (аутофлуоресценція)	0
B1-FITC (Coulter Immunology, (IgG2a,k)	11
Leu 16-FITC (Becton Dickinson, IgG1,k)	12
2B8-FITC (EDEC, IgG1,k)	14
B72,3-FITC (IgG1,k невідповідний контроль)	4
анти-CD4-FITC (Coulter Immunology)	37
анти-CD3-FITC (Becton Dickinson)	59
анти-CD19-RPE (Becton Dickinson)	11
анти-CD19-FITC (Becton Dickinson)	14

Б. Подвійне фарбування:

B1-FITC/анти CD19-RPE	10
Leu 16-FITC/анти CD19-RPE	10
2B8 FITC/анти CD19-RPE	9
анти-CD19 FITC/анти CD19-RPE	13
B1-FITC/анти Hu Ig RPE	10
2B8-FITC/анти Hu Ig RPE	10
B72,3-FITC/анти Hu Ig RPE	2
Модельна перевірка на лейкоцити (Leucogate 99 Simultest)	

Імунопреципітація радіоміченого клітинного антигену CD20 2B8 або B1 давала в результаті преципітацію нерозрізнених видів дублетних білків з молекулярною вагою приблизно 33 і 35кД (дані не показані).

## 2. Продукування і охарактеризування 2B8-MX-ДТПК

Кон'югат 2B8-MX-ДТПК отримували реакцією антитіла з 4:1 молярним надлишком ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилен-триамінпентаоцтової кислоти (4). Типово, 1-2молі хелату вводили на моль антитіла 2B8. Як показано результатами, представленими на Фіг.4, кон'югат 2B8-MX-ДТПК не показує видимої втрати імунореактивності по відношенню до природного 2B8, тому що обидва антитіла 2B8, природне і кон'юговане, показують фактично ідентичні профілі інгібування B1; величини IC50 для 2B8 і 2B8-MX-ДТПК були приблизно 3 і 4мкг/мл, відповідно. Ці результати були отримані, використовуючи <sup>125</sup>I-мічене антитіло B1 в суцільно-клітинному радіоімунному аналізі, який виконували, використовуючи SB клітини. Схожі результати отримали, використовуючи 2B8 або 2B8-MX-ДТПК, як інгібітори зв'язування <sup>125</sup>I-міченого 2B8 з SB клітинами; як 2B8, так і його MX-ДТПК кон'югат, інгібували зв'язування <sup>125</sup>I-2B8 з SB клітинами в концентраціях приблизно 3-4мкг/мл (дані не показані).

Для оцінки стабільності *in vitro* природне 2B8 антитіло і 2B8-MX-ДТПК кон'югат, зразки в нормальному сольовому розчині або сольовому розчині, який містив 10мМ гліцин-HCl, pH 6,8, інкубували при 4° і 30°C 12 тижнів і аліквоти оцінювали щотижня, використовуючи наступні аналізи: імунореактивність суцільно-клітинним імуноферментним аналізом, SDS-PAGE при відновлюючих і невідновлюючих умовах, і ізоелектрофокусування. В той час, як аналізи імунореактивності не виявили втрат в розпізнаванні антигену зразками антитіл, інкубованих при будь-якій температурі (Фігура 5), діапазон ізоелектрофокусування для антитіла (pH 7,30-8,40 на нульовий тиждень), яке було стабільне при 4°C, показав зменшення на 0,2 одиниці pH при 30°C після шостого тижня (Таблиця 22). Однак цей результат може бути сумнівним, тому що він знаходиться в межах експериментальної помилки для аналізу.

**Таблиця 22**  
**Сумарне рІ 2В8/2В8-МХ-ДТПК**

Тиждень	2В8 4 SAL	2В8 30 SAL	2В8 4 GLY	2В8 30 GLY	2В8-МХ 4 SAL	2В8-МХ 30 SAL	2В8-МХ 4 GLY	2В8-МХ 30 GLY
0	7,46-8,37		7,46-8,37		6,30-8,21		6,30-8,21	
1	7,39-8,24	7,42-8,27	7,46-8,31	7,46-8,24	6,39-8,26	6,39-8,26	6,32-8,24	6,25-8,24
2	7,38-8,27	7,45-8,34	7,45-8,40	7,45-8,34	6,02-8,40	6,02-8,34	6,02-8,40	5,95-8,27
3	7,47-8,35	7,33-8,35	7,40-8,29	7,33-8,29	6,0-8,29	6,0-8,29	6,0-8,22	6,0-8,15
4	7,38-8,24	7,38-8,24	7,38-8,35	7,38-8,28	5,99-8,28	5,99-8,35	5,99-8,35	5,99-8,35
5	7,29-8,25	7,29-8,25	7,37-8,32	7,37-8,32	5,90-8,32	5,90-8,27	5,90-8,32	5,90-8,27
6	7,24-8,12	7,20-8,27	7,27-8,27	7,20-8,12	5,85-8,27	5,85-8,27	5,85-8,27	5,85-7,95
7	7,39-8,32	7,17-8,32	7,35-8,25	7,17-8,47	6,02-8,25		5,95-8,32	5,95-8,32
8	7,33-8,29	7,26-8,36	7,40-8,36		5,86-8,36	5,86-8,36	5,86-8,36	5,86-8,21
9	7,49-8,53	7,26-8,45	7,41-8,45	7,34-8,30	5,93-8,45	5,93-8,45	5,93-8,45	5,93-8,23
10	7,26-8,27	7,19-8,27	7,26-8,27	7,19-8,27	5,95-8,35	5,95-8,35	5,88-8,35	5,95-8,13
11	7,40-8,27	7,18-8,27	7,40-8,35	7,18-8,13	5,93-8,35	5,93-8,27	5,93-8,27	5,93-8,13
12	7,26-8,18	7,04-8,18	7,26-8,18	7,19-8,11	5,90-8,26	5,90-8,18	5,90-8,26	5,90-8,18

Зразки природного 2В8 і 2В8-МХ-ДТПК були приготовані в різних буферах і інкубувалися при 40 або 30°C 12 тижнів. Протягом цього періоду виконували різні аналізи, включаючи визначення ізоелектричної точки. Величини, показані вище, показують діапазон ізоелектричної точки для природного і кон'югованого антитіла, інкубованого при кожній температурі, в кожному складі і для кожного з дванадцяти тижнів дослідження стабільності. Скорочення позначають: 2В8 4 SAL, 2В8, інкубований при 4°C в фізіологічному розчині; 2В8 30 SAL, 2В8, інкубований при 30°C в фізіологічному розчині; 2В8 4 GLY, 2В8, інкубований при 4°C в фізіологічному розчині, який містив 10 мМ гліцину; 2В8 30 GLY, 2В8, інкубований при 30°C в фізіологічному розчині, який містив 10 мМ гліцину; 2В8-МХ 4 SAL; 2В8-МХ-ДТПК (кон'югат), інкубований при 4°C в фізіологічному розчині; 2В8-МХ 30 SAL, 2В8-МХ-ДТПК кон'югат, інкубований при 30°C в фізіологічному розчині; 2В8-МХ 4 GLY, кон'югат, інкубований при 4°C в фізіологічному розчині, який містив 10 мМ гліцину; і 2В8-МХ 30 GLY, кон'югат, інкубований при 30°C в фізіологічному розчині, який містив 10 мМ гліцину.-

Нарешті, використовуючи нередуковану SDS-PAGE, зразки антитіла при 30°C через тиждень показували агрегати високої молекулярної ваги (Таблиця 23). Денситометричний аналіз гелів показав, що агрегати були у від 8 до 17% зразків (Таблиця 23). Проте, коли ці зразки аналізували за допомогою редукованої SDS-PAGE, ознак молекул високої молекулярної ваги, які б свідчили про формування ковалентних агрегатів антитіла при 30°C, знайдено не було. Втрат імунологічної реактивності знову не спостерігали.

Таблиця 23

#### Стабільність In Vitro 2В8

А. Денситометричне сканування гелів нескорочених SDS			
Зразок	Відсотки		
	Висока МВ	Мономер	Низька МВ
Еталон	0	100,00	0
12 тижд/4°C/сольовий розчин	0	95,42	4,58
12 тижд/4°C/гліцин		100,00	0
12 тижд/30°C/сольовий розчин	7,63	83,34	9,03
12 тижд/30°C/гліцин	16,70	72,11	11,18
Б. Денситометричне сканування гелів скорочених SDS			
Еталон	0	100,00	0
12 тижд/30°C/сольовий розчин	0	100,00	0
12 тижд/30°C/гліцин	0	10,00	0

Під час дослідження цієї стабільності зразки 2В8-МХ-ДТПА, які витримували як при 4°C, так і при 30°C, досліджували також за допомогою уведення радіоактивного металу, використовуючи <sup>90</sup>Y. Зразки, що аналізували після 4, 8 та 12 тижнів, містили >90% <sup>90</sup>Y незалежно від температури інкубації.

Нарешті, в окремому дослідженні, водяні розчини 2В8-МХ-ДТПА, що витримували протягом 10 тижнів при 4°C та при 30°C, мітили радіоактивним ізотопом <sup>111</sup>In і оцінювали їх розподіл у тканині мишей лінії BALA/c. Кон'югат від обох температурних інкубацій давав подібний розподіл (дані не наведено). До того ж, отримані результати були подібними до результатів біорозподілу, отриманих для мишей лінії BALA/c при використанні міченого ізотопом <sup>111</sup>In кон'югату, який зберігали при 4°C (див. нижче).

Було виявлено, що протоколи мічення радіоактивним ізотопом для обох ізотопів <sup>111</sup>In та <sup>90</sup>Y є відтворюваними. Зазвичай, вміст радіоізотопів отримували >95% для <sup>111</sup>In та >90% для <sup>90</sup>Y. Питомою активністю для кон'югатів мічених <sup>111</sup>In та <sup>90</sup>Y зазвичай була в діапазоні від 2-3 до 10-15мКі/мг антитіла, відповідно. На початковій стадії розробки протоколів мічення ізотопами <sup>111</sup>In та <sup>90</sup>Y незв'язані радіоізотопи видаляли з міченого 2В8-МХ-ДТПК, використовуючи РХВР гель-проникну хроматографію. В наступних експериментах, хроматографічне очищення міченого індієм кон'югату виключали, через високе радіоінкорпорування (>95%), яке отримували із цими ізотопами.

Імунологічну реактивність мічених <sup>111</sup>In та <sup>90</sup>Y препаратів 2В8-МХ-ДТПК аналізували за допомогою методу Lindmo (3). Встановили, що мічений <sup>111</sup>In 2В8-МХ-ДТПК має 100% імунореактивність (Фіг.6), а мічений <sup>90</sup>Y 2В8-МХ-ДТПК, як було визначено, має 60% імунореактивність (дані не наведено).

#### 3. Характеристика мічених <sup>111</sup>In та <sup>90</sup>Y 2В8-МХ-ДТПК

Попередні експерименти з міченим <sup>90</sup>Y кон'югатом показали, що при питомій активності >10мКі/мг антитіла має місце значне руйнування антитіла та втрата імунологічної реактивності. Через це, для того,

щоб мінімізувати вплив радіолізу, було підбрано склад. Хоча був оцінений ряд низькомолекулярних вільнорадикальних очисників та встановлено, що вони є ефективними, високі концентрації людського сироваткового альбуміну (ЛСА) були значно ефективнішими для збереження цілісності та імунореактивності антитіла (Фігури 7-9).

Мічене  $^{90}\text{Y}$  антитіло вводили до складу 1X PBS, pH 7,4, що містила 75мг/мл ЛСА; додавали також діетилентриамінпентаоцтову кислоту (ДТПК) до кінцевої концентрації 1мМ, щоб упевнитись, що будь-який  $^{90}\text{Y}$ , що може бути втрачений антитілом, був би зв'язаний хелатним комплексом. Розпад 2B8-MX-ДТПК, міченого до питомої активності 14,6мКі/мг, оцінювали через 0 та 48 годин, використовуючи SDS-PAGE та авторадіографію. На Фігурах 8 та 9 показано, що радіомічене антитіло не виявило значного розпаду впродовж 48-годинного періоду при витримці при 4°C. Аналіз з використанням миттєвої тонкошарової хроматографії показав, що втрати  $^{90}\text{Y}$  складають менш ніж 2% протягом 48-годинної витримки (Таблиця 24). Імунореактивність також залишалась відносно сталою на рівні 60% (Таблиця 24).

Таблиця 24

Стабільність підбраного за клінічних умов складу  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК

Час (Години при 4°C)	Відсотки радіоактивності, пов'язаної з кон'югатом	Відсотки Імунореактивності
0	97,2	62
24	96,2	60
48	96,2	60

Мічений кон'югат (питома активність 14,6мКі/мг) вводили до складу PBS, pH 7,4, що містила 75мг/мл ЛСА та 1мМ ДТПК, і водний розчин витримували при 4°C. Стабільність кон'югату аналізували у зазначений час за допомогою SDS-PAGE та авторадіографії, миттєвої тонкошарової хроматографії та за допомогою суцільно-клітинного аналізу зв'язування. Результати показали, що приблизно 96% радіометалу залишається зв'язаним з кон'югатом після 48 годин при 4°C, та що імунореактивність антитіла залишається сталою приблизно на рівні 60%.

Дослідження складу виконували також з кон'югатом, міченим  $^{111}\text{In}$ ; питома активність становила 2,2 мКі/мг. Радіомічене антитіло оцінювали в 1X PBS, pH 7,4, що містила 50мг/мл ЛСА. На Фігурі 10 наведено фотографії авторадіограм для зразків нульової та 48-годинної витримки; денситричний аналіз авторадіограм показує, що впродовж експерименту розпаду міченого антитіла не було (Фігури 11, 12). Миттєвий тонкошаровий хроматографічний аналіз зразків не показав втрат  $^{111}\text{In}$  (Таблиця 25); до того ж, імунореактивність підтримувалась приблизно на рівні 100% (Таблиця 25).

Таблиця 25

Стабільність підбраного за клінічних умов складу  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-ДТПК

Час (Години при 4°C)	Відсотки радіоактивності, пов'язаної з кон'югатом	Відсотки Імунореактивності
0	94,0	105
24	96,5	104
48	96,0	100

Мічений кон'югат (питома активність 2,2мКі/мг) вводили до складу PBS, pH 7,4, що містила 50мг/мл людського сироваткового альбуміну, і водний розчин витримували при 4°C. Стабільність кон'югату аналізували за допомогою SDS-PAGE та авторадіографії, миттєвої тонкошарової хроматографії та за допомогою суцільно-клітинного аналізу зв'язування. Результати показали, що приблизно 96% радіометалу залишається зв'язаним з кон'югатом після 48 годин при 4°C, та що імунореактивність антитіла залишається сталою приблизно на рівні 100%.

Менш ніж 4% радіоізоотопу було втрачено впродовж періоду витримки (інкубаційного періоду), коли хімічно-складений препарат 2B8-MX-ДТПК, радіомічений  $^{90}\text{Y}$  до питомої активності 14,6мКі/мг, витримували протягом 96 годин при 37°C в людській сироватці та аналізували за допомогою нерудукованого SDS-PAGE та авторадіографії. Денситометричне сканування авторадіограм при нульовому часі та після 96 годин не показало значного розпаду міченого кон'югату (Фігури 13-15). Ці результати були підтверджені аналітичним тонкошаровим хроматографічним аналізом зразків нульової та 96-годинної інкубації (Таблиця 26). Узяти разом, ці результати підтверджують, що мічений ітрієм кон'югат є стабільним за умов, які використовували в цьому дослідженні. Подібні результати були отримані з кон'югатом 2B8-MX-ДТПК, міченим  $^{111}\text{In}$  (Фігура 16-18).

Таблиця 26

Аналітичний тонкошаровий хроматографічний аналіз кон'югату  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК, інкубованого в людській сироватці протягом 96 годин при 37°C

Час (Години при 37°C)	Відсотки радіоактивності, пов'язаної з кон'югатом
0	95,1
24	95,2
48	93,2
72	92,0
96	91,4

Зразки людської сироватки, що містили  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК (питома активність 14,6мКі/мг), аналізували у зазначений час за допомогою нанесення краплями 1μл розбавлених 1:20 зразків на смужки для миттєвої тонкошарової хроматографії; зразки аналізували тричі. Хроматографічні смужки обробляли за допомогою висхідної хроматографії в 10% розчині ацетату амонію у суміші метанол:вода (1:1; об/об), сушили та різали навпіл хрест-навхрест. Потім визначали радіоактивність, асоційовану з верхньою та нижньою половинками кожної смужки, та обчислювали радіоактивність кон'югатом у відсотках. (Вільний радіометал мігрує з фронтом розчинника, тоді як радіоактивність, асоційована з білком, залишається на початковому рівні.) Для кожного визначення радіоактивності, пов'язаної з кон'югатом, наведені середні значення.

Б. Дослідження на тваринах.

1. Високо-дозові фармакологічні/токсикологічні дослідження з 2B8 та 2B8-MX-ДТПК

В GLP дослідженні, виконаному в White Sands Research Center (Дослідження номер 920111), яванським макакам були зроблені внутрішньовенні ін'єкції різних доз 2B8. Зразки крові відбирали перед кожною новою ін'єкцією і кров готували для оцінки кількості лімфоцитів способом проточної цитометрії (Таблиця 27).

Таблиця 27

Кількість В-клітин примата, визначена за допомогою проточної цитометрії, після уведення анти-CD20 мишачого моноклонального антитіла 2B8

Група 1	Тварина #	Доза	День	В клітини <sup>a,б</sup>	% Зменшення
	452	Сольовий розчин	0	20,1	0
			1	18,3	9
			7	21,6	0
			13	14,6	27
			38	15,5	23
			52	18,6	7
	424	Сольовий розчин	0	12,4	0
			1	11,6	6
			7	11,2	10
			13	8,4	32
			38	7,7	38
			52	13,1	0
Група II	540	0,6мг/кг	0	16,1	0
			1	7,1	54
			7	6,0	63
			13	5,7	65
			38	10,8	33
			52	14,4	11
	804	0,6мг/кг	0	17,6	0
			1	8,3	53
			7	6,1	65
			13	6,6	62
			38	5,1	71
			52	5,2	68
Група III	701	2,5мг/кг	0	21,6	0
			1	10,7	50
			7	3,0	86
			13	10,7	50
	754	2,5мг/кг	0	19,9	0
			1	11,2	44
			7	10,5	47
			13	9,0	55
Група IV	782	10мг/кг	0	15,9	
			1	3,0	81
			7	3,5	78
			13	6,5	59
	164	10мг/кг	0	17,7	0
			1	8,4	47
			7	7,9	50
			13	7,7	42
Група V	705	10мг/кг	0	17,2	0
			1	5,2	70
			7	1,3	69
			13	8,2	52
			38	17,1	1
			52	13,3	22
	716	10мг/кг	0	34,7	0

1	18,6	46
7	8,1	77
13	3,5	90
38	6,9	80
52	9,2	61

<sup>a</sup> Відсоток від загальної кількості лімфоцитів.

<sup>b</sup> Кількість В-клітин підраховували за допомогою маркерних реагентів подвійного забарвлення та мишачої IGG-RPE + антилюдської IG-FITC (антимишача IgG RPE виявляє 2B8, блоковану CD20, а антилюдська IgG FITC виявляє поверхневу Ig мавп'ячих В-клітин)

Тваринам з груп I-IV ін'єкції робили кожні 48 годин і загальна кількість ін'єкції становила сім; тваринам з групи V ін'єкцію робили зразу (у перший день). Тварин з Груп III та IV умертвляли на 14 день.

Не було помічено значної фармакологічної дії, пов'язаної із застосуванням анти-CD20 антитіла 2B8, на будь-який з клінічних параметрів, які оцінювали під час або після дослідження. Так само, не було помічено порушень під час аналізу зразків з різною гістопатологією, отриманих від тварин з Груп III та IV.

Термін дослідження склав 14 днів і під час дослідження тварин було оцінено такі категорії: клінічні обстеження, вага тіла, температура тіла, споживання їжі та води, фекальні виділення, хімічний аналіз сироватки, гематологія, аналіз сечі та фізичні дослідження. Додатково, у тварин з кожної групи на 0, 1, 7 та 13 дні забирали кров й проводили аналіз оцінки рівня вмісту сироваткового антитіла (2B8) та рівня Т- і В-клітин. На 13 день тварин з Груп III та IV умертвляли, а відібрані тканини після приготування препаратів обстежували за допомогою оптичного мікроскопу. Досліджували тканини серця, селезінки, печінки, нирки, легенів, кори головного мозку, спинного мозку, лімфатичного вузла, шлунку, клубової кишки, ободової кишки, скелетного м'язу, яєчка / яєчника, підшлункової залози і кістковий мозок.

Аналіз рівня циркулюючих Т та В-клітин в крові від тварин, підданих лікуванню, показав, що через 13 днів тварини в Групах з II по V втрачали >50% циркулюючих В-клітин (Фіг.19); уведення антитіла не впливало на рівень Т-клітин (дані не наведені). У тварин з Групи V, яким вводили одиничну дозу 10мг/кг 2B8, також виявляли скорочення рівня циркулюючих В-клітин, еквівалентне такому, що спостерігали у тварин з інших груп.

Тварин з груп I, II та V обстежували через 52 дні (Фіг.20). Рівень В-клітин знову піднімався до рівня >70% від звичайного через 38 днів, за винятком однієї тваринки з Групи II (PRO804) та однієї з Групи V (PRO716). Рівень циркулюючих В-клітин у цих тварин після 52 днів залишався приблизно на рівні 40% від нормального рівня.

На додаток до цього дослідження, була оцінена фармакологічна дія <sup>90</sup>Y-2B8-MX-ДТПК у яванських макак в GLP дослідженні, виконаному в White Sands Research Center (Дослідження номер 920611). Кон'югат клінічної якості заряджали нерадіоактивним <sup>90</sup>Y. Кон'югат, який містив ітрій, додавали в PBS з pH 6,8, що містить 75мг/мл людського сироваткового альбуміну, та 1мМ ДТПК (клінічного складу), та вводили у вену, як описано в розділі "Способи".

Як свідчать результати на Фігурі 21, мічений <sup>90</sup>Y 2B8-MX-ДТПК мав незначний, якщо мав, ефект на циркулюючі В-клітини в цих тваринах, не дивлячись на уведену дозу. До того ж, було виявлено відмінне від загального зменшення лімфоцитів (20-43%) та не були виявлено значних відхилень в будь-якому з оцінених параметрів, включаючи хімічний склад сироватки, аналіз сечі, вагу та температуру тіла.

## 2. Фармакокінетичні дослідження з 2B8 і 2B8-MX-ДТПК

Як описано вище, тварини з групи V GLP дослідження отримали одиничну дозу в 10мг/кг 2B8. Лінійно-регресійний аналіз даних підтверджує, що природне антитіло виділяло з циркуляції цих мавп із значенням 13 β t<sub>1/2</sub> приблизно 4,5 дні. В подібному дослідженні, використовуючи лінію мишей BALB/c, значення β t<sub>1/2</sub> для природного та кон'югованого 2B8, що було визначено за допомогою лінійно-регресійного аналізу (не показано), складає 8,75 днів (Фіг.22). Ці результати підтверджують, що кон'югація 2B8 не впливає на свій кліренс з мишачої лінії BALB/c.

## 3. Дослідження біорозподілу та локалізації пухлини за допомогою міченого 2B8-MX-ДТПК

Спираючись на попередній експеримент з біорозподілу, що описаний вище (Розділ 2д), кон'югат 2B8 маркували радіоізотопом <sup>111</sup>In до рівня питомої 123 активності 2,3мКі/мг та для того щоб визначити біорозподіл міченого матеріалу, приблизно 1,1мКі вводили кожний з двадцяти мишей лінії BALB/c. Потім групи з п'яти мишей умертвляли через 1, 24, 48 та 72 години та їхні органи та частину шкіри, м'язів та кісток видаляли й готували для аналізу. На додаток, збирали урину та фекалії та проводили аналіз протягом 24-72 годин. Рівень радіоактивності в крові падав з 40,3% уведеної дози на грам на 1 годину до 18,9 % на 72 години (Таблиці 1-4; Фіг.23). Впродовж експерименту значення для серця, нирок, м'язів та селезінки залишались в діапазоні 0,7-9,8%. Рівень радіоактивності, виявлений у легенях, зменшувався з 14,2% на першій годині до 7,6% на 72 години; так само і відповідний рівень уведеної дози на грам зменшувався й у печінці з 10,3% до 9,9%. Ці дані використовували при визначенні оцінки радіації поглинутої дози <sup>111</sup>In-2B8-MX-ДТПК (Таблиця 19).

Біорозподілення міченого <sup>90</sup>Y кон'югату, що має питому активність 12,2мКі/мг, оцінювали на мишах лінії BALB/c. Було отримано радіовключання >90% і радіомічені антитіла очищали за допомогою РХВР. Накопичення радіоактивності в тканинах оцінювали в головних органах та шкірі, м'язах, кістках, а також в сечі та фекаліях через 72 години і представляли як відсоток уведеної дози/г тканини. Результати, що наведені в Таблицях 5-8 та на Фігурі 24, показують, що тоді, коли рівень радіоактивності у крові падає з приблизно 39,2% уведеної дози на грам після 1 години до приблизно 15,4% після 72 годин, рівень радіоактивності у хвості, серці, нирках, м'язах та селезінці залишається до певної міри сталим на рівні 10,2% або менше впродовж перебігу всього експерименту. Важливим є те, що рівень радіоактивності в кістках коливався в межах від 4,4% уведеної дози на грам кісток після 1 години до 3,2 після 72 годин. Узяті разом, ці результати підтверджують, що невелика кількість вільного ітрію зв'язана з кон'югатом, і що невелика кількість вільного радіометалу вивільнюється під час дослідження. Ці дані використовували при визначенні оцінки радіації поглинутої дози <sup>90</sup>Y-2B8-MX-ДТПК (Таблиця 20).

Для дослідження локалізації пухлини готували 2B8-MX-ДТПК радіомічений  $^{111}\text{In}$  до рівня питомої активності 2,7мCi/мг. Сто мікролітрів міченого кон'югату (приблизно 24μCi) вводили потів кожній з 12 атимічних (athymic) мишей, які були носіями пухлин, спричинених Ramos В-клітинами. Вага пухлини коливалась в межах від 0,1 до 1,0 грама. Через певні проміжки часу після ін'єкції, 0, 24, 48 та 72 години, за допомогою ретро-орбітальної пункції відбирали 50мкл крові, мишей умертвляли способом цервікальної дислокації й видаляли хвіст, серце, легені, печінку, нирки, селезінку, м'язи, стегно й пухлину. Після обробки та зважування тканин, використовуючи лічильник гама-часток, визначали рівень радіоактивності в кожному виді тканини, а значення представляли як відсоток уведеної дози на грам.

Результати (Фіг.25) показують, що концентрація 2B8-MX-ДТПК в тканинах незмінно збільшувалась протягом експерименту. Після 72 годин тридцять відсотків уведеної дози акумулювалось в пухлині. Рівень в крові, навпаки, знижувався протягом експерименту від більш ніж 30% при нульовому часі до 13% після 72 годин. Всі інші тканини (за винятком м'язових) на кінець експерименту містили від 1,3% до 6,0% уведеної дози на грам тканини; м'язова тканина містила приблизно 13% уведеної дози на грам.

#### В. Дозиметрія

Сумарні дозиметричні дані, що відрізняються від результатів біорозподільчих досліджень звичайних мишей лінії BALB/c й наведені в Таблицях 19 в 20 для мічених індієм та ітрієм кон'югатів, відповідно, узгоджуються з представленими в літературі даними, коли порівнювати на мілікорі уведеної дози (5), й підтверджують, що як мічені ітрієм, так і мічені індієм кон'югати 2B8 можуть бути надійно оцінені щодо клінічної ефективності у хворих на лімфому.

#### Г. Токсикологія

##### 1. 2B8: Тест загальної надійності одиничної дози.

Мишам та піддослідним кроликам вводили одиничну внутрішньочеревну дозу 2B8 (0,5мл або 5,0мл, відповідно) й спостерігали протягом семи днів. Явних слідів токсичності не виявили.

##### 2. 2B8 та 2B8-MX-ДТПК: Імунологічні дослідження з тканинами людини.

Реакцію тканини мишачого моноклонального антитіла 2B8 оцінювали, використовуючи планшет з 32 різними людськими тканинами, фіксованими в ацетоні. Антитіло 2B8 реагує з антигеном анти-CD20, який має дуже обмежену структуру тканинного розподілення, яку спостерігали тільки у підгрупі клітин в лімфоїдних тканинах, включаючи клітини гематопоетичного походження.

Імунореактивність в лімфатичному вузлі спостерігали на популяції дозрілих коркових В-лімфоцитів, а також проліферуючих клітин в центрах розмноження. Позитивну реактивність спостерігали також в периферійній крові, областях В-клітин мигдалеподібної залози, білій пульпі селезінки та для 40-70% медулярних лімфоцитів, знайдених у вилочковій залозі. Позитивна реактивність була також помічена у фолікулах lamina propria (Пієрові бляшки - Peyer's Patches) товстої кишки. Нарешті, агрегати або окремі лімфоїдні клітини в стромі різних органів, включаючи сечовий міхур, молочні залози, шию, стравохід, легені, привушну залозу, простату, тонкий кишечник та шлунок, мали також позитивну реактивність на антитіло 2B8.

Як було виявлено, всі прості епітеліальні клітини, а також стратифікований епітелій та сквамозний епітелій різних органів є нереактивними. Так само реактивність не була помічена для нейроектодермальних клітин, включаючи клітини мозку, спинного мозку та периферійної нервової системи. Мезенхімальні елементи, такі як клітини м'язів скелету та гладких м'язів, фібробласти, епітеліальні клітини та поліморфноядерні запальні клітини, як виявилось, є негативними (не мають реактивності).

Тканинну реактивність кон'югату 2B8-MX-ДТПК оцінювали, використовуючи панель з шістнадцятьма зразками людської тканини, які були фіксовані в ацетоні. Як раніше продемонстровано на природних антитілах, кон'югат 2B8-MX-ДТПК розпізнавав антиген CD20, який показував дуже обмежену картину розподілу, будучи виявленим тільки на підмножині клітин лімфоїдного походження. В лімфатичних вузлах імунореактивність спостерігали тільки у популяції В-клітин. Була помітна сильна реактивність в білій пульпі селезінки та в медулярних лімфоцитах вилочкової залози. Імунореактивність також спостерігали у окремих лімфоцитів сечового міхура, серця, товстої кишки, печінки, легенів та матки та була віднесена на рахунок запальних клітин, що є присутніми в цих тканинах. Як описано вище для природного антитіла, реактивності не спостерігали для нейроектодермальних клітин або для мезенхімальних елементів.

#### III. Обговорення

Мишаچه моноклональне антитіло анти-CD20, яке отримували за допомогою клону з тим самим позначенням, показує спорідненість до антигена CD20 В-клітини, яка може бути вищою за таку, що спостерігали для антитіла BI, як визначили за допомогою порівняння з антитілами відомої специфічності для антигена CD20, та за допомогою аналізу Скетчарда. Крім цього, дані імунопреципітації підтверджують, що антиген, виділений завдяки 2B8, мабуть, є таким самим антигеном, як і ген, виділений завдяки BI, через те, що обидва антитіла виділяли дублет з відносною молекулярною вагою 33 і 35КД. Цитофлюорографічний аналіз специфічності антитіла 2B8 для лімфоцитів периферійної крові показує, що антитіло специфічно взаємодіє з В-клітинами та не показав реактивності для Т-клітин або інших типів лімфоцитів. Нарешті, попередні дані із стабільності підтверджують, що антитіло є стабільним при 30°C протягом 12 тижнів без втрати імунореактивності.

При з'єднанні антитіла 2B8 з метилбензил(діетилентриамінпентаоцтовою) кислотою (MX-ДТПК) практично не спостерігали зменшення імунореактивності відносно природного антитіла. Більш того, радіомаркування кон'югату або  $^{111}\text{In}$  або  $^{90}\text{Y}$ , давало кон'югати з імунореактивністю 100% та 60% відповідно. Дослідження стабільності мічених  $^{111}\text{In}$  або  $^{90}\text{Y}$  кон'югатів, витриманих в людській сироватці протягом 96 годин при 37°C, показали незначну втрату радіометалу в ході експерименту, підтверджуючи, що кон'югати будуть стабільними під час клінічного застосування.

Дослідження з локалізації пухлини у атимічних мишей, при застосуванні міченого індієм препарату 2B8-MX-ДТПК, показали, що збільшення кількості кон'югату, зв'язаного з клітинами пухлини в ході експерименту, відбувається без незвичайного накопичення в інших тканинах. Крім цього, дозиметричні оцінки, які отримували на основі дослідження біорозподілу, узгоджуються з опублікованими в літературі даними. Нарешті, дослідження перехресної реактивності людської тканини з природними та кон'югованими антитілами, показали, що обидва антитіла розпізнають антиген з сильно обмеженим розподілом тканин,

реагуючи тільки з підмножиною клітин в лімфоїдних тканинах, включно з тканинами гематопоетичного походження. Узяті разом, ці результати доводять, що кон'югація не змінювала тканинної специфічності антитіла, і що радіомічені кон'югати є стабільними *in vivo* й розпізнають антиген CD20, присутній на поверхні пухлин, індукованих дослідним шляхом в атимічних мишах.

При використанні великих доз 2B8 під час фармакологічного/токсикологічного дослідження антитіло не спричиняло значного фармакологічного/токсичного ефекту на будь-який з оцінюваних параметрів, як під час, так і після дослідження. Так само не було помічено порушень під час аналізу різних гістопатологічних видів, які досліджували за допомогою оптичної мікроскопії. Несподівано всі дози антитіла, які використовували, давали помітне зменшення циркулюючих В-клітин. Проте рівень циркулюючих В-клітин, що зменшувався, повертався до приблизно нормального рівня після того, як введення антитіла припинялося. В групі мавп, що отримали одиничну дозу (Група V), природне антитіло видаляли з циркуляції із уявною величиною  $\beta t_{1/2}$  приблизно 4,5 днів. Як і очікувалося, коли ці фармакокінетичні дослідження виконували на мишах лінії BALB/c, антитіло 2B8 виводили із величиною  $\beta t_{1/2}$  8,75 днів. Таким чином, ці дані доводять, що природне антитіло також може забезпечити певний клінічний ефект, коли уводиться як додаток до міченого кон'югату.

Всі дані авторів свідчать про те, що висока спорідненість антитіла 2B8 та кон'югату МХ-ДТПК демонструє обмежений характер реактивності людської тканини. Крім цього, у приматів природне антитіло є нетоксичним і продукує короточасний кліренс В-клітин; проте після того, як антитіло звільняється від циркуляції, рівень В-клітин відновлюється доволі швидко.

На додаток, мічені індієм та ітрієм кон'югати 2B8-МХ-ДТПК з'являлись стабільно *in vitro* без втрат радіометалу впродовж більш тривалої інкубації в людській сироватці. Нарешті, оцінки дози радіації, які отримували на підставі біорозподілу мічених  $^{90}\text{Y}$  або  $^{111}\text{In}$  2B8-МХ-ДТПК у мишей лінії BALB/c, узгоджуються, на мілікорі уведеної дози, з оцінками дози, які отримали на підставі даних клінічних досліджень людини з використанням сполучених антитіл неподільного ідіотипу, мічених цими ізотопами.

IV. Короткий виклад протоколу доклінічного розвитку радіомаркування "mix-&shoot" ("змішай-та-отримай") для приготування  $^{90}\text{Y}$ -2B8-МХ-ДТПК

#### А. Вступ

Мічене  $^{90}\text{Y}$  мишаче моноклональне антитіло анти-CD20 (2B8) оцінювали в клінічних випробуваннях Фази 1 для лікування рецидиву В-клітинної лімфоми. Основний протокол, який використовували для приготування міченого ітрієм антитіла, використовував етап рідинної хроматографії високої роздільної здатності (PXBP) для видалення зв'язаного без участі протеїну радіоізоотопу перед тим, як підібрати склад та увести його пацієнтам. На жаль, цей процес є дуже тривалим та призводить до більш тривалої дії радіоізоотопу на антитіло в незахищеному стані. Це призводить до збільшеного радіолізу антитіла з супутнім зменшенням імунореактивності. На додаток, трудомісткий бік процесу робить його важким для приготування більш ніж одної дози на день в радіофармації. Спрощення процесу прискорило б впровадження у клінічних умовах, як альтернативи, використання NPI Pharmacy Services (Аптечних Служб) як радіофармації.

Відповідно, було розроблено модифіковану процедуру маркування, названу як «mix&shoot» спосіб, і яка усуває потребу для PXBP очистки, одночасно підтримуючи високий рівень введення радіоізоотопів та поліпшену здатність зберігати імунореактивність. Дослідження стабільності *in vitro*, а також дослідження з біорозподілу в мишах показали, що радіомічене антитіло, яке приготували, використовуючи спосіб «mix&shoot», є порівнюваним з матеріалом, отриманим з використанням сучасного процесу PXBP очищення. Результати цих доклінічних досліджень вказують на те, що цей новий "mix-&shoot" протокол можна застосовувати для приготування міченого  $^{90}\text{Y}$  2B8-МХ-ДТПК, придатного для використання в клінічних випробуваннях.

#### Б. Матеріали і способи Матеріали

##### 1. Клітини

Лінії людських лімфобластичних клітин SB (CD20 позитивні) та HSB (CD20 негативні) отримували з American Type Culture Collection та зберігали в RPMI-1640, який містить 10% зародкової бичачої сироватки й доповненого глютаміном.

##### 2. Антитіла

Антитіло 2B8 очищали за допомогою Виробничого відділу із супернатанту біореактора на пустотілих волокнах, використовуючи раніше описаний в IND (BB-IND 4850/4851) протокол.

##### 3. Додаткові реагенти

Хлорид ітрію-[90] отримували від Amersham. Всі інші реагенти отримували з джерел, описаних в цитованих нижче повідомленнях. Реагенти, які використовували для протоколів введення радіоактивних ізотопів, обробляли з метою видалення сторонніх іонів важких металів, які могли б конкурувати з радіоізотопами на стадії введення радіоактивних ізотопів (див. розділ Способи). Реагенти виробляли за умов GMP за допомогою Виробничого відділу (Manufacturing department) і DEC, дотримуючись встановлених Batch Production Records.

#### Способи

##### 1. Приготування 2B8-P4X-ДТПК

МХ-ДТПК клінічної якості отримували від Counter Immunology як династрієву сіль у воді й зберігали при -70°C. Кон'югат (2B8-МХ-ДТПК) готували за допомогою Виробничого відділу. В цих дослідженнях використовували дві різні партії кон'югату; обидві постачались в нормальному сольовому розчині при 10мг/мл. Кон'югат набирали в стерильні 2-х мл поліпропіленові шприци й зберігали при 2-8°C.

##### 2. Дотримання умов невикористання металу

При виконанні маніпуляції з реагентами мінімізували можливість металевого забруднення. З цієї метою використовували поліпропіленові або полістирольні пластикові контейнери, такі як колби, лабораторні склянки та градуйовані циліндри. Перед використанням їх мили Alconox й інтенсивно промивали водою Milli-Q або водою для іригації (ВДІ) (Water for Irrigation - WFI). Для точних маніпуляцій з маленькими об'ємами для піпеток використовували наконечники (BioRed), які не містять металу. З

великими об'ємами реагентів маніпуляції виконували, використовуючи стерильні пластикові серологічні піпетки. Реакції легко проводили в 1,8мл поліпропіленових трубах мікроцентрифуги, що загвинчувались пробкою.

### 3. Визначення радіоінкорпорування

Радіоінкорпорування визначали, тричі використовуючи миттеву тонкошарову хроматографію (МТШХ) у відповідності до STOP SP-13-008. Загалом, протокол був таким: радіомічений кон'югат розводили 1:20 в 1X PBS, який містив 1мМ ДТПК або 5мМ ЕДТК, потім порції в 1мкл краплями наносили за 1,5см від одного краю смужки розміром 1×5 см з SG паперу для МТШХ (Gelman Science). Папір обробляли, використовуючи 10% ацетат амонію в суміші метанол:вода (1:1, об/об). Смужки сушили, різали навпіл і за допомогою сцинтиляційного підрахунку визначали радіоактивність кожної частини. Радіоактивність нижньої половини смужки (радіоактивність білка) виражали як відсоток від загальної радіоактивності, яку визначали через додавання значень як для нижньої, так і верхньої половинок.

### 4. Протокол «mix&shoot» для міченого ітрієм-[90] 2B8-MX-ДТПК

Антитіла радіомітили вільним від носія хлоридом  $^{90}\text{Y}$ , який постачався Amersham в 0,04М HCl. Аліквота радіоізоотопу (10-20мКі/мг антитіла) поміщали у пропіленову трубку й 0,02X об'єм вільного від металу 2М ацетату натрію додавали для того, щоб довести розчин до рН 3,6. Додавали миттево 2B8-НаДТПК (0,3мг; 10,0мг/мл в нормальному сольовому розчині) й розчин обережно перемішували. Розчин перевіряли рН папером щоб переконатись, що значення рН є 3,8-4,1, і витримували 5 хвилин. Реакцію зупиняли, переносячи реакційну суміш в окрему поліпропіленову трубку, яка містила 1XPBS з 75мг/мл людського сироваткового альбуміну (ЛСА) і 1мМ діетилентриамінопентаоцтової кислоти (ДТПК) та обережно перемішували. Радіомічене антитіло зберігали при 2-8°C.

Питому активність визначали, вимірюючи радіоактивність відповідної аліквоти міченого кон'югату. Це значення коригували для оберненої ефективності, пов'язаної з концентрацією білка в кон'югаті, яку визначали за допомогою поглинання при 280нм й виражали як мКі/мг білка.

### 5. Імунореактивність in vitro ітрієм-[90]-2B8-MX-ДТПК

Імунореактивність міченого  $^{90}\text{Y}$  кон'югату визначали, використовуючи SOP #SP13-009, оснований на модифікованій версії суцільно-клітинного аналізу зв'язування, описаний Lindmo. Збільшуючи концентрацію логарифмічної фази, CD-позитивних SB клітини або CD-негативних HSB клітини додавали для подвоєння множин з 1,5мл-х поліпропіленових трубок; кінцевий об'єм клітин є 40мл. Радіомічений кон'югат розводили до кінцевої концентрації 1-2,5нг/мг й додавали в кожну трубку. Після 90-хвилинного витримання клітини осаджували за допомогою центрифугування, а супернатант збирали. Залишкову радіоактивність фракції супернатанту визначали сцинтиляційним лічильником. Дані представляли у вигляді графіка залежності показника загальної доданої радіоактивності, поділеної на радіоактивність клітин, від оберненої величини кількості клітин на пробірку. Відтинок на осі X представляє імунореактивну фракцію.

### 6. Стабільність in vitro підбраного за клінічних умов складу ітрієм-[90]-2B8-MX-ДТПК

Кон'югат 2B8-MX-ДТПК радіомітили за допомогою  $^{90}\text{Y}$  й підбирали склад так, як описано в протоколі "mix&shoot", наведеному вище. Було приготовлено дві партії міченого кон'югату: одну партію використовували для оцінювання стабільності радіоінкорпорації, а другу партію використовували для оцінки утримання радіоактивності. Підібрані складі кон'югатів витримували при 4°C протягом 48 годин, а аліквоти аналізували через часові проміжки 0, 24 та 48 годин, використовуючи нередуційну SDS-PAGE та авторадіографію. Імунореактивність через кожний часовий проміжок аналізували, використовуючи кількісний аналіз, описаний вище.

### 7. Стабільність in vitro ітрієм-[90]-2B8-MX-ДТПК у людській сироватці

Стабільність міченого ізоотопом  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК оцінювали за допомогою витримки в людській сироватці при 37°C протягом 72 годин. Сполучене антитіло радіомітили ітрієм-[90] і підбирали склад як описано вище. Радіомічений кон'югат розводили 1:10 звичайною людською сироваткою (не активованою температурою), а аліквоти витримували в пластикових трубках при 37°C. У зазначений час зразки видаляли й аналізували за допомогою нередуційної SBS-PAGE та авторадіографії.

### 8. Біорозподіл ітрієм-[90]-2B8-MX-ДТПК

Біорозподіл в тканині міченого ізоотопом  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК оцінювали на мишах (лінії BALB/c) віком від восьми до десяти тижнів. Радіомічений кон'югат готували та підбирали склад за методикою, описаною вище. У вени мишам вводили 5мкКі міченого ізоотопом  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК і групи з п'яти мишей умертвляли через 1, 24, 48 та 72 години. Після смерті видаляли хвіст, серце, легені, печінку, нирки, селезінку, м'язи, стегно, промивали та зважували їх; для аналізів брали також зразки крові та шкіри. Радіоактивність кожного виду тканини визначали, вимірюючи за допомогою лічильника гама-частот гальмівне випромінювання, і визначали відсоток уведеної дози на грам тканини та відсоток уведеної дози на орган.

### 9. Дозиметрія

Дані з біорозподілу, отримані при введенні мишам міченого ізоотопом  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК, використовували для обчислення оцінки дози радіації, отриманої від дози в 1мКі, уведеної пацієнту вагою 70кг. Оцінку проводили у відповідності до методів, адаптованих Medical Internal Radiation Dose (MIRD) Committee Товариства з ядерної медицини (Society of Nuclear Medicine). Ці обчислення були виконані паном Філіпом Хаганом, Nuclear Medicine Service, VA medical Center, La Jolla, CA 92161.

### 10. Затвердження (легалізація) протоколу приготування клінічних доз ітрієм-[90]-2B8-MX-ДТПК

[Посилання на доповідь R&D, що має назву "Затвердження протоколу мічення радіоактивним ізоотопом «mix&shoot» для приготування клінічних доз  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК; автор, P.Chinn; Дата: 22 квітня 1994].

### B. Результати

#### 1. Приготування міченого ітрієм-[90] 2B8-MX-ДТПК з використанням протоколу «mix&shoot»

Попередні експерименти з оцінки кінетики реакцій мічення радіоактивним ізоотопом з 2B8-MX-ДТПК та  $^{90}\text{Y}$  показали, що при рН 3,6-4,0, 95% радіоізоотопу приєднувалось протягом 5-10 хвилин протікання реакції. Відтворювання цієї радіоінкорпорації (95,7%±1,7%) потім була підтверджена даними неупередженого аналізу для розширеного протоколу [Посилання на доповідь R&D, озаглавлену "Затвердження протоколу мічення радіоактивним ізоотопом «mix&shoot» для приготування клінічних доз  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК; автор, P.Chinn; Дата: 22 квітня 1994]. Приготування міченого ітрієм-[90] 2B8-MX-ДТПК з використанням цього



протоколу "mix-&shoot" давало продукт, який можна отримувати за допомогою методу РХВР [див. ВВ-IND 4850/4851]. Було встановлено, що протокол радіомічення здатний відтворювати питому активність, що зазвичай коливається в інтервалі від 10 до 15 мКі/мг антитіла.

Імунореактивність міченого  $^{90}\text{Y}$  2В8-МХ-ДТПК й приготовленого з використанням цього протоколу зазвичай становила більш ніж 70% порівняно з 55-60%, які спостерігали під час процедури перевірки достовірності протоколу РХВР (Фігура 26). Ця відмінність можливо є наслідком знижених ефектів радіолізу завдяки скороченому часу інкубації за протоколом "mix-&shoot". Ці результати були типовими і, про що йдеться нижче, є зразком процедури перевірки для розширеного протоколу приготування клінічних доз радіоміченого кон'югату.

## 2. Стабільність in vitro міченого $^{90}\text{Y}$ 2В8-МХ-ДТПК

Попередні експерименти з незахищеним міченим  $^{90}\text{Y}$  кон'югатом, який отримували за допомогою методу РХВР, показали, що радіоліз призводив до значного розпаду антитіла та втрат імунореактивності. Через це з метою мінімізувати ефект радіолізу було розроблено склад буферу. Було показано, що людський сироватковий альбумін (ЛСА) є ефективним засобом мінімізації руйнування антитіла, викликаного радіолізом. Оцінку проводили на радіоміченому кон'югаті, отриманому методом "mix-&shoot", для того, щоб підтвердити ефективність складу для мінімізації радіолізу. Мічене  $^{90}\text{Y}$  антитіло, радіомічене до питомої активності 14,5 мКі/мг антитіла, складали в 1X PBS, pH 7,4, який містив 75 мг/мл ЛСА та 1 мМ ДТПК. Деградацію кон'югату 2В8-МХ-ДТПК оцінювали після 0, 24 та 48 годин, використовуючи SDS-PAGE та авторадіографію. На Фігурах 2, 3 та 4 показано, що радіомічений кон'югат не демонструє значного розпаду протягом 48-годинного періоду, коли витримувався при 4°C. Миттєвий тонкошаровий хроматографічний аналіз не показав втрат  $^{90}\text{Y}$  впродовж 48-годинного витримання; ці результати було підтверджено за допомогою SDS-PAGE/авторадіографічного аналізу (Таблиця 28). Імунореактивність також залишалась відносно сталою й складала >88% (Таблиця 29).

Таблиця 28

Стабільність  $^{90}\text{Y}$  2В8-МХ-ДТПК отриманого за протоколом "Mix-&Shoot" в PBS, який містить людський сироватковий альбумін і ДТПК

Час (г)	Відсоток радіоактивності кон'югату	
	МТПХ	SDS/PAGE
0	92,9	96,0
24	95,5	95,4
48	91,3	94,6

Таблиця 29

Імунореактивність  $^{90}\text{Y}$  2В8-МХ-ДТПК отриманого за протоколом "Mix-&Shoot" в PBS, який містить людський сироватковий альбумін і ДТПК

Час (годин при 4°C)	Відсоток Імунореактивність
0	87,9
24	88,5
48	90,4

Складений за клінічних умов, мічений  $^{90}\text{Y}$  2В8-МХ-ДТПК зі питомою активністю 15,7 мКі/мг витримували протягом 72 годин при 37°C в людській сироватці. Зразки, які аналізували за допомогою нескороченої SDS-PAGE та авторадіографії (Фігура 30), не показали втрат радіоізотопу впродовж часу витримання (Таблиця 30). Денситометричні сканування авторадіограм при нульовому часі витримки та при 72 годинах не показали значного розпаду міченого кон'югату (Фігури 31 та 32). Ці результати було підтверджено тонкошаровим хроматографічним аналізом (Таблиця 30). Слід зауважити, що радіоінкорпорування антитіла, яке використовували в цьому дослідженні, було нижчим за таке, що отримували в дослідженнях з перевірки достовірності протоколу мічення. Цей нижчий рівень радіоінкорпорування був наслідком нижчої якості партії хлориду  $^{90}\text{Y}$ , який використовували саме для цього приготування міченого антитіла. Нижчий рівень радіоінкорпорування не дозволяв висновувати, що мічений ітрієм кон'югат, отриманий за методом «mix&shoot», є стабільним за цих умов інкубації.

Таблиця 30

Стабільність кон'югату  $^{90}\text{Y}$ -2В8-МХ-ДТПК, витриманого в людській сироватці

Час (години при 37°C)	Відсоток радіоактивності кон'югату	
	МТПХ	SDS-PAGE/Авторадіографія
0	85,7	88,8
24	76,4	90,0
72	87,6	88,7

Зразки людської сироватки, що містять  $^{90}\text{Y}$ -2В8-МХ-ДТПК (спечифічна активність 15,7 мКі/мг), аналізували для незв'язаного білком  $^{90}\text{Y}$  після зазначеного часу, використовуючи смужки для миттєвої тонкошарової хроматографії та SDS-PAGE/авторадіографії.

## 3. Вивчення біорозподілу з ітрієм-[90] 2В8-МХ-ДТПК

Біорозподіл міченого  $^{90}\text{Y}$  кон'югату зі питомою активністю 11,5мКі/мг антитіла та рівнем радіоінкорпоруванням >95%, оцінювали на мишах лінії BALB/c. місцезнаходження радіоактивності в тканинах оцінювали для головних органів, шкіри, м'язів, кісток, сечі та фекалій після 72 годин й виражали у відсотках уведеної дози на г тканини та у відсотках уведеної дози на орган. Результати, наведені в таблицях 31-34 та Фігурі 33, показують, що рівень радіоактивності крові після першого часу зменшується від приблизно 43% уведеної дози на грам (%УД/г) до приблизно 16% після 72 годин; після 24 годин і більше, рівень радіоактивності в серці, нирці та селезінці залишався майже сталим на рівні 4-8%. Для легень та печінки радіоактивність зменшувалася від 10-12% після 1 години до 8-10% після 72 годин. Для шкіри радіоактивність була відносно сталою, приблизно на рівні 3% після 24 або 72 годин. Радіоактивність в м'язах залишалась приблизно 0,6% впродовж усього ходу дослідження. Поглинання радіоактивності стегном (кісткою) залишалось на рівні, меншому за 4% після всіх часових відтинків, вказуючи те, що кількість вільного ітрію у зразку кон'югату була незначною і що невелика кількість радіометалу виділялася під час ходу дослідження.

Таблиця 31

Розподіл активності після 1 години LV. Уведення  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК звичайним мишам лінії BALB/c  
Середні значення  $\pm$  СВ (середньоквадратичне відхилення)

Зразок	Вага органу Грам	% УД/ Грам	% УД на Грам
Кров	1,37 $\pm$ 0,053	42,74 $\pm$ 0,78	58,52 $\pm$ 1,74
Серце	0,101 $\pm$ 0,01	8,03 $\pm$ 3,33	0,82 $\pm$ 0,37
Легеня (2)	0,126 $\pm$ 0,01	12,44 $\pm$ 0,94	1,56 $\pm$ 0,05
Нирка (1)	0,129 $\pm$ 0,01	7,81 $\pm$ 1,24	0,997 $\pm$ 0,10
Печінка	0,899 $\pm$ 0,07	10,08 $\pm$ 1,28	9,01 $\pm$ 0,52
Селезінка	0,077 $\pm$ 0,004	10,74 $\pm$ 0,96	0,823 $\pm$ 0,04
М'язи	7,83 $\pm$ 0,28	0,44 $\pm$ 0,08	3,43 $\pm$ 0,51
Кістка	2,94 $\pm$ 0,11	3,44 $\pm$ 0,57	10,11 $\pm$ 1,80
Шкіра	2,94 $\pm$ 0,11	1,46 $\pm$ 0,58	4,24 $\pm$ 1,57
GI Тракт	2,33 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,19	2,36 $\pm$ 0,35
Сеча	-	-	-
Фекалії	-	-	-
		Сума:	94,66 $\pm$ 3,47

Кількість мишей = 3

Середня вага = 19,58 грамів  $\pm$  0,71 грамів

Таблиця 32

Розподіл активності після 24 години LV. Уведення  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК звичайним мишам лінії BALB/c  
Середні значення  $\pm$  СВ (середньоквадратичне відхилення)

Зразок	Вага органу Грам	% УД/ Грам	% УД на Грам
Кров	1,55 $\pm$ 0,12	19,77 $\pm$ 2,42	30,77 $\pm$ 6,04
Серце	0,105 $\pm$ 0,01	4,44 $\pm$ 0,55	0,47 $\pm$ 0,08
Легеня (2)	0,127 $\pm$ 0,02	8,78 $\pm$ 1,61	1,11 $\pm$ 0,21
Нирка (1)	0,139 $\pm$ 0,01	5,02 $\pm$ 0,52	0,69 $\pm$ 0,05
Печінка	0,966 $\pm$ 0,09	8,62 $\pm$ 2,73	8,20 $\pm$ 1,97
Селезінка	0,083 $\pm$ 0,01	6,75 $\pm$ 1,27	0,55 $\pm$ 0,064
М'язи	8,83 $\pm$ 0,69	0,692 $\pm$ 0,01	6,12 $\pm$ 0,52
Кістка	3,31 $\pm$ 0,26	2,24 $\pm$ 0,31	7,47 $\pm$ 1,53
Шкіра	3,31 $\pm$ 0,26	3,33 $\pm$ 0,76	10,88 $\pm$ 1,76
GI Тракт	2,89 $\pm$ 0,43	0,73 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,05
Сеча			2,31
Фекалії			1,23
		Сума:	73,52 $\pm$ 6,18%

Кількість мишей = 3

Середня вага = 22,09  $\pm$  1,73 грамів

Таблиця 33

Розподіл активності після 48 години LV. Уведення  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК звичайним мишам лінії BALB/c  
Середні значення  $\pm$  СВ (середньоквадратичне відхилення)

Зразок	Вага органу Грам	% УД/ Грам	% УД на Грам
Кров	1,50 $\pm$ 0,14	14,97 $\pm$ 5,77	22,53 $\pm$ 8,48
Серце	0,104 $\pm$ 0,01	3,99 $\pm$ 1,43	0,415 $\pm$ 0,16

Легеня (2)	0,122±0,02	8,41±1,57	1,04±0,31
Нирка (1)	0,124±0,01	3,99±1,62	0,49±0,19
Печінка	0,966±0,13	6,12±3,21	5,69±2,25
Селезінка	0,079±0,01	6,05±2,38	0,46±0,16
М'язи	8,59±0,82	0,54±0,19	4,67±1,67
Кістка	3,22±0,31	2,07±0,84	6,65±2,56
Шкіра	3,22±0,31	2,30±0,70	7,34±1,95
GI Тракт	2,63±0,40	0,652±0,30	1,67±0,64
Сеча	-	-	2,83
Фекалії	-	-	2,06
		Сума:	57,28±17,60

Кількість мишей = 3

Середня вага = 21,48 ± 2,05 грамів

Таблиця 34

Розподіл активності після 72 години LV. Уведення <sup>90</sup>Y-2B8-MX-ДТПК звичайним мишам лінії BALB/c  
Середні значення ± СВ (середньоквадратичне відхилення)

Зразок	Вага органу Грам	% УД/ Грам	% УД на Грам
Кров	1,45±0,07	15,87±4,81	23,14±7,26
Серце	0,093±0,01	4,16±1,27	0,392±0,13
Легеня (2)	0,123±0,02	10,67±3,79	1,30±0,45
Нирка (1)	0,123±0,01	4,79±1,03	0,596±0,16
Печінка	0,876±0,07	7,26±1,79	6,39±1,76
Селезінка	0,081±0,01	7,37±2,34	0,584±0,16
М'язи	8,30±0,39	0,67±0,13	5,58±1,22
Кістка	3,11±0,15	2,58±0,51,	8,05±1,76
Шкіра	3,11±0,15	3,09±0,82	9,66±2,68
GI Тракт	2,59±0,20	0,79±0,18	2,05±0,53
Сеча	-	-	3,56
Фекалії	-	-	2,82
		Сума:	65,47±14,0

Кількість мишей = 3

Середня вага = 20,76 ± 0,97 грамів

#### 4. Дозиметрія

Поглинуті дози радіації для "стандартної" людини вагою 70кг, обчислені для міченого <sup>90</sup>Y кон'югату з використанням даних з біорозподілу у мишей (значення у % УД/орган в Таблиці 31-34), наведено в Таблиці 35. Ці результати можуть бути порівняні з результатами, отриманими раніше з використанням міченого <sup>90</sup>Y 2B8-MX-ДТПК, який приготували, використовуючи спосіб мічення радіоактивним ізотопом PXPB.

Таблиця 35

Дозиметричні оцінки радіації, отримані на даних введення міченого ітрієм-[90] 2B8-MX, рівномірно розподіленого в стандартній людині (70кг) та на даних розподілення в тварині після 72 після ін'єкції

Рівень активності		1000мікрокурі/доза пацієнта	
	рад		рад
Adrenals	0,534	Яєчники	0,534
Стінка міхура	0,534	Підшлункова залоза	0,534
Стінка шлунка	0,534	Скелет	
Тонка кишка	1,158	Трубчаста кістка	1,466
Стінка UL кишки	1,657	Трабекулярна кістка	1,466
Стінка LL кишки	2,380	Мозок (червоний)	4,452
Нирки	7,015	Мозок (жовтий)	2,096
Печінка	7,149	Хрящ	1,466
Легені	2,157	Інші складові	1,466
Інші тканини		Шкіра	6,603
М'язи	2,646	Селезінка	4,973
тваринний жир	2,646	Яєчка	0,534
Кров	2,646	Щитовидна залоза	0,534
Мозок	2,112	Матка (Nongrvid)	0,767
Серце	2,646	Все тіло	1,755

Посилання: схема обчислення поглинутої дози для біологічно розподілених радіонуклідів, MIRD J. of Nucl. Med./Suppl. #1, 2/68, обчислення, виконані з використанням Spreadsheet Template in Symphony (Lotus Development Corporation) та створені Phillip L. Hagan, MS, Nuclear Medicine Service, VA Hospital,

## 4. Протокол перевірки достовірності приготування клінічної дози ітрію-[90]-2B8-MX-ДТПК

Загалом десять партій для перевірки достовірності було приготовлено в MPI Pharmacy Services, Inc. Результати тестування по кожній партії зведені в Таблиці 36. Обчислювали середнє значення для кожного результату тесту й значення відповідних середньоквадратичних відхилень. Для того щоб оцінити достовірність процесу внаслідок різниці у часі мічення, партії від №1 до №8 готували, використовуючи 10-хвилинний час мічення; партії №9 та 10 готували, використовуючи час реакції, рівний 5хв. На основі результатів тесту для десяти партій для перевірки достовірності були створені специфікації вивільнення. Специфікації вивільнення наведено в Таблиці 37.

Таблиця 36

Результати аналізу партій для перевірки достовірності  
міченого  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК, приготовленого з використанням "Mix-&Shoot"

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	Середнє
% імунореактивність	72,8	93,3	71,7	70,2	60,6	68,2	79,5	72,4	88,2	68,5	74,5±9,8
ендотоксин (ЕУ/мл)	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,25	<0,25	<0,25	<0,125	<0,125	<0,162±0,06
% радіоінкорпорування	97,5	97,0	93,5	96,0	94,7	94,9	95,9	96,5	97,5	93,5	95,7±1,4
Конц. антитіла (мг/мл)	0,122	0,102	0,088	0,128	0,134	0,119	0,093	0,088	0,111	0,096	0,108±0,017
радіоактивність (мКі/мл)	1,22	1,22	0,98	1,26	1,51	1,55	1,06	0,98	1,28	1,02	1,21±0,21
Специф. Акт., (мКі/мг)	10,0	12,0	11,2	9,8	11,3	13,0	11,3	11,1	11,5	10,7	11,2±0,9
V											

Таблиця 37

Специфікації вивільнення  
для міченого  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК, отримані з використанням протоколу "Mix-&Shoot"

Тест	Специфікація	Спосіб
Імунореактивність	>60%	RIA
Ендотоксин	<5ЕУ/мл	LAL
Інкорпорація радіомітки	>90%	ULC
Конц. антитіла	0,075-0,150мг/мл	A <sub>200</sub>
Конц. радіоакт. <sup>1</sup>	>6,0мКі/мл	Калібрування дози
Питома активність <sup>1</sup>	>9,0мКі/мг антитіла	A <sub>200</sub> /каліб. дози
Загальна радіоакт. ампули <sup>1</sup>	>6,0мКі	Калібрування дози
pH	6,0-8,0	pH папір
загальна конц. білка	65-85мг/мл	A <sub>200</sub>
тест на стерильність	пропущений	CFR 610. 12

<sup>1</sup> (калібрування часу початку відліку)

## Г. Обговорення

Вихідний протокол мічення радіоактивним ізотопом для приготування міченого  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК для видалення з препарату не зв'язаного білком  $^{90}\text{Y}$  використовував, зокрема, трудомісткий та довготривалий етап очистки за допомогою РХВР. З метою спрощення цього процесу та його доступності для використання в клінічних умовах, зусилля було спрямовано на вилучення стадії РХВР на користь так званого протоколу «mix&shoot». Метою було ідентифікувати умови мічення радіоактивним ізотопом, які б могли приводити до дуже високого радіоінкорпорування ізотопу в кон'югат, уникаючи у такий спосіб потреби у стадії очистки. Було встановлено, що >95% радіоінкорпорування могло б бути отримано при pH 3,6 при витриманні від п'яти до десяти хвилин. Додатковою перевагою цього протоколу було збільшене утримування імунореактивності (>70%), можливо внаслідок коротшого часу піддавання антитіла дії радіоізотопу високої енергії перед додаванням людського сироваткового альбуміну, який забезпечує захист проти радіолізу. Це утримування імунореактивності є більшим за раніш отримане з використанням методу РХВР.

Вивчення стабільності міченого  $^{90}\text{Y}$  кон'югату, який був приготовлений з використанням протоколу «mix&shoot» й витриманий в буфері підібраного складу (1XPBS, який містить 75мг/мл людського сироваткового альбуміну і 1мМ ДТПК) протягом 48 годин при 4°C, не показало втрат радіоізотопу і показало повне утримання імунореактивності. Дослідження стабільності, які проводили з людською сироваткою протягом 72 годин при 37°C, також показали мінімальну втрату радіоізотопу. Ці результати зі стабільності можуть бути порівняними з раніш отриманими для кон'югату, який радіомітили з використанням протоколу РХВР.

Біорозподіл на мишах лінії BALB/c з використанням міченого  $^{90}\text{Y}$  кон'югату, отриманого за допомогою методу "mix-and-shoot", не показав незвичайного місцезнаходження в тканинах. Ці результати підтвердили, що радіомічене антитіло не змінювалося такою мірою, щоб суттєво впливати на характеристики антитіла in vivo. Ці результати можуть також бути порівняні з отриманими раніше при дослідженні з радіоміченим кон'югатом, приготовленим з використанням для радіомічення методу РХВР [див. BB-IND 4850/4851]. Дозиметричні оцінки для "стандартної" людини вагою 70кг, розраховані на основі даних з біорозподілу для мишей узгоджуються з даними, отриманими на кон'югаті з використанням процедури РХВР [див. BB-IND 4850/4851]. До того ж, результати дозиметрії можуть бути порівняними з результатами, що отримано для білків, залучених до активних клінічних досліджень (IDEC дослідження #1315), якщо порівнювати на мілікюри введеної дози. В дослідженні на шістьох пацієнтах середні значення (рад±СВ) для тіла в цілому, серця,

печінки та селезінки становили  $1,40 \pm 0,57$ ,  $10,50 \pm 4,68$ ,  $9,89 \pm 8,91$  та  $9,75 \pm 6,00$  відповідно.

Перед впровадженням протоколу мічення "mix-and-shoot" при приготуванні придатного до клінічних умов  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-ДТПК, було потрібно оцінити відтворюваність протоколу. Через це, використовуючи різні партії хлориду  $^{90}\text{Y}$ , було приготовлено 10 партій зразків для перевірки достовірності. Для десяти приготовлених партій значення імунореактивності, отримані з використанням "mix-and-shoot", знаходились в діапазоні від 60,6% до 93,3% із середнім значенням 74,5% та медіаною 72,1%. Це утримання імунореактивності є значно кращим за приблизно 60%, яке отримували раніше, використовуючи теперішній метод РХВР (в діапазоні від 54,9% до 65,1%; середнє значення 60,2%). Середнє значення інкорпорування для десяти партій становило 95,5% (в діапазоні від 93,5% до 97,5%). Це значення може бути порівняно з раніш отриманим за допомогою методу РХВР (в діапазоні від 91,7% до 93,7% та середнім значенням 91,3%). Для десяти партій також могли бути порівняні результати з ендотоксину, концентрації антитіла, концентрації радіоактивності, питомої активності, загальної радіоактивності тари, загальної концентрації білка, рН та стерильності. Разом ці результати підтвердили відтворюваність методу «mix&shoot». До того ж, автори оцінювали варіативність процесу внаслідок різного часу мічення, проводячи реакцію впродовж 5 та 10 хвилин. Через те що не було помічено суттєвої відмінності для двох реакцій різної тривалості, було вирішено, що в кінцевому протоколі належить використовувати коротший час витримання.

#### Д. Резюме

Автори розробили процедуру мічення, яка має назву «mix&shoot» метод, для приготування клінічних доз міченого  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК, яка усуває потребу у стадії рідинної хроматографії високого розділення (РХВР), що використовується зараз для вилучення не зв'язаного білком радіоізоотопу. Спрощений протокол вилучає цю трудомістку стадію очищення, в той же час підтримуючи високий рівень інкорпорування радіоізоотопів (>95%) та поліпшене утримання імунореактивності (>70%). Було виявлено, що радіомічений кон'югат підібраного за клінічних умов складу є стабільним *in vitro*, при витриманні при 4°C протягом 48 годин, за рівнем утримання радіоізоотопу та імунореактивності. До того ж, радіомічений кон'югат залишався стабільним, після витримання в людській сироватці при 37°C протягом 72 годин. Дослідження з біорозподілу на мишах лінії BALB/c не показали незвичайного накопичення в тканинах, включаючи кісткову. Оцінка поглинутих доз радіації в "стандартному" (72кг) тілі людини могла бути порівняною з отриманою в активних (on-going) клінічних випробуваннях з використанням міченого  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК. Результати цих досліджень показали, що мічений  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК, отриманий з використанням протоколу «mix&shoot» міг бути порівняний з отриманим за допомогою традиційного процесу РХВР. Достовірність розширеного протоколу приготування придатного для застосування в клінічних умовах міченого кон'югату показала, що спосіб забезпечує відтворюваність і що продукт може бути порівняний з таким, що отримали, використовуючи загальнозастосовуваний метод РХВР. Ці результати доклінічних досліджень показують, що цей новий «mix&shoot» протокол може бути використаний для приготування міченого  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК, придатного для застосування в клінічних випробуваннях.

Приклад 1. Радіоінкорпорування - комплект обладнання й аналіз.

#### I. Резюме

Метою даного винаходу була розробка протоколів комплексу мічення радіоактивним ізоотопом для приготування мічених  $^{111}\text{In}$  та  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК (In2B8 та Y2B8 відповідно) та визначити специфікацію виходу для клінічних продуктів. Протоколи комплексу мічення радіоактивним ізоотопом являлися відтворюваними стосовно радіоінкорпорування та зв'язування з антиген-позитивними SB клітинами і показують придатність комплексу мічення радіоактивним ізоотопом для використання в клінічних випробуваннях. Рекомендується, щоб норми виходу  $^{111}\text{In}$  та  $^{90}\text{Y}$  для радіоінкорпорування та зв'язування були затвердженими на рівні >95% та >70% відповідно.

#### II. Вступ

Мічене  $^{90}\text{Y}$  мишаче моноклональне антитіло антиCD20 (Y2B8) легко оцінюється в клінічних випробуваннях лікування рецидиву В-клітинної лімфоми. Ізотоп ітрію має брак гама-компоненту, що робить його непридатним для системи візуалізації. Через це мічений  $^{111}\text{In}$  2B8-MX-ДТПК (In2B8) буде використовуватися для аналізу локалізації пухлини та дозиметрії у пацієнтів до або після лікування міченим ітрієм препаратом. Протокол, що використовується тепер для приготування In2B8 та Y2B8, і називається методом «mix&shoot», дає радіомічені антитіла, що придатні для клінічних досліджень. Проте, спрощення процесу мічення прискорило б приготування дози в клінічних умовах.

Новий комплект мічення радіоактивним ізоотопом переважно складається з чотирьох компонентів: 1) 2B8-MX-ДТПК в нормальному з низьким вмістом металу сольовому розчині при 2мг/мл; 2) 50мМ ацетату натрію, який використовується для забезпечення розчину радіоізоотопу придатним для мічення рН; 3) підібраний буфер (1X PBS, рН 7,4, який містить людський сироватковий альбумін та 1мМ ДТПК); 4) пусту 10мл скляну пляшечку (реакційну пляшечку). Всі компоненти, які випробуються, мають бути стерильними й не містити пірогену.

Це повідомлення підсумовує придатність цього комплексу мічення радіоактивним ізоотопом, який є простим у використанні, і який забезпечує вихід радіомічених антитіл з рівнем радіоінкорпорування >95% та придатне утримання зв'язку з антиген-позитивними клітинами. Для клінічних продуктів рекомендується тестування норм виходу.

#### III. Матеріали й способи для інкорпорування

А. Реагенти, які входять до комплексу мічення радіоактивним ізоотопом

1. 2B8-MX-ДТПК, IDEC; партія (лот) # 082395RM2
  2. 50мМ ацетат натрію, з низьким містом металу, IDEC; партія # 082395RM3
  3. Вибір складу буфера (1X PBS, рН 7,4, який містить 7,5% (м/об) людського сироваткового альбуміну і 1мМ ДТПК), IDEC, партія # 082395RM1
  4. Реакційна пляшечка, 10мл, IDEC
- Б. Матеріали й обладнання
1. Комплект радіоінкорпорування Biodex Tec-Control, IDEC; Кат. # 151-770
  2. Рукавички: без порошку
  3. Стерильні поліпропіленові шприци

4. Стерильний зайвий шприц
5. Невеликі трубочки з корками; 1,5мл
- В. Способи

1. Приготування In2B8 та Y2B8, з використанням набору мічення радіоактивним ізотопом

Реагенти комплексу готували й заливали в скляні пляшечки з перегородкою (мембраною). Пляшечки (2 або 10мл) з боросилікатного скла Тип 1 промивали стерильною водою для ін'єкції (ВДІ) й перед заповненням витримували в автоклаві. Перегородку з бутилкаучуку промивали стерильною ВДІ й перед використанням витримували в автоклаві. Реагенти заливали вручну й затискали в боксі Класу 100 й перевіряли на пірогенність й стерильність, використовуючи методи USP.

- а. Приготування In2B8

Додаткові реагенти:

1. Індій-[111]: хлорид, вільний від носія, в HCl.

Застереження:

1. Всі стадії виконувались переважно з використанням асептичних методик.
2. Компоненти комплексу мічення радіоактивним ізотопом перед використанням мають мати кімнатну температуру.

3. Кінцевий продукт належить увести пацієнту протягом 8 годин заключної 9 стадії, про яку йдеться нижче.

Протокол мічення радіоактивним ізотопом In2B8

Процедура

1. Об'єм  $^{111}\text{InCl}_3$ , який додавали в реакційну пляшечку, обчислювали як наведено нижче:

а. Концентрацію радіоактивності після часу мічення радіоактивним ізотопом в мКі/мл: Со=концентрація радіоактивності під час калібрування (див. Сертифікат аналізу виробника).

$\Delta t$ =зміна в часі (позитивне значення-після калібрування, негативне значення-перед калібруванням).

$$\text{Концентрація радіоактивності під час радіомічення} = \frac{C_0}{C_{0,0103(\Delta t)}}$$

- б. Об'єм  $^{111}\text{InCl}_3$ , який додавали в реакційну пляшечку:

$$\frac{5,5\text{мКі}}{\text{Концентрація радіоактивності під час мічення}} = \text{об'єм для додавання в реакційну пробірку}$$

2. Об'єм в 50мл ацетату натрію, який слід додавати в реакційну пляшечку обчислювали як наведено нижче:

Об'єм  $^{111}\text{InCl}_3$ , який додали (Стадія 1б) X (1,2) = об'єм 50мМ ацетату натрію, який слід додати.

3. Перегородку реакційної пляшечки й пляшечку для 50 мМ ацетату натрію (Стадія 2) переносили в реакційну пляшечку. Використовуючи 1 cc шприц, обчислений об'єм ацетату натрію (Стадія 2) переносили в реакційну пляшечку.

4. Перегородку джерела  $^{111}\text{InCl}_3$  протирали спиртом, пляшечку продували через голку, обладнану стерильним фільтром 0,2мкм. Використовуючи 1cc стерильний шприц, потрібний об'єм (Стадія 1б)  $^{111}\text{InCl}_3$  переносили до реакційної пляшечки. Вміст пляшечки перемішували перекидаючи її декілька разів.

5. Перегородку пляшечки для 2B8-MX-ДТПК протирали спиртом. Використовуючи 1cc шприц, 1мл 2B8-MX-ДТПК повільно переносили до реакційної пляшечки. Вміст пляшечки перемішували перекидаючи її декілька разів.

6. Реакція тривала протягом 30 хвилин  $\pm$  5 хвилин при оточуючій температурі.

7. Загальний об'єм реакційної суміші обчислювали, складаючи разом додані об'єми  $^{111}\text{InCl}_3$  (Стадія 4), 50мМ ацетату натрію (Стадія 3) та 2B8-MX-ДТПК (Стадія 5).

8. Об'єм підбраного буфера, який слід додавати в реакційну пляшечку для отримання кінцевого об'єму в 10мл, обчислювали, віднімаючи загальну кількість, обчислену в стадії 7, від 10.

9. Пляшечку для підбраного буфера протирали спиртом й продували. Через в'язкість підбраного буфера, реакційну пляшечку продували, використовуючи голку, обладнану стерильним фільтром 0,2мкм. Використовуючи 10cc стерильний шприц разом з голкою відповідного діаметра (стандарту) об'єм підбраного буфера, обчислений на Стадії 8, переносили до реакційної пляшечки. Вентиляційну голку видаляли з реакційної пляшечки, а вміст пляшечки перемішували перекидаючи її декілька разів (Кінцевий продукт). Цю пляшечку перед проведенням "Аналізу радіоінкорпорування" витримували принаймні 5 хвилин. Розчин мав колір бурштину а пляшечка була повна, підтверджуючи, що підбраний буфер був доданим.

10. Загальну радіоактивність кінцевого продукту вимірювали, використовуючи відповідний інструментальний набір для вимірювання  $^{111}\text{In}$ .

11. Кінцевий продукт миттєво віддавали на зберігання при 2°-8°С для "Аналізу зв'язування" та "Аналізу радіоінкорпорації".

- б. Приготування Y2D8

Додаткові реагенти:

1. Ітрій-[90]: хлорид, вільний від носія, в HCl.

Застереження:

1. Всі стадії виконувались переважно з використанням асептичних методик.
2. Компоненти комплексу мічення радіоактивним ізотопом перед використанням мають мати кімнатну температуру.

3. Продукт належить увести пацієнту протягом 8 годин заключної стадії 8, про яку йдеться нижче.

Протокол мічення радіоактивним ізотопом In2B8

1. Об'єм  $^{90}\text{YCl}_3$ , який додавали в реакційну пляшечку, обчислювали як наведено нижче:

а. Концентрація радіоактивності після часу мічення радіоактивним ізотопом:  $C_0$  = концентрація радіоактивності під час калібрування (див. Сертифікат аналізу виробника).

$\Delta t$  = зміна в часі (позитивне значення – після калібрування, негативне значення – перед калібруванням).

$$\text{Концентрація радіоактивності під час радіомічення} = \frac{C_0}{0,0108(\Delta t)}$$

б. Об'єм  $^{90}\text{YCl}_3$ , який додавали в реакційну пляшечку:

$$\frac{4,5\text{мКі}}{\text{Концентрація радіоактивності під час мічення}} = \text{об'єм для додавання в реакційну пробірку}$$

2. Об'єм в 50мл ацетату натрію, який слід додавати в реакційну пляшечку обчислювали як наведено нижче:

а. Для  $^{90}\text{YCl}_3$  у 0,040М HCl (Amersham):

Об'єм  $^{90}\text{YCl}_3$  (Стадія 16)  $\times$  (0,8) = об'єм 50мМ ацетату натрію, який слід додати.

б. Для  $^{90}\text{YCl}_3$  у 0,050М HCl (Nordion):

Об'єм  $^{90}\text{YCl}_3$ , який додали (Стадія 16)  $\times$  (1,0) = об'єм 50мМ ацетату натрію, який слід додати.

3. Перегородку реакційної пляшечки й пляшечку для 50мМ ацетату протирали спиртом. Використовуючи 1сс шприц, обчислений об'єм (Стадія 1а або 1б) 50мМ ацетату натрію (Стадія 2) переносили в реакційну пляшечку. Вміст пляшечки перемішували, перекидаючи її декілька разів.

4. Перегородку джерела  $^{90}\text{YCl}_3$  протирали спиртом. Пляшечку продували через голку, обладнану стерильним фільтром 0,2мкм. Використовуючи 1сс стерильний шприц, потрібний об'єм (Стадія 16)  $^{90}\text{YCl}_3$  переносили до реакційної пляшечки. Вміст пляшечки перемішували, перекидаючи її декілька разів.

5. Перегородку пляшечки для 2В8-МХ-ДТПК протирали спиртом. Використовуючи 3сс шприц, 1,5мл 2В8-МХ-ДТПК повільно переносили до реакційної пляшечки. Вміст пляшечки перемішували, перекидаючи її декілька разів.

6. Загальний об'єм реакційної суміші обчислювали, складаючи разом додану кількість хлориду Y-90 (Стадія 4), додані 50мМ ацетату натрію (Стадія 3) та додану кількість 2В8-МХ-ДТПК (Стадія 5).

7. Об'єм підбраного буфера, який слід додавати в реакційну пляшечку для отримання кінцевого об'єму в 10мл, обчислювали, віднімаючи загальну кількість, обчислену в стадії 6, від 10.

8. Пляшечку для підбраного буфера протирали спиртом й продували. Через в'язкість підбраного буфера, реакційну пляшечку продували, використовуючи голку, обладнану стерильним фільтром 0,20мкм. Використовуючи 10сс стерильний шприц разом з голкою відповідного діаметра (стандарту) об'єм підбраного буфера, обчислений на Стадії 7, переносили до реакційної пляшечки. Вентиляційну голку видаляли з реакційної пляшечки, а вміст пляшечки перемішували, перекидаючи її декілька разів (Кінцевий продукт). Цю пляшечку перед проведенням "Аналізу радіоінкорпорування" витримували принаймні 5 хвилин. Розчин мав колір бурштину, а пляшечка була повна, тим самим підтверджуючи, що підібраний буфер був доданий.

9. Загальну радіоактивність кінцевого продукту вимірювали, використовуючи відповідний інструментальний набір для вимірювання  $^{90}\text{Y}$ .

10. Кінцевий продукт миттєво віддавали на зберігання при 2°-8°С для "Аналізу зв'язування" та "Аналізу радіоінкорпорації".

11. Тестування на імунореактивність:

Використовуючи шприц на 1мл, за асептичних умов відбирали 0,1мл з реакційної пляшечки та переносили в окрему 1,5мл трубку, яка загвинчується. Трубку миттєво передавали для зберігання при 2°-8°С для "Аналізу зв'язування" та "Аналізу радіоінкорпорації".

Атестація протоколу комплексу мічення радіоактивним ізотопом була виконана в IDEC Pharmaceuticals (Сан-Дієго, Каліфорнія), Anderson Health Center (Х'юстон, Техас), Mayo Clinic (Рочестер, Мен) та City of Hope (Дуарте, Каліфорнія). Всі компоненти комплексу, включно з 2В8-МХ-ДТПК для клінічного використання, було приготовлено IDEC Pharmaceuticals за умов GMP (Good manufacturing Conditions, які відповідали Code Of Federal Regulations) та перевірено на стерильність та відсутність пірогену. Радіомічені антитіла сполучали з 1Х PBS, який містив 7,5% (м/об) людського сироваткового альбуміну (ЛСА; для клінічного застосування; Baxter-Hyland) та 1мМ ДТПК. Результати тестів для випуску нової продукції, виконаних по кожній атестаційній партії, описані нижче.

По шість атестаційних партій з In2В8 та Y2В8 були приготовлені п'ятьма операторами. Ці партій позначали, як наведено нижче, й виготовляли в нижченаведених установах:

In2В8:

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

Y2В8:

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

## 2. Приготування клітин, ліофілізованих SB та HSB

Лінії людських клітин SB (CD20-позитивних) та HSB (CD20-негативних) отримували від American Type Culture Collection та культивували у Т-колбах, використовуючи RPMI-1640, який містить 10% ембріональної сироватки бика, доповненої 2% глутаміну. Культури тримали при 37°C та 5% CO<sub>2</sub>. Клітини зазвичай ділили 1:2 кожний другий день та відбирали 0,5-2,5×10<sup>6</sup> клітин/мл із життєздатністю >80%. Концентрацію клітин визначали гематиметром, а життєздатність визначали за допомогою виключення трипанового синього.

Клітини збирали при температурі оточуючого середовища при щільності клітин 0,5-2×10<sup>6</sup> клітин/мл за допомогою центрифугування (1300 rpm у центрифугі Sorvall) та двічі промивали 1X HBSS. Осаджені клітини суспендували повторно до 50×10<sup>6</sup> клітин/мл у 1X HBSS, що містив 1% (м/об) бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та 10% (м/об) манітолу (ліофілізаційний буфер), 0,5мл розподіляли у 1,5мл поліпропіленових пробірках для мікроцентрифугування з о-кільцевими прокладками та зберігали при -70°C й ліофілізували протягом ночі при 30-60мілітор. Пробірки з ліофілізованими клітинами зберігали висушеними при 2-8°C, а для аналізу відновлювали у стерильній воді; пробірки з ліофілізованими клітинами у пробірках для мікроцентрифугування зберігали з десикантом (осушувачем).

## 3. Аналітичний аналіз

Аналітичні методи, використані для перевірки атестаційних партій In2B8 та Y2B8, описані нижче. Для кожної атестаційної партії були виконані такі кількісні аналізи:

1. Аналіз зв'язування з використанням ліофілізованих SB клітин. 2. Аналіз радіоінкорпорування In2B8/Y2B8 з використанням комплекту Biodex.

### а. Аналітичне зв'язування

Відсоткове зв'язування було оцінене кожним оператором, використовуючи ліофілізовані CD20 позитивні SB клітини відповідно до нижченаведених протоколів для In2B8 та Y2B8, відповідно. Ці аналізи забезпечують швидкий та дієвий спосіб підтвердження того, що радіомічені антитіла все ще розпізнають CD20 як антиген. На одному клінічному місці оцінювали також CD20-негативні HSB клітини. Ліофілізовані клітини готували та зберігали у відповідності із вищезгаданою методикою "Приготування ліофілізованих SB та HSB клітин".

#### і. Аналіз зв'язування In2B8. Додаткові реагенти:

1. Індій-[111]-2B8-MX-ДТПК
2. Ліофілізовані SB клітини; три пробірки, що містять 25×10<sup>6</sup> клітин/пробірку.
3. Ліофілізовані HSB клітини; три пробірки, що містять 25×10<sup>6</sup> клітин/пробірку.
4. Стерильна вода для промивань або стерильна вода для ін'єкцій.
5. Буфер для розбавлення (1x PBS, pH 7,2-7,4, що містить 1% бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та 0,02% азиду натрію 0,2мкм) фільтрували та зберігали при кімнатній температурі.
6. Скляні або пластикові дослідні пробірки для підрахунку радіоактивності.

#### Процедура:

##### Схема досліду (не радіоактивна частина)

1. Було отримано три пробірки з ліофілізованими SB та HSB клітинами.
2. До кожної пробірки був доданий 50мл СВДІ (стерильна вода для ін'єкцій) і пробірки обертались доти, доки не отримували гомогенної суспензії.

3. Чотири порожні пробірки для мікроцентрифугування по 1,5мл. У три пробірки заливали по 0,50мл буферу для розбавлення, і вони являли собою контрольні, без клітин, зразки.

4. В іншу пробірку на 1,5мл було додано 0,99мл буферу для розбавлення; ця пробірка була помічена 1:100.

5. Брали стерильну поліпропіленову пробірку на 50мл з кришкою і додавали в неї 10мл буфера.

##### Схема досліду (радіоактивна частина)

1. Отримували радіомічене антитіло, що зберігали при 2°-8°C.
2. 0,01мл відбирали з P20 і додавали у пробірку для мікроцентрифугування, що містила 0,99мл буферу для розбавлення (розведення 1:100). Верхівка була промита і пробірку обережно обертали для утворення суміші.

3. 0,20мл були відібрані з P200 з пробірки з розведенням 1:100 та додані до кінчної пробірки, що містила 10мл буфера для розбавлення. Вміст пробірки ретельно перемішували.

#### Протокол аналізу

1. 0,50мл розбавленого <sup>111</sup>In2B8-MX-ДТПК додавали в усі пробірки.
2. Кришки були надійно закриті на всіх пробірках, і вміст пробірок безперервно перемішувався протягом 60 хвилин.

3. Після 60-хвилинної інкубації при температурі оточуючого середовища, всі пробірки центрифугували протягом 5 хвилин при 2000 g мінімум.

4. 0,75мл кожного супернатанту переносили у пробірки, які є підходящими для лічильного обладнання.

5. Радіоактивність у пробірках підраховували за допомогою лічильника гамма-часток з урахуванням фону.

#### ii. Аналіз зв'язування Y2B8. Додаткові реагенти:

1. <sup>90</sup>Y-2B8-MX-ДТПК
2. Ліофілізовані SB клітини
3. Стерильна вода для промивань або стерильна вода для ін'єкцій.
4. Буфер для розбавлення (1X PBS, pH 7,2-7,4, що містить 1% бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та 0,02% азиду натрію)

#### Процедура:

##### Приготування зразка міченого антитіла

1. Отримували радіомічене антитіло, що зберігали при 2°-8°C.
2. 10мкл відбирали з P20 і додавали у пробірку 1,5мл для мікроцентрифугування, яка містила 0,990мл буферу для розбавлення (розведення 1:100). Верхівка була промита і пробірку обережно обертали для утворення суміші.



3. Отримували 50мл стерильну поліпропіленову пробірку з кришкою й, використовуючи 10мл серологічну піпетку, додавали в неї 10мл буфера для розбавлення.

4. 35мкл були відібрані з P200 з пробірки з розведенням 1:100 та додані в кінчну пробірку, що містила 10мл буфера для розбавлення. Вміст пробірки ретельно перемішували.

Приготування ліофілізованої клітини

1. Було отримано три пробірки з ліофілізованими SB клітинами.

2. До кожної пробірки був доданий 50мл СВДІ і пробірки обертались доти, доки не отримували єдиної клітинної суспензії.

3. Отримували три порожніх пробірки для мікроцентрифугування по 1,5мл; у три пробірки заливали по 0,5мл буферу для розбавлення, і вони являли собою контрольні, без клітин, зразки.

Протокол аналізу

1. 0,50мл розбавленого  $^{90}\text{Y}2\text{B8-MX-ДТПК}$  додавали в усі пробірки.

2. Після перевірки, чи кришки на всіх пробірках щільно закриті, пробірки переносили на дно міксера на 45 хвилин.

3. Після 45-хвилинної інкубації при температурі оточуючого середовища, всі клітини осаджували за допомогою мікроцентрифугування протягом 5 хвилин.

4. 0,8мл кожного супернатанту переносили у пробірки для сцинтиляції.

5. Сцинтиляційний коктейль додавали у кожну пробірку.

6. Рівень радіоактивності у кожній пробірці визначали, використовуючи сцинтиляційний лічильник з урахуванням фону.

6. Аналіз радіоінкорпорування

Відсоток радіоінкорпорування визначали за допомогою миттєвої тонкошарової рідинної хроматографії (ТШРХ), використовуючи радіохроматографічний комплект Biodex Tec-Control, який відповідав нижченаведеному протоколу: Додаткові матеріали й обладнання:

1. Радіомічений  $^{111}\text{In}$ - або  $^{90}\text{Y-MX-ДТПК}$

2. Пробірки для підрахунку радіоактивних смужок TPX

3. Пінцети

4. Стерильний шприц, 1сс

5. Стерильні голки, 26G

6. Лічильник гама-випромінювання або сцинтиляційний лічильник

7. Піпетка

Процедура:

1. Спочатку слід прочитати Інструкцію по роботі з комплектом Biodex.

2. Кожний радіомічений зразок тричі випробували у відповідності до інструкцій по роботі з комплектом; проявляли одну смужку на ампулу.

3. Для нанесення крапель міченого зразка на хроматографічну смужку використовували піпетку, щоб нанести 1мкл на початок лінії. Як альтернатива, можна було нанести одну маленьку краплю, видавлену з 26G голки, прилаштованої до стерильного 1сс шприца.

4. Обчислювали рівень радіації кожної секції, використовуючи відповідний лічильник, тобто лічильник гама часток для  $^{111}\text{In}$  та сцинтиляційний лічильник для  $^{90}\text{Y}$ , налаштовуючись на фон.

5. Для обчислення відсотку міченого антитіла застосовували інструкції Biodex.

IV. Результати

Результати тестування кожної перевіркової партії In2B8 та Y2B8 наведені в Таблицях 38 та 39.

Таблиця 38

Результати аналізу виходу (вивільнення) для перевірки Y2B8

Номер партії	% Радіоінкорпорування	% Зв'язування
1	99,5	78,6
2	99,3	87,0
3	99,4	85,9
4	99,2	81,8
5	99,2	79,6
6	96,3	80,8
Середнє = 98,8	Середнє = 82,3	

Середньоквадратичне відхилення=1,24%

KB=1,25%

KB - коефіцієнт варіації

Середньоквадратичне відхилення=3,4

KB=4,2%

Таблиця 39

Результати аналізу виходу для перевірки In2B8

Номер партії	% Радіоінкорпорування	% Зв'язування
1	99,4	86,2
2	98,7	86,8
3	99,3	85,8
4	98,3	86,7
5	99,0	82,1
6	99,3	83,0

Середнє = 99,0

Середнє = 85,2

Середньоквадратичне відхилення=0,43%  
KB=0,45%

Середньоквадратичне відхилення=2,06%  
KB=2,42%

#### V. Обговорення і висновки

З метою спрощення методів мічення радіоактивним ізотопом для In2B8 та Y2B8 було розроблено чотирикомпонентний комплект. Для того щоб забезпечити точне транспортування об'ємів, використовуючи шприци, концентрацію ацетату натрію та 2B8-MX-ДТПК скорочували до 50мМ та 2мг/мл відповідно. Всі компоненти комплексу переважно заливали в скляні пляшечки з перегородками та перед вивільненням перевіряли на стерильність та пірогенність за допомогою IDEC, таким чином усуваючи потребу у цих випробуваннях, які мають буди виконані в клінічних місцях. На місці всі маніпуляції з реагентами виконуються, використовуючи стерильні шприци та голки. Через це суворе дотримання асептичних технологічних прийомів, на яких зазвичай базується радіофармацевтичне виробництво, гарантує, що радіомічені та винайдені антитіла є придатними для введення пацієнту.

Відтворюваність та складність протоколів мічення радіоактивним ізотопом для In2B8 та Y2B8 оцінювали за допомогою виконання декількох перевірочних прогонів з використанням різних партій кожного радіоізотопу. Для шести перевірочних партій приготовленого In2B8, зв'язування коливалось в діапазоні від 82,1% до 86,8% із середнім значенням 85,1%; значення радіоінкорпорування для In2B8 становило приблизно 99% (діапазон від 98,3 до 99,4%). Для шести перевірочних партій приготовленого Y2B8, отриманий відсоток зв'язування лежав в діапазоні від 78,6% до 87,0% із середнім значенням 82,3%. Середнє значення радіоінкорпорування для Y2B8 становило приблизно 98,8% (діапазон від 96,3 до 99,5%). Разом ці результати підтверджують відтворюваність та складність способів з використанням комплексу мічення радіоактивним ізотопом для приготування як In2B8, так і Y2B8. На основі цих результатів перевірки рекомендується, щоб норми виходу для радіоінкорпорування та зв'язування встановлювалися на рівні >95% та >70% відповідно, як для In2B8, так і для Y2B8.

До того ж, через значно полегшене використання та зменшення можливостей помилки під час приготування, рекомендується, щоб відсоткові рівні зв'язування при використанні ліофілізованих CD20-позитивних клітин і радіоінкорпорування використовувались для тесту виходу In2B8 і Y2B8 в клінічних умовах.

Підсумовуючи, зазначимо, що разом узяті, ці результати вказують на те, що In2B8 і Y2B8, приготовлені з використанням набору мічення радіоактивним ізотопом, є придатними для використання в клінічних умовах. До того ж, норматив виходу для обох радіомічених антитіл встановлюється на підставі результатів декількох перевірочних прогонів, виконаних п'ятьма різними операторами.

#### Приклад 2. Радіоінкорпорування та зв'язування - комплекти та аналізи

##### I. Резюме.

Мишаче анти-CD20 моноклональне антитіло, позначене 2B8, були клоновано в CHO клітинах щоб отримати клітинну лінію високої експресії. Специфічність похідних від CHO клітин для CD20-позитивних людських клітин була продемонстрована за допомогою аналізу FACS й конкурентного зв'язування. Незначне зв'язування спостерігали для людських Т-клітин. Спорідненість антитіла для CD20-позитивних клітин, як було визначено, використовуючи аналіз конкурентного зв'язування, становить  $1,3 \times 10^{-10}$  М. Для того щоб утворити кон'югат, 2B8-MX-ДТПК, з незначними втратами імунореактивності (значення спорідненості було  $4,4 \times 10^{-10}$  М), проводили реакцію антитіла з агентом MX-ДТПК, утворюючи хелати. Оптимальне хелатне сполучення, як визначали за допомогою вимірювання радіоінкорпорування  $^{111}\text{In}$ , досягали після восьмигодинної реакції. З метою гарантування максимального радіоінкорпорування (>90%) та утримання імунореактивності (>70%), протокол мічення радіоактивним ізотопом для 2B8-MX-ДТПК був оптимізований для  $^{90}\text{Y}$  та  $^{111}\text{In}$  стосовно рН та тривалості інкубації. Нормативи виходу для In2B8 та Y2B8, які приготували, використовуючи похідні від CHO 2B8-MX-ДТПК в клінічних випробуваннях, рекомендували для радіоінкорпорування (>95%), а для зв'язування з ліофілізованими та відтвореними CD20-позитивними людськими клітинами (>70%). Узяті разом, ці результати вказують на придатність похідного від CHO 2B8-MX-ДТПК для використання в клінічних випробуваннях.

##### II. Вступ

Антитіло 2B8, яке використовували раніше, отримували в біореакторах на пустотілих волокнах. З метою скоротити виробничі витрати на це антитіло, його клонували й експресували в CHO клітинах, щоб отримати лінію клітин, що продукують високу експресію. В цьому прикладі наведено результати характеристики *in vitro* похідного від CHO 2B8 антитіла, сполучення антитіла (2B8-MX-ДТПК) та мічених  $^{90}\text{Y}$  та  $^{111}\text{In}$  продуктів антитіла, виготовлених з використанням протоколів комплексу мічення радіоактивним ізотопом.

##### III. Матеріали і способи

###### а. Реагенти

Лінії людських клітин SB (CD20-позитивних) ти HSB (CD20-негативних) отримували від American Type Culture Collection та культивували у Т-колбах, використовуючи RPMI-1640, який містить 10% ембріональної сироватки бика доповненої 2% глютаміну. Культури тримали при 37°C та 5% CO<sub>2</sub>. Клітини зазвичай ділили 1:2 кожний другий день та відбирали при  $0,5\text{--}2,5 \times 10^6$  клітин/мл та життєздатністю >80%. Концентрацію клітин визначали гематиметром, а життєздатність визначали за допомогою виключення трипанового синього. Спеціальна інформація про партії клітин записується в зошит №1553 та в прошиту книгу з назвою "Cell Activity Logbook 1995 & 1996", складену Ron Morena.

Похідне від CHO 2B8 продукували за умов GMP у виробничих приміщеннях IDEC. Антитіло виготовляли в нормальному сольовому розчині з низьким вмістом металів 11,5мг/мл. За допомогою SDS-PAGE було визначено, що антитіла є гомогенними. 2B8-MX-ДТПК продукували за умов GMP у відповідності до PSBR-043 з похідного від CHO 2B8 й виробленого в сольовому розчині з низьким вмістом металів 2мг/мл (Партії №165A і 0165B).

Хлорид  $^{111}\text{In}$  фармацевтичної якості купували Amersham (U.K.) або Cyclotron Products Inc. (Coral Gables, FL). Хлорид ітрію[90] одержували від Amersham (U.K.), Nordion International (Kanata, Канада), або Pacific Northwest National Laboratory (Richland, WA). MX-ДТПК, виготовлений за умов GMP, одержували від Hauser

Chemical (Boulder, CO). Клінічної якості кальцій тринатрій диетилентриамінопентаоцтову кислоту (ДТПК) одержували від Heyl (Berlin, Germany - Берлін, Німеччина). TAG-NHS одержували від IGEN Inc. (Rockville, MD). Мишачі анти-CD19 кульки купували у Dynal Inc. (Lake Success, NY). Козячу анти-мишачу F(ab')<sub>2</sub>, позначену FITC, купували у Jackson ImmunoResearch.

Реагенти, які потребували видалення супутніх важких металів, партіями піддавали обробці Chelex 100 (BioRad Industries) або Chelating Sepharose (Pharmacia), пропускаючи розчини крізь колонку. Стандартні розчини з низьким вмістом металів розводили стерильною водою для промивання (СВП). Розчини зберігали в стерильних пластикових контейнерах.

Опис додаткових реагентів подається нижче для спеціальних способів.

#### Б. Матеріали й обладнання

1. Аналізатор Origen; IGEN Inc. Модель #1100-1000; IDEC#1492
2. Сцинтиляційний лічильник Top-Count; Packard, модель #A9912; IDEC #1329
3. Лічильник гама-часток; Isodata, модель #20-10; IDEC #0628
4. Радіохроматографічний комплект Tec-Control, Biodex, модель №151-770
5. Ліофілізатор; Virtis, модель Freezmobile 12; IDEC #0458

Опис додаткових реагентів подається нижче для спеціальних способів.

#### В. Способи

1. Приготування клітин, ліофілізованих SB та HSB

Клітин культивували, як описано вище, й відбирали при кімнатній температурі при щільності клітин 0,5-2,5×10<sup>6</sup> клітин/мл за допомогою центрифугування (1300 rpm у центрифугі Sorvall) та двічі промивали 1X HBSS. Осаджені клітини суспендували повторно до 50×10<sup>6</sup> клітин/мл у 1X HBSS, що містив 1% (м/об) бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та 10% (м/об) манітолу (ліофілізаційний буфер), 0,5мл розподіляли у 1,5мл поліпропіленових пробірках для мікроцентрифугування з о-кільцевими прокладками та зберігали при -70°C й ліофілізували протягом ночі при 30-60міліторр. Пробірки з ліофілізованими клітинами зберігали висушеними при 2-8°C, а для аналізу відновлювали у стерильній воді; пробірки з ліофілізованими клітинами у пробірках для мікроцентрифугування зберігали з десикантом.

2. Аналіз зв'язування FACS

Прямий зв'язок антитіл з людськими В-клітинами визначали за допомогою проточної цитометрії. Антитіла при збільшенні концентрації витримували протягом 30 хвилин на льоду в 1X PBS, pH 7,2, який містить 1% (м/об) БСА (зв'язувальний буфер) з 5×10<sup>6</sup> CD20-позитивними (SB) або CD20-негативними (HSB) клітинами. Клітини промивали за допомогою центрифугування, повторно суспендували в зв'язувальному буфері та витримували протягом 30 хвилин на льоду з позначеним FITC козячим анти-мишачим F(ab')<sub>2</sub>. Після інкубації з додатковими реагентами клітини промивали центрифугуванням та повторно суспендували в 1X PBS, який містив 1,1% (об/об) формальдегіду, щоб зафіксувати клітини.

3. Аналіз конкурентного зв'язування

Імунореактивність 2B8 та 2B8-MX-ДТПК визначали за допомогою конкурентного зв'язування до CD20-позитивних клітин, використовуючи ORIGIN електрохемолюмінесцентний метод (Leland and Powell). SB клітини логарифмічної фази відбирали від культури й двічі промивали 1X HBSS. Клітини розводили в 1X PBS pH 7,2, який містив 1% (м/об) бичачого сироваткового альбуміну. В деяких експериментах ліофілізовані клітини використовували після відновлення стерильною водою.

Мічене рутенієвим радіоіндикатором антитіло готували за допомогою інкубації похідних від CHO 2B8 (партія №165) в 1XPBS, 7,2 pH, з N-гідроксисукцинамідним ефіром рутенійового (II) трис-біпіридинового комплексона (TAG-NHS) при мольному співвідношенні TAG-NHS - антитіло 15:1. Після годинної інкубації при температурі оточуючого середовища, захищеного від світла, реакцію зупиняли за допомогою гліцину протягом 10 хвилин. TAG, що не прореагував, видаляли за допомогою хроматографії з відбором за розміром, використовуючи колонку Pharmacia PD-10, яку врівноважували 1X PBS. Концентрацію білка визначали, використовуючи Bradford білковий аналіз. Інкorporацію TAG визначали за допомогою вимірювання поглинання при 455nm. Обчислене молярне співвідношення TAG та білка склало 3,0.

Аналіз проводили в 12×75мм поліпропіленових пробірках. Різні кількості конкуруючого антитіла (0,002-17мкг/мл) витримували 1X PBS, pH 7,2, який містив 1% (м/об) БСА з 0,08мкг/мл CHO 2B8, міченого TAG, 0,08мг/мл анти-CD 19 кульки, та 167000клітин/мл. Після інкубації при температурі оточуючого середовища та при круговому перемішуванні протягом 3г, відносну електрохемолюмінесценцію (ЕХЛ) визначали, використовуючи прилад ORIGIN. Отримували середнє значення ЕХЛ для двох зразків та будували графік в залежності від концентрації конкуруючих антитіл, використовуючи програмний пакет Kaleidagraph. Для деяких експериментів будували залежність відсотка інгібування. Конкуруючі криві підганяли й визначали значення EC 50 (концентрація антитіла, що дає 50% максимального зв'язування), використовуючи нижченаведену програму з чотирьох параметрів:

$$Y = ((m1 - m4) / (1 + (m0 / m3)^{m2})) + m4; m1 =; m2 =; m3 =; m4 = m0 = \text{незалежна змінна}$$

m1=відгук на нульовий сигнал

m2=параметр кривизни

m3=EC50 в мкг/мл

m4=відгук на максимальний сигнал у відносних одиницях ЕХЛ

Середнє значення спорідненості обчислювали із значень EC50 та відомої концентрації міченого антитіла, використовуючи метод Мюллера (Muller).

4. Приготування 2B8-MX-ДТПК

Хелатний агент, 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінопентаоцтова кислота, постачалась як сухий порошок (вільний від кислоти) й зберігався зневодненим при -20° або -70°C. Приблизно 3мг антитіла CHO 2B8 в нормальному сольовому розчині з низьким вмістом металів доводили до pH 8,6, додаючи одну десяту об'єму 50мМ борату натрію, pH 8,6. Антитіло при 10-11мг/мл витримували при молярному співвідношенні MX-ДТПК до білка 4:1, додаючи розчинений в 50мМ бораті натрію MX-ДТПК; pH 8,6. Після інкубації при температурі оточуючого середовища (від 2 до 4 годин), комплексон, що не прореагував, видаляли з кон'югату за допомогою багаторазової діафільтрації в нормальний з низькими вмістом металу

сольовий розчин, використовуючи фільтри для центрифугування Centricon 30.

#### 5. Приготування In2B8 та Y2B8

In2B8 готували, використовуючи протокол комплексу мічення радіоактивним ізотопом, як було описано. Антитіло мітили при питомій активності 3мКі/мг й виробляли до 2мг/мл. Коротко, від 0,5 до 2мКі хлориду  $^{111}\text{In}$  переносили у вільну від металу пробірку для мікроцентрифуги та використовуючи 1,2X об'єм 50мМ низько-металевого ацетату натрію, доводили рН приблизно до 4,2. 2B8-MX-ДТПК при 2мг/мл додавали до розчину ацетату індію і після інкубації при оточуючій температурі протягом 30 хвилин мічене антитіло виробляли до 0,2мг/мл в 1X PBS, рН 7,2, що містив 7,5% (м/об) людського антисироваткового альбуміну та 1мМ ДТПК (від 4% до 6% кінцевої концентрації ЛСА). Дослідження з радіоінкорпорування для всіх зразків проводили тричі; значення склало >95%.

Y2B8 також готували, використовуючи лабораторний варіант протоколу комплексу мічення радіоактивним ізотопом, описаний в Прикладі 1. Антитіло позначали при питомій активності 15мКі/мг й виготовляли до 0,3мг/мл. Коротко, від 0,5 до 2мКі хлориду  $^{90}\text{Y}$  переносили у вільну від металу пробірку для мікроцентрифуги та використовуючи 1,2X об'єм 50мМ низько-металевого ацетату натрію, доводили рН приблизно до 4,2. 2B8-MX-ДТПК при 2мг/мл додавали до розчину ацетату  $^{90}\text{Y}$  після інкубації при оточуючій температурі протягом 5 хвилин, мічене антитіло виробляли до 0,3мг/мл в 1X PBS, рН 7,2, що містив 7,5% (м/об) людського антисироваткового альбуміну та 1мМ ДТПК (від 4% до 6% кінцевої концентрації ЛСА). Дослідження з радіоінкорпорування для всіх зразків проводили тричі; значення склало >95%.

Концентрацію радіоактивності кінцевих радіомічених продуктів обчислювали за кількістю радіації, уведеної у реакційну суміш, та за допомогою посилення на Сертифікат Аналізу радіоізоотопу. Концентрацію антитіла в реакційній суміші, в якій зупинена реакція, обчислювали, виходячи з відомої кількості доданого антитіла.

Для досліджень кінетики мічення радіоактивним ізотопом, що проводились з метою оцінити вплив рН на радіоінкорпорування та зв'язування, рН реакційної суміші підбирали, додаючи різну кількість низько-металевого 50мМ ацетату натрію (від 0,8 до 2,2X об'єм розчину ізоотопу).

#### 6. Визначення радіоінкорпорування In2B8 та Y2B8

Рівень радіоактивності кон'югату (радіоінкорпорування) в кінцевих продуктах або інкубаційних зразках визначали, використовуючи наявний у продажу комплект, вироблений Biotex (Tec-Control Radiochromatographic Kit - радіохроматографічний комплект; див. Приклад 1). Зазвичай використовували 2 чи 3 1мкл зразка для випробування, використовуючи мікропіпетку, й обробляли відповідно до вкладеної інструкції Biotex. Половинки смужок використовували для оцінки радіоактивності в скляних пробірках, використовуючи гама лічильник Isodata або сцинтиляційний лічильник Packard Top Count, як описано нижче. Інкорпорування радіомітки рахували, ділячи кількість радіоактивності у верхній частині половинки смужки на загальну радіоактивність, виявлену як у верхній, так і у нижній половинках. Цю величину представляли у відсотках та як середнє значення, що визначали.

#### 7. Визначення імунореактивності In2B8 та Y2B8

Імунореактивність аналізували, використовуючи метод Lindmo та ін., та як описано вище у Прикладі 1.

#### 8. Прямий аналіз зв'язування

Такий самий протокол, що описаний тут, використовували для визначення сполучення із CD20-позитивними SB клітинами In2B8 та Y2B8, відповідно. In2B8 та Y2B8 готували та виробляли, як описано вище. Для аналізу, зразки In2B8 або Y2B8 розбавляли буфером розведення для аналізу (1XPBS, рН 7,2, що містить 1% (м/об) бичачого сироваткового альбуміну (BSA) до 40нг/мл та 1нг/мл, відповідно.

Антиген-позитивні (SB) та антиген-негативні (HSB) клітини тримали у RPMI1640, доповненому 10% сироватки зародку теляти при 37°C та 5% CO<sub>2</sub>. Клітини (із життєздатністю >90%, яку визначали за допомогою включення трипану голубого) збирали при оточуючій температурі при густині (щільності) 0,5-2×10<sup>6</sup>клітин/мл за допомогою центрифугування (1300 rpm на центрифугу Sorvall) та двічі промивали 50мл 1X HBSS. Гранульовані клітини суспендували до 50×10<sup>6</sup>клітин/мл у попередньо охолодженому 1 HBSS, який містив 1% (м/об) бичачому сироватковому альбуміні (BSA) та 10% (м/об) маніті (буфер для ліофілізації). Клітинні суспензії розливали в 1,5мл поліпропіленові пробірки для мікроцентрифугування з о-кільцевими прокладками при 50×10<sup>6</sup>клітин/мл (0,5мл на пробірку) та ліофілізували протягом ночі при 30 до 60 міліторр. Ліофілізовані клітини зберігали зневодненими 2-8°C та відновлювали в стерильній воді для аналізу.

Ліофілізовані SB та HSB клітини в 1,5мл поліпропіленових пробірках відновлювали до 50×10<sup>6</sup>клітин/мл, використовуючи стерильну воду. Розбавлені In2B8 та Y2B8 додавали до клітин за три рази й витримували протягом від 45 до 60 хвилин, змішуючи перекиданням пробірки з донця на корок, при оточуючій температурі. Після інкубації клітини за допомогою центрифугування гранулювали й визначали рівень радіоактивності клітин, рахуючи використовуючи гама лічильник Isodata або сцинтиляційний лічильник Packard Top Count, як описано нижче. Радіоактивність зв'язку з клітинами обчислювали (B) з клітинами, віднімаючи незв'язану радіоактивність (супернатант) від загальної радіоактивності, що додавали. Загальний рівень радіоактивності обчислювали за радіоактивністю, яку визначили для пробірок без клітин. Відсоток зв'язування обчислювали, представляючи кількість імпульсів зв'язків у відсотках від загальної кількості імпульсів.

#### 9. Вимірювання радіоактивності

Кількість імпульсів радіоінкорпорованих зразків підраховували протягом хвилини, використовуючи гама лічильник Isodata. Лічильник встановлювали для реєстрації випромінювання (каналу дискримінації) 100-500KeV, а фонові значення встановлювались на нуль перед самим дослідженням зразка, використовуючи  $^{111}\text{In}$ . Лічильник Isodata використовували також для підрахунку кількості імпульсів від смужок MTPX, що мали нанесений на них  $^{90}\text{Y}$ . Смуга реєстрації випромінювання для виявлення гальмівного випромінювання була 100-1000KeV.

Для аналізу зв'язування зразки  $^{90}\text{Y}$  переносили на 24-лункові планшети та суміш MicroScint 40 і підраховували кількість імпульсів в Packard TopCount, використовуючи мінімальні та максимальні установки енергії. Кількість імпульсів для зразків індію-[111] підраховували протягом хвилини, використовуючи гама

лічильник Isodata. Лічильник встановлювали для реєстрації випромінювання (каналу дискримінації) 100-500KeV, а фонові значення встановлювались на нуль перед самим дослідженням зразка.

#### 10. Норми виходу для клінічних доз In2B8 та Y2B8

Норми виходу для радіоінкорпорування та зв'язування з CD20-позитивними клітинами встановлювали за допомогою приготування шести доз кожного з In2B8 та Y2B8, використовуючи дві партії 2B8-MX-ДТПК клінічної якості (Партії №0219 та 0220), які були приготовленими у відповідності до даного винаходу й заповнені за GMP умов. Аналіз виходу виконували, як описано вище.

#### IV. Результати

##### A. Характеристика похідного від CHO2B8

Використовуючи проточний цитометричний аналіз, було продемонстровано, CHO 2B8 зв'язується (сполучається) безпосередньо з CD20-позитивними SB клітинами без зв'язування з CD20-негативними HSB клітинами (Фігура 34). Для ізотопного ( $\gamma$ 1к) антитіла (S004), що не стосується даного винаходу, не було помічено значного зв'язування з SB або HSB клітинами.

Зв'язування CHO 2B8 з CD20-позитивними клітинами оцінювали в конкуруючому аналізі, використовуючи хемілюмінесцентну систему виявлення ORIGIN. Ліофілізовані та відновлені антиген-позитивні SB клітини витримували із збільшенням кількості bf антитіла за присутності індикатора (мітки, трасера) міченого рутенієм CHO 2B8. Результати показали, що CHO 2B8 інгібує зв'язування із CD20-позитивними клітинами в такій же мірі, що й антитіло, що походить з біореактора на пустотілих волокнах (2B8-49) (Фігура 35). Величини EC50 визначали у графічний спосіб, а метод Мюлера (Muller) (1980) середніх значень спорідненості. Визначено, що спорідненість для CHO 2B8 становить  $1,3 \times 10^{-10}$  M; похідне з біореактора на пустотілих волокнах антитіло 2B8 виявило значення спорідненості  $2,5 \times 10^{-10}$  M. Неспецифічне зв'язування було незначним, на що вказувала відсутність конкуренції з ізотопним антитілом (S004), що не стосується даного винаходу.

##### Б. Характеристика похідного від CHO 2B8-MX-ДТПК

Кон'югат 2B8 (2B8-MX-ДТПК) готували, використовуючи протокол, подібний до такого, що використовували для раніш охарактеризованого 2B8-49. Реакції проводили, використовуючи приблизно 3мг антитіла та молярне співвідношення комплексу та антитіла 4:1. Оцінювали час інкубації 2, 4, 8, 17, та 24 год., щоб визначити час реакції, який дає придатне утримання зв'язку з CD20-позитивними клітинами та високий рівень радіоінкорпорування  $^{111}\text{In}$ . Криві конкурентного зв'язування, що порівнюють CHO 2B8 з кон'югатом CHO 2B8-MX-ДТПК, що реагував протягом 8-24 годин, були подібними, вказуючи на те, що процес кон'югації не змінює суттєво зв'язування антитіла до антигену CD20 (Фігура 36). Використовуючи значення EC 50, визначені графічно (Фігура 36), стали спорідненості для некон'югованих та кон'югованих антитіл, змінювали в діапазоні від  $2,3 \times 10^{-10}$  M до  $5,9 \times 10^{-10}$  M (Таблиця 40). Радіоінкорпорування складало >95% для часу кон'югації від 8 до 24 год. (Таблиця 30).

Таблиця 40

Вплив тривалості реакції кон'югації на радіоінкорпорування та імунореактивність CHO 2B8-MX-ДТПК

Час інкубації (год)	Радіоінкорпорування (%)	Спорідненість (M)
0	ND	$2,3 \times 10^{-10}$
2	83,5	ND
4	90,5	ND
8	96,1	$5,9 \times 10^{-10}$
17	97,3	$5,9 \times 10^{-10}$
24	98,8	$4,4 \times 10^{-10}$

##### В. Характеристика In2B8 і Y2B8, виготовлених з похідного від CHO 2B8-MX-ДТПК

Позначені індієм-[111] CHO 2B8-MX-LNGR (In2B8) готували, використовуючи лабораторний протокол комплекту мічення радіоактивним ізотопом, раніше описаний для антитіла, похідного з біореактора на пустотілих волокнах (Приклад 1). Коротко, кон'юговане антитіло (похідне від CHO 2B8-MX-ДТПК; партія №0165A) витримували з ацетатом  $^{111}\text{In}$  при зазначеному pH протягом 30 хвилин при оточуючій температурі. Реакційну суміш змішували (обробляли) з PBS, pH 7,2, який містив 7,5% (м/об) людського сироваткового альбуміну і 1мМ ДТПК. Радіоінкорпорування зразків In2B8 аналізували, використовуючи миттєву тонкошарову хроматографію. Зв'язок 2B8 з CD20-позитивними клітинами визначали, використовуючи ліофілізовані й відновлені SB клітини. Для порівняння кон'югат, приготовлений з антитіла (2B8-49), отриманого з гібридами (гібридних клітин селезінки), витримували з ацетатом  $^{111}\text{In}$  протягом 30 хвилин при pH 4,2 (умови, раніше встановлені для цього антитіла).

Кінетичні дослідження виконували з метою визначити умови мічення, які забезпечують максимальне утримання зв'язку з CD20-позитивними клітинами та високе радіоінкорпорування (Таблиці 41 та 42). Кон'юговане антитіло (похідне від CHO 2B8-MX-ДТПК) витримували при оточуючій температурі з ацетатом  $^{111}\text{In}$  при pH 4,2 протягом зазначеного часу (Таблиця 42).

Таблиця 41

Кінетика мічення радіоактивним ізотопом  
In2B8: вплив pH на радіоінкорпорування і зв'язування з CD20-Positive клітин

pH реакції	Радіоінкорпорування (%)	Зв'язування (%)
3,0	97,2	85,3
3,7	98,5	83,9
4,0	98,6	84,1

4,3	98,0	84,0
4,6	98,9	83,4
Контроль (2B8-49)	99,3	86,5

Таблиця 42

Кінетика мічення радіоактивним ізотопом  
In2B8: вплив тривалості інкубації на радіоінкорпорування і зв'язування з CD20-Positive клітин

Час інкубації (хвил)	Радіоінкорпорування (%)	Зв'язування (%)
РН 2,9	15	97,2
	30	99,1
	45	97,2
РН 4,6	15	99,0
	30	97,2
	45	99,4
Контроль (2B8-49)	99,4	87,8

Результати показали, що для діапазону рН від 3,0 до 4,6 та часу витримки 30 хвилин, досягали радіоінкорпорування ізотопів на рівні >97% в той же час підтримуючи зв'язування приблизно на рівні 84%. Значення радіоінкорпорування та зв'язування були незмінними для часу інкубації від 15 до 45 хвилин для реакцій при рН від 2,9 до 4,6 (Таблиця 42). Результати можна було порівняти з результатами, отриманими при використанні антитіла 2B8-49 (Таблиці 41 та 42).

Антитіло, мічене ітрієм-[90] готували, витримуючи кон'юговане антитіло (похідне від CHO 2B8-МХ-ДТПК) з ацетатом <sup>90</sup>Y при зазначеному рН протягом 5 хвилин при оточуючій температурі. Реакційну суміш обробляли в PBS, рН 7,2, який містив 7,5% (м/об) людського сироваткового альбуміну і 1мМ ДТПК. Оброблені зразки Y2B8 аналізували на радіоінкорпорування, використовуючи миттєву тонкошарову хроматографію. Зв'язування Y2B8 з CD20-позитивними клітинами визначали, використовуючи ліофілізовані та відновлені SB клітини. Для порівняння кон'югат, приготовлений з антитіла (2B8-49), отриманого з гібридами (гібридних клітин селезінки), витримували з ацетатом <sup>90</sup>Y протягом 5 хвилин при рН 4,2 (умови, раніше встановлені для цього антитіла).

Подібні кінетичні дослідження виконували з метою оцінки приготування міченого <sup>90</sup>Y антитіла (Y2B8). Для реакцій мічення радіоактивним ізотопом в діапазоні рН від 3,9 до 4,7 при часі інкубації 5 хвилин, радіоінкорпорування становило >96% з >80% утриманням зв'язування з CD20-позитивними клітинами (Таблиця 43). Подібні результати було отримано для часу інкубації 3, 5 та 10 хвилин для діапазону рН від 2,9 до 4,6 (Таблиця 44). Потім кон'юговане антитіло (похідне від CHO 2B8-МХ-ДТПК) витримували при оточуючій температурі з ацетатом <sup>90</sup>Y при рН 4,2 протягом зазначеного часу (Таблиця 44). Результати можна було порівняти з результатами, отриманими при використанні антитіла 2B8-49 (Таблиці 43 та 44).

Таблиця 43

Кінетика мічення радіоактивним  
ізотопом Y2B8: вплив рН на радіоінкорпорування і зв'язування з CD20-Positive клітин

рН реакції	Радіоінкорпорування (%)	Зв'язування (%)
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
Контроль (2B8-49)	99,3	82,6

Таблиця 44

Кінетика мічення радіоактивним  
ізотопом Y2B8: вплив тривалості інкубації на радіоінкорпорування і зв'язування з CD20-позитивних клітин

Час інкубації (хвил)	Радіоінкорпорування (%)	Зв'язування (%)
РН 3,9	3	97,0
	5	98,9
	10	99,2
РН 4,7	3	97,2
	5	96,7
	10	97,6
Контроль (2B8-49)	99,2	84,2

Імунореактивність для In2B8 та Y2B8, приготовлених з CHO 2B8 визначали, використовуючи метод Lindmo та ін. Зростаючу кількість свіжозібраних CD20-позитивних SB клітин витримували з фіксованою кількістю In2B8 або Y2B8 за умов надлишку антигену. Аналіз обернених графіків залежностей даних зв'язування показав імунореактивність 80,6% та 72,2% для In2B8 і Y2B8, відповідно (Фігури 37 та 38).

Г. Норми виходу похідних від CHO In2B8 та Y2B8

Дві партії клінічної якості комплектів мічення радіоактивним ізотопом  $\text{In}^{111}\text{B8}/\text{Y}^{90}\text{B8}$  використовували для приготування шести партій кожного з  $\text{In}^{111}\text{B8}$  та  $\text{Y}^{90}\text{B8}$ .  $\text{In}^{111}\text{B8}$  та  $\text{Y}^{90}\text{B8}$  готували з використанням лабораторного варіанту протоколу комплекту, який зараз використовується в клінічних випробуваннях. Кожну партію міченого 2B8-MX-ДТПК випробували на радіоінкорпорування та зв'язування з CD20-позитивними клітинами (SB) та CD20-негативними (HSB) людськими клітинами. Ці результати підсумовані в Таблицях 45 та 46. Для шести приготовлених партій  $\text{In}^{111}\text{B8}$  значення радіоінкорпорування знаходилися в інтервалі від 98,9% до 99,3% із середнім значенням 99,1%. Значення зв'язування з CD20-позитивними клітинами знаходилися в інтервалі від 81,9% до 85,1% із середнім значенням 83,6%; значення зв'язування з CD20-негативними клітинами становило <4%. Для шести приготовлених партій  $\text{Y}^{90}\text{B8}$ , значення радіоінкорпорування знаходилися в інтервалі від 97,4% до 98,7% із середнім значенням 98,2%. Значення зв'язування з CD20-позитивними клітинами знаходилися в інтервалі від 81,4% до 82,7% із середнім значенням 81,9%; значення зв'язування з CD20-негативними клітинами становило <8%.

Таблиця 45

Результати аналізу виходу для похідного від CHO  $\text{In}^{111}\text{B8}$ ,  
приготовленого з використанням протоколу комплекту мічення радіоактивним ізотопом

Дослід #	Радіоінкорпорування (%)	Зв'язування (%)	
		SB клітини	HSB клітини
#1 (Партія #0219)	99,1	81,9	2,8
#2 (Партія #0219)	99,3	83,2	2,8
#3 (Партія #0219)	99,2	83,6	3,7
#4 (Партія #0220)	99,0	83,8	2,6
#5 (Партія #0220)	98,9	84,1	2,6
#6 (Партія #0220)	98,9	85,1	3,3
	Середнє=99,1%	Середнє=83,6%	Середнє=2,9%
	СК=0,2%	СК=1,1%	СК=0,4%

Таблиця 46

Результати аналізу виходу для похідного від CHO  $\text{Y}^{90}\text{B8}$ ,  
приготовленого з використанням протоколу комплекту мічення радіоактивним ізотопом

Дослід #	Радіоінкорпорування (%)	Зв'язування (%)	
		SB клітини	HSB клітини
#1 (Партія #0219)	98,7	82,1	7,4
#2 (Партія #0219)	98,6	82,7	0,7
#3 (Партія #0219)	98,3	82,2	7,2
#4 (Партія #0220)	97,4	81,8	1,7
#5 (Партія #0220)	97,6	81,4	2,2
#6 (Партія #0220)	98,4	81,4	1,1
	Середнє=98,2%	Середнє=81,9%	Середнє=3,4%
	СК=0,5%	СК=0,5%	СК=3,1%

## V. Дискусія та висновки

$\text{Anti-CD}^{20}$  мишаче мнноклональне антитіло (2B8), клоноване й експресоване в CHO клітинах (похідне від CHO 2B8) підтримує специфічність для CD20-позитивних людських клітин, як показано за допомогою FACS та аналізу конкурентного зв'язування. Зв'язування з людськими Т-клітинами було мінімальним. Використовуючи аналіз конкурентного зв'язування, визначили, що спорідненість антитіла для людських CD20-позитивних клітин становить  $1,3 \times 10^{-10}\text{M}$ . Використовуючи той же аналіз, антитіло 2B8, отримане з біореактора на пустотілих волокнах, дало значення спорідненості  $2,5 \times 10^{-10}\text{M}$ .

Для того, щоб сформувані кон'югат 2B8-MX-ДТПК, одночасно зберігаючи придатний рівень імунореактивності, проводили реакцію антитіла CHO 2B8 з MX-ДТПК. Оптимальну інкорпорацію комплексу визначали, вимірюючи рівень радіоінкорпорування  $^{111}\text{In}$ , та отримували після восьмигодинної витримки при оточуючій температурі. Протокол мічення радіоактивним ізотопом для кон'югату 2B8-MX-ДТПК був оптимізували для  $^{90}\text{Y}$  або  $^{111}\text{In}$  у відношенні pH та часу інкубації, щоб гарантувати максимальне радіоінкорпорування та утримання імунореактивності.

Результати по декількох препаратах  $\text{In}^{111}\text{B8}$  та  $\text{Y}^{90}\text{B8}$  показують відтворюваність протоколу мічення радіоактивним ізотопом, який використовують для приготування клінічних доз. На основі цих результатів мічення радіоактивним ізотопом отримано підтвердження, що норми виходу для радіоінкорпорування й зв'язування, з використанням ліофілізованих CD20-позитивних клітин, мають бути встановлені на рівні 95% та 70% відповідно. Разом узяті, ці результати демонструють можливість порівняти похідне від CHO 2B8 та похідне з біореактора на пустотілих волокнах 2B8-49, й вказують на придатність для використання в клінічних випробуваннях похідного від CHO 2B8-MX-ДТПК.

Нарешті, у цьому винаході представлено процедуру мічення, що має назву спосіб "mix-and-shoot", для приготування клінічних доз радіомічених антитіл, яка уникає потреби у стадії видалення за допомогою рідинної хроматографії високої розрізняювальності (PXBP), що використовується сьогодні, незв'язаних білком радіоізотопів. Спрощений протокол усуває цю трудомістку стадію очищення, підтримуючи в той же час високий рівень інкорпорації радіоізотопу (>95%) та покращує утримання імунореактивності (>70%). Спираючись на дані з утримання радіоізотопу й імунореактивності, було виявлено, що підібраний за клінічних умов радіомічений кон'югат, залишається стабільним in vitro після витримання при 4°C протягом

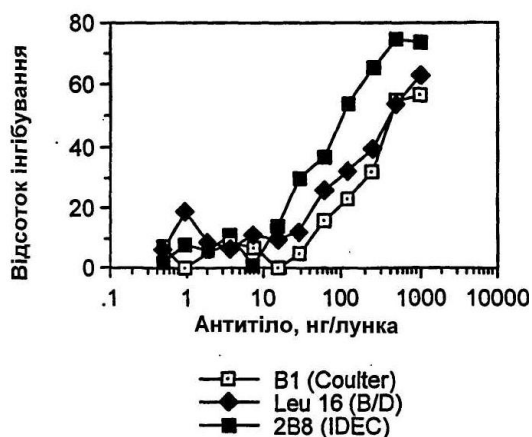
48 годин. До того ж, радіомічений кон'югат залишався стабільним, будучи витриманим в людській сироватці при 37°C протягом 72 годин. Дослідження біорозподілу на лінії мишей BALB/c не показали незвичайного тканинного відкладання та значного накопичення в кістках. Оцінки рівня радіації поглинутої дози "стандартною" людиною вагою 70кг можна було порівнювати з дозами, отриманими в поточних клінічних випробуваннях, з використанням мічених  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК. Результати цих досліджень показали, що мічений  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК, отриманий з використанням протоколу "mix-and-shoot", можна було порівняти з отриманим з використанням звичайного методу РХВР. Перевірка розширеного протоколу для приготування міченого кон'югату клінічної якості показала, що спосіб є відтворюваним та що продукт може бути порівняним з таким, що виробляють, використовуючи прийнятий сьогодні метод РХВР. Результати цих доклінічних досліджень показують, що новий "mix-&-shoot" протокол може бути використаним для приготування міченого  $^{90}\text{Y}$  2B8-MX-ДТПК, придатного для використання в клінічних випробуваннях.

#### Посилання

Кожне з нижченаведених літературних джерел відповідає наведеним в тексті посиланням.

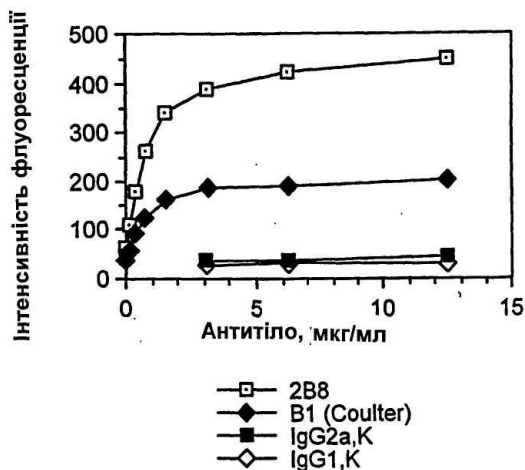
1. Adams, R.A., Flowers, A., and Davis, B.J. Direct Implantation and Transplantation of Human Acute Lymphoblastic Leukemia in Hamsters, SB-2. Cancer Research 28:1121-1125, 1968.
2. Adams, R.A. Formal Discussion: The Role of Transplantation in the Experimental Investigation of Human Leukemia and Lymphoma. Cancer Res. 27(0): 2479-2482, 1967.
3. Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedoroko, J., and Bunn, P.A., J. Immunol. Methods, 72: 77 1984.
4. Kozak, R.W., Raubitschek, A., Mirzadeh, S., Brechbiel, M.W., Junghaus, R., Gansow, O.A., and Waldmann, T.A. Cancer Res. (1989) 49:2639-2644.
5. Parker, B.A., Halpern, S.E., Miller, R.A., Hupf, H., Shawler, D.L., Collins, H.A., Amox, D., White, C.A. and Royston, I. N. Eng. J. Med., submitted.
6. Leland, J.K. and Powell, M.J. J. (1990) Electrochem. Soc. 137, 3127.
7. Muller, R. J. Immunological Methods (1980) 34, 345.
8. Mirzadeh, S., Brechbiel, M.W., Atcher, R.W. and Gansow, O.A. (1990) Bioconjugate Chemistry 1(1), 59.
9. Brechbid, M.W., Gansow, O.A., Atcher, R.W., Sciom, J., Esteban, J., Simpson, D.E. and Colcher, D. (1986) 25, 2772.

ФІГ. 1



ФІГ. 2

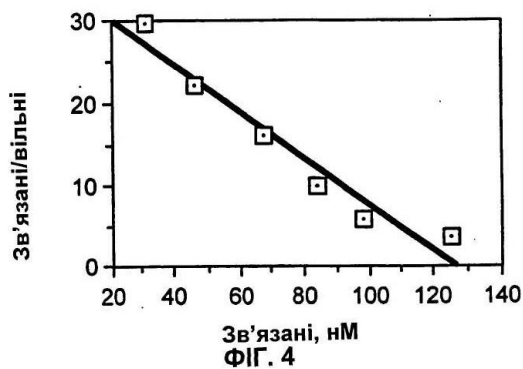
FACS аналіз зв'язування 2B8 з CD20 антигеном, присутнім на людських В-клітинах



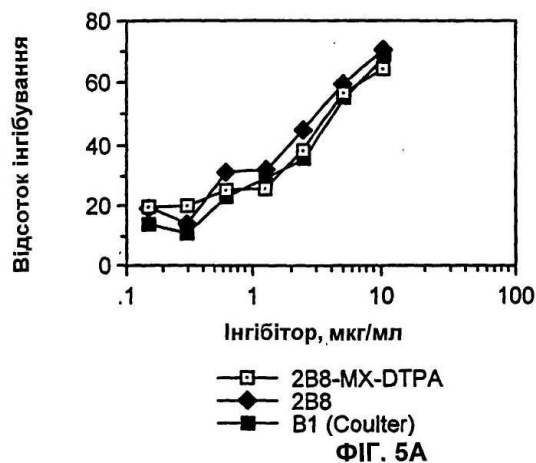


ФІГ. 3

Аналіз Скетчарда зв'язування 2В8 з В-клітинами

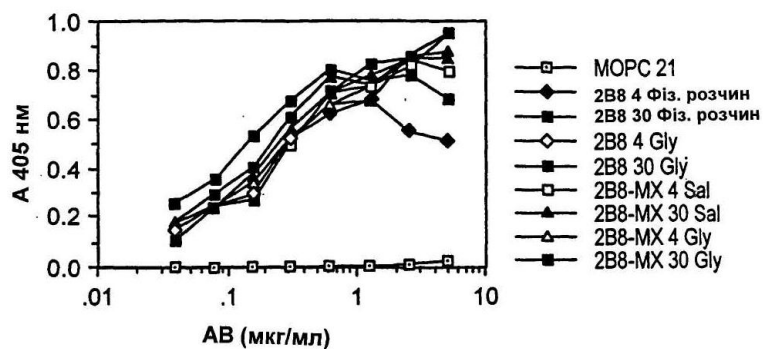


Інгібування радіоміченого В1 анти-CD20 МАт  
неміченим В1, 2В8 і МХ-ДТПК-кон'югованим 2В8



Імунореактивність 2В8 протягом інкубації при 4°C і 30°C

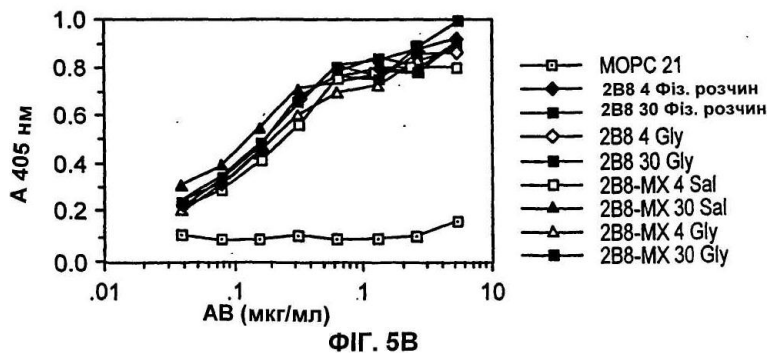
Імунореактивність 2В8, 2В8-МХ-ДТПК тиждень 1



ФІГ. 5Б

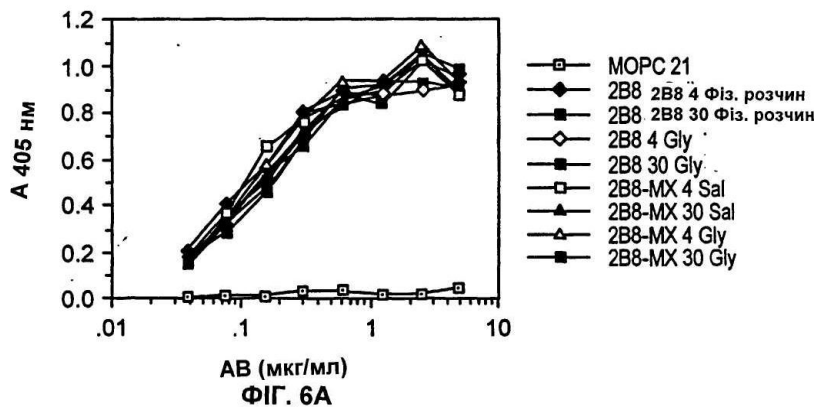
Імунореактивність 2В8 протягом інкубації при 4°C і 30°C

Імунореактивність 2В8, 2В8-МХ-ДТПК, тиждень 6

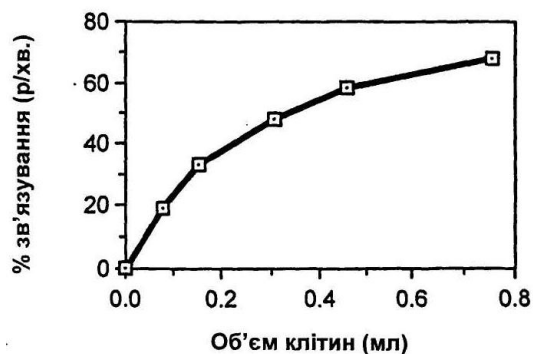


Імунореактивність 2В8 протягом інкубації при 4°C і 30°C

Імунореактивність 2В8, 2В8-МХ-ДТПК, тиждень 12

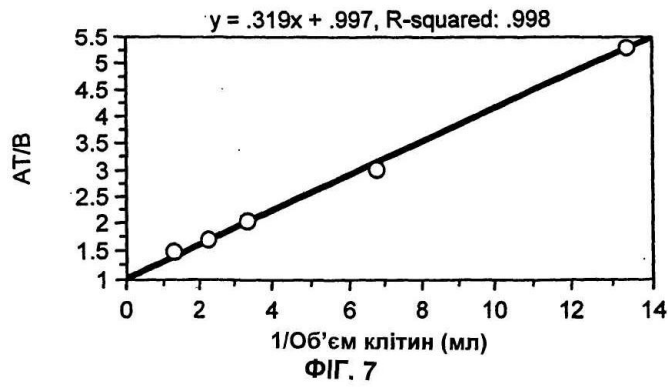


Зв'язування <sup>111</sup>In-міченого 2В8-МХ-ДТПК з CD-20 позитивними людськими клітинами

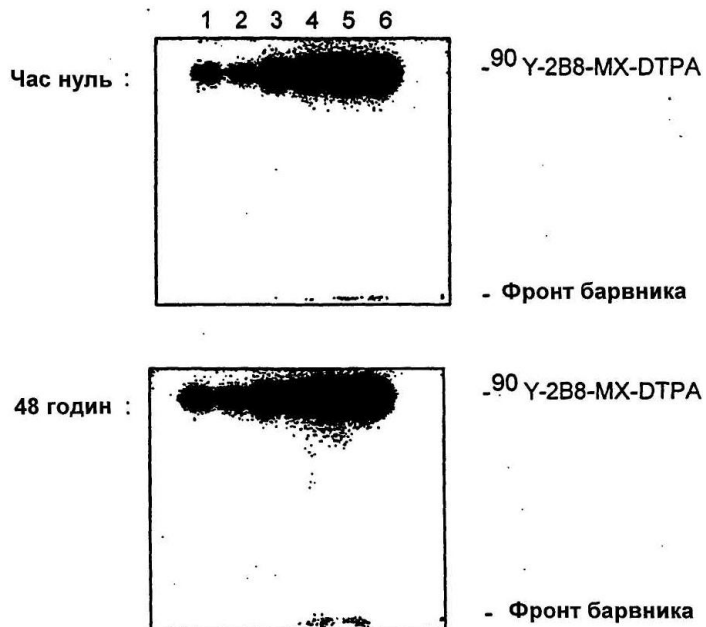


ФІГ. 6Б

Зв'язування  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК з CD-20 позитивними людськими клітинами

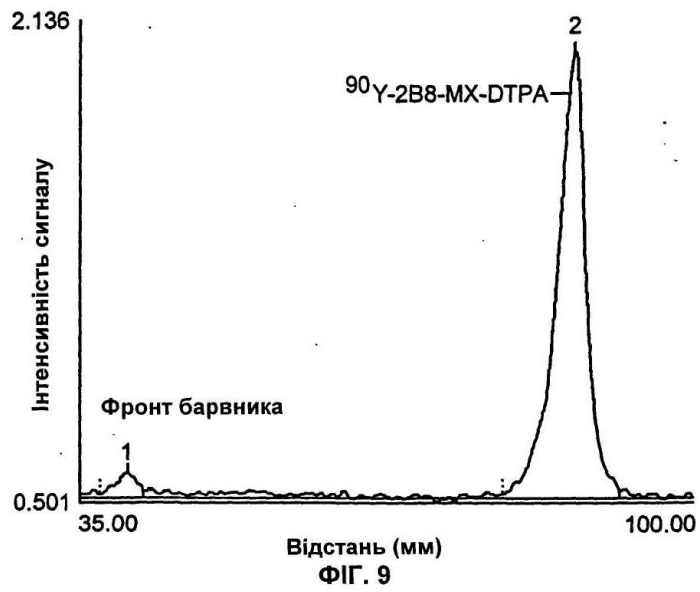


Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК в PBS, який містить людський сироватковий альбумін і ДТПК

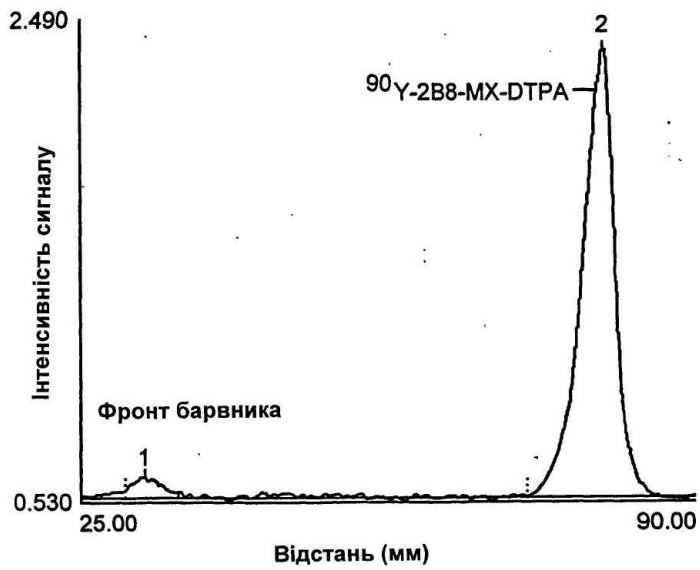


ФІГ. 8

Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК в PBS,  
який містить людський сироватковий альбумін і ДТПК

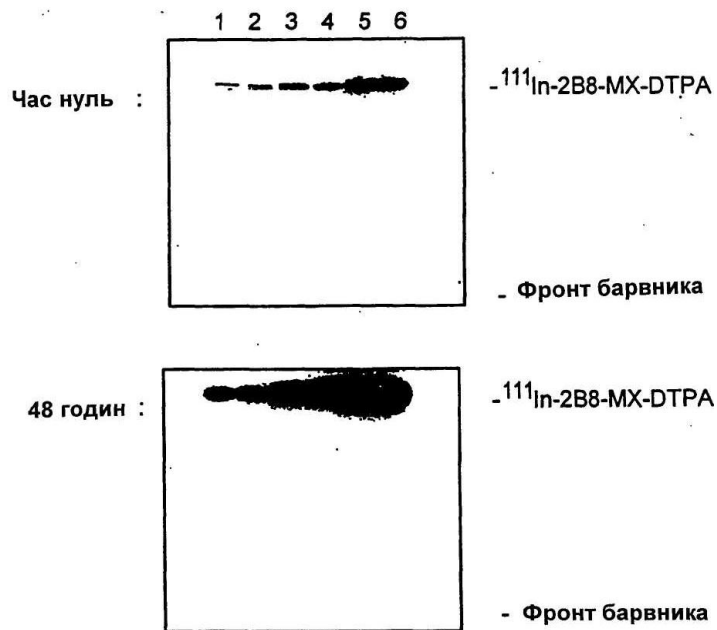


Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК в PBS,  
який містить людський сироватковий альбумін і ДТПК



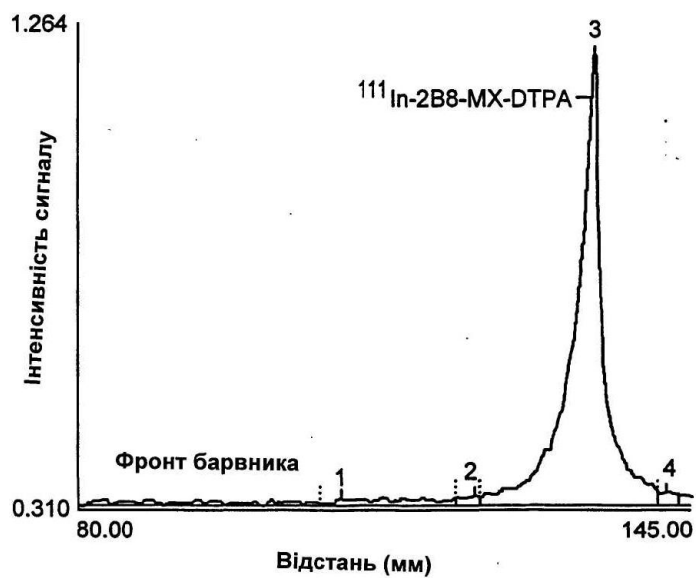
ФІГ. 10

Стабільність *In Vitro*  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК в PBS, який містить людський сироватковий альбумін



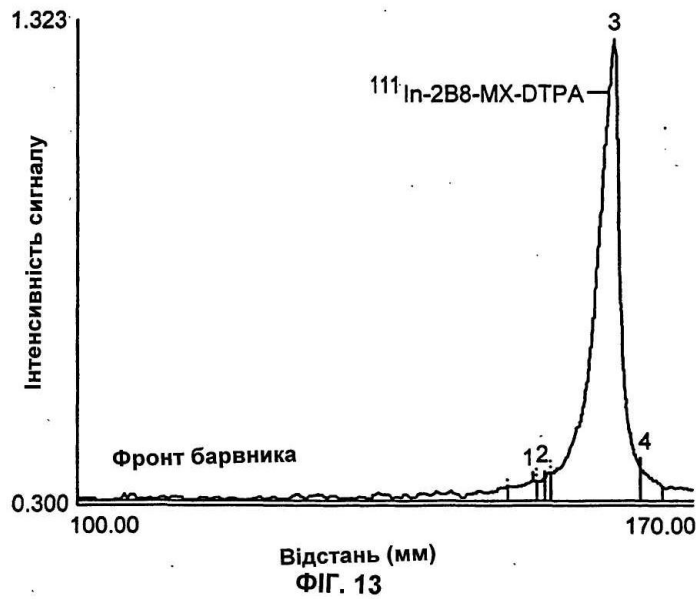
ФІГ. 11

Стабільність *In Vitro*  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК в PBS, який містить людський сироватковий альбумін

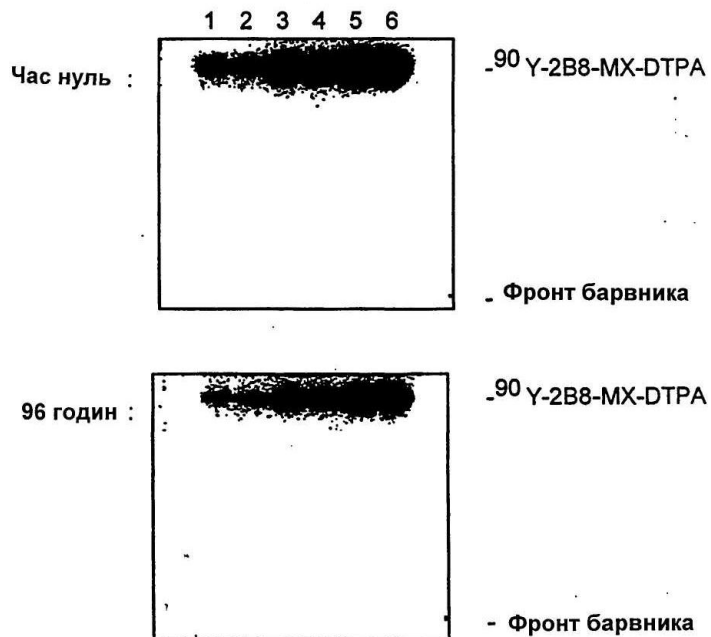


ФІГ. 12

Стабільність *In Vitro*  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК в PBS, який містить людський сироватковий альбумін

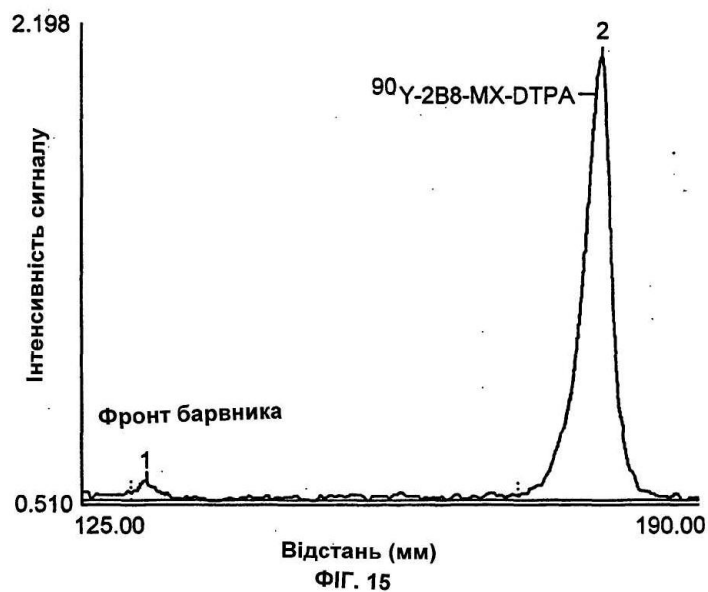


Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого в людській сироватці

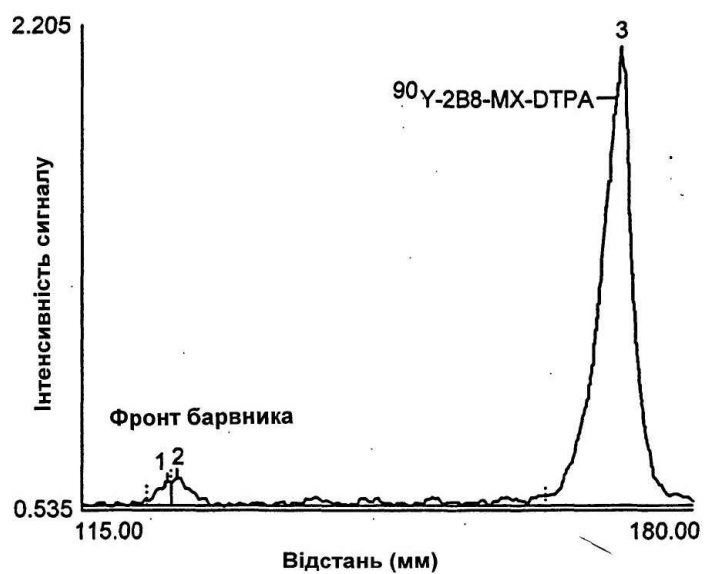


ФІГ. 14

Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК,  
інкубованого в людській сироватці

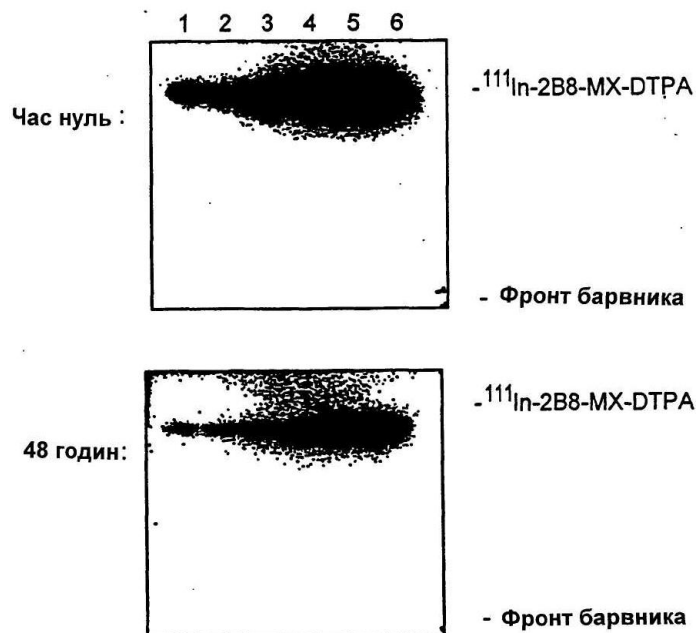


Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК,  
інкубованого в людській сироватці



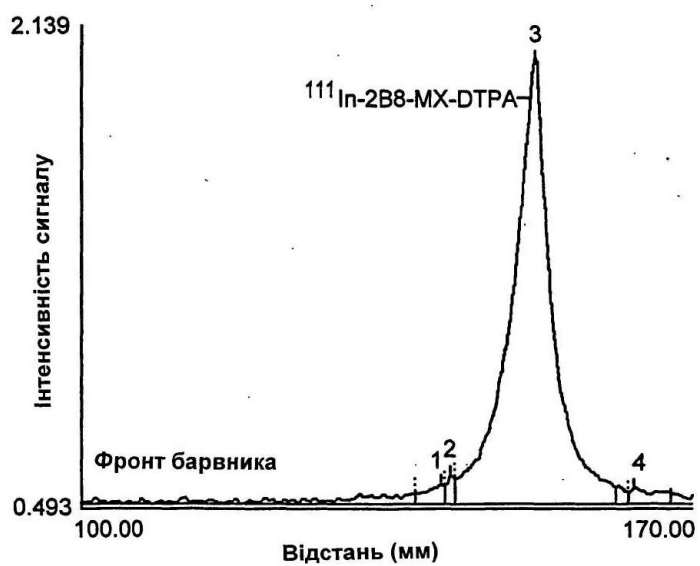
ФІГ. 16

Стабільність *In Vitro*  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК в PBS, який містить людський сироватковий альбумін



ФІГ. 17

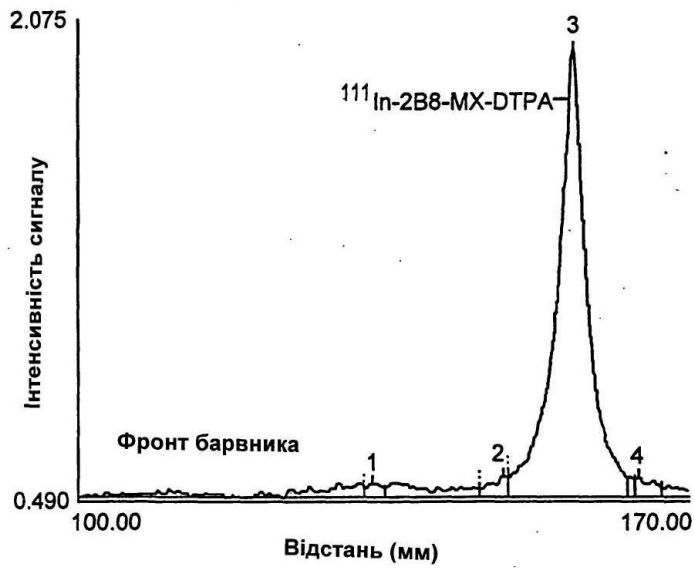
Стабільність *In Vitro*  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого в людській сироватці





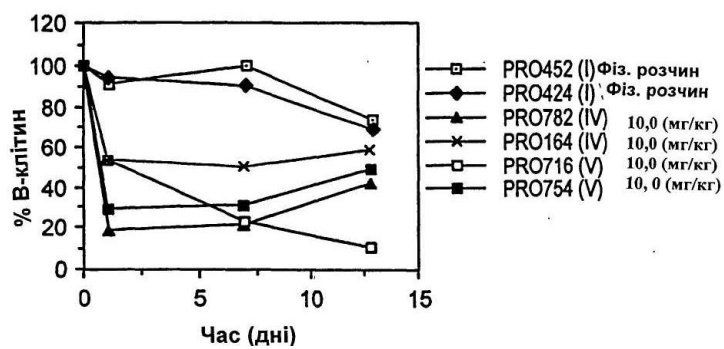
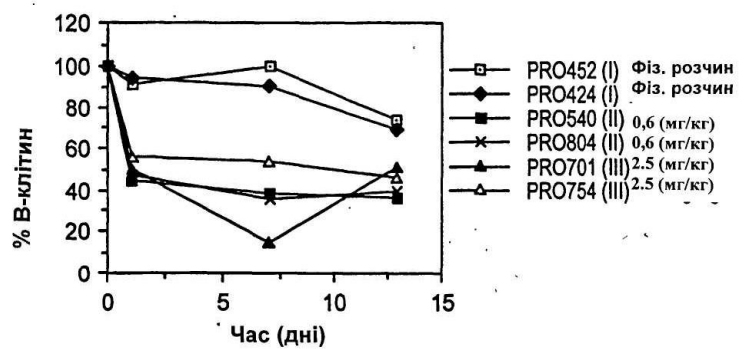
ФІГ. 18

Стабільність *In Vitro*  $^{111}\text{In}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого в людській сироватці



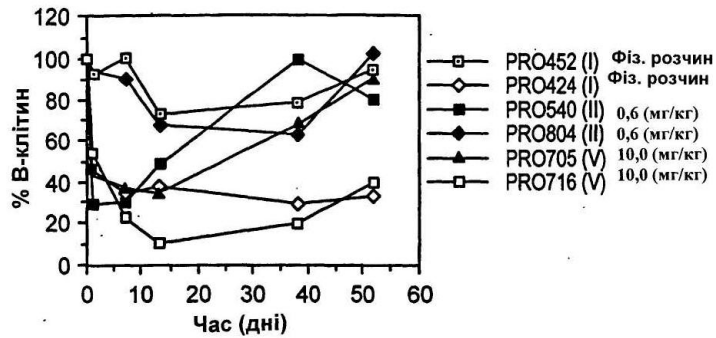
ФІГ. 19

Вплив вливання 2B8 на рівні В-лімфоцитів у яванських макак, день 0 – день 13



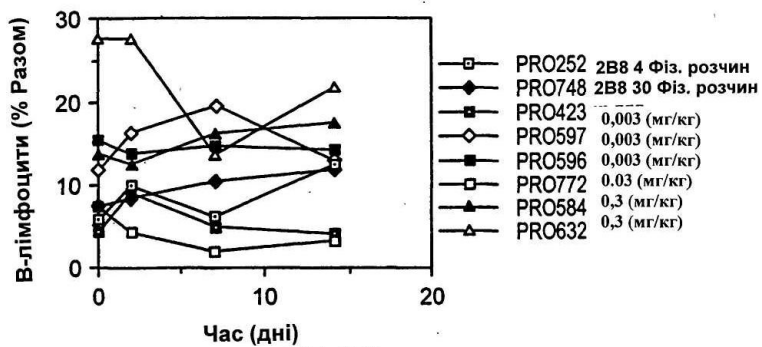
ФІГ. 20

Відновлення рівнів циркулюючих В-клітин у макак, які отримали ін'єкцію мишачого моноклонального анти-CD20 антитіла 2B8



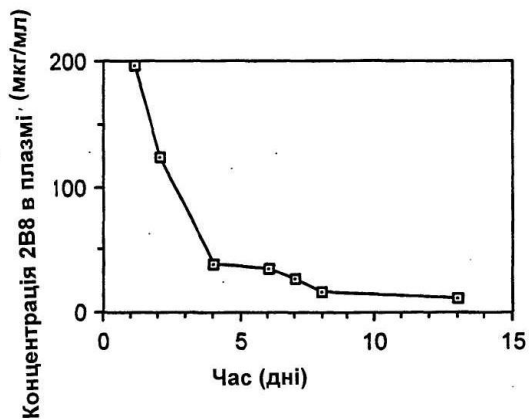
ФІГ. 21

Вплив 2B8-МХ-ДТПК на циркулюючі В-клітини у макак

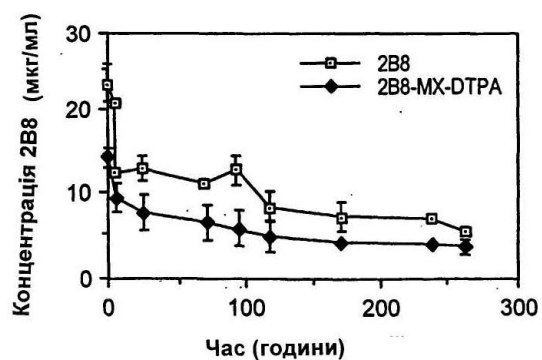


ФІГ. 22А

Кліренс 2B8 з Яванських макак після єдиної ін'єкції 10 мг/кг

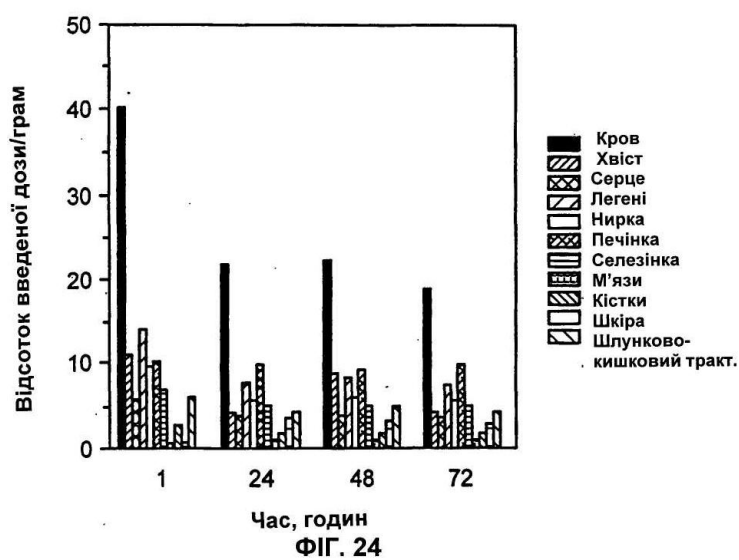


### Кліренс крові 2B8, 2B8-МХ-ДТПК з BALB/с мишей



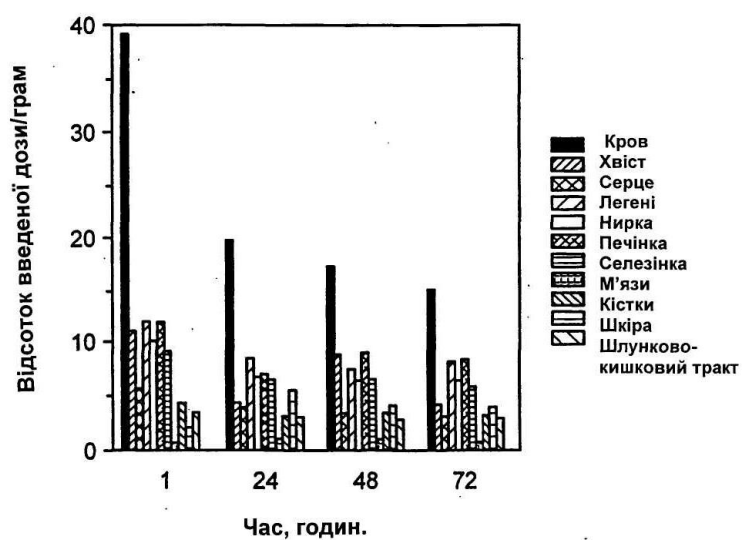
**ФІГ. 23**

### Біорозподілення [111]-In-2B8-MX-ДТПК



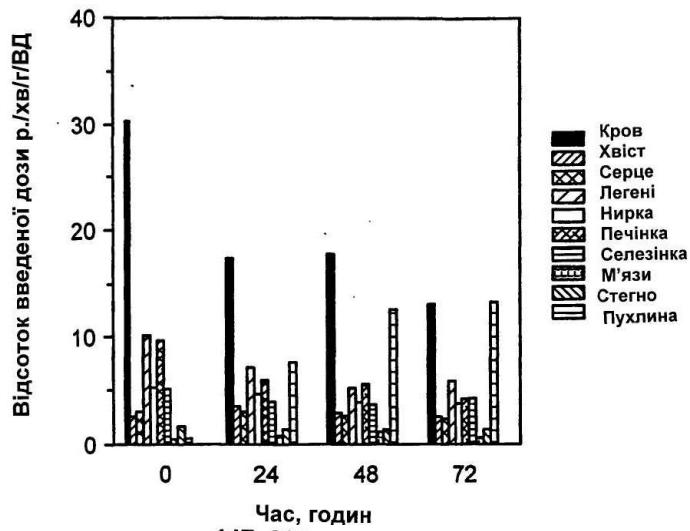
**FIG. 24**

### Біорозподілення [90]-У-2В8-МХ-ДТПК

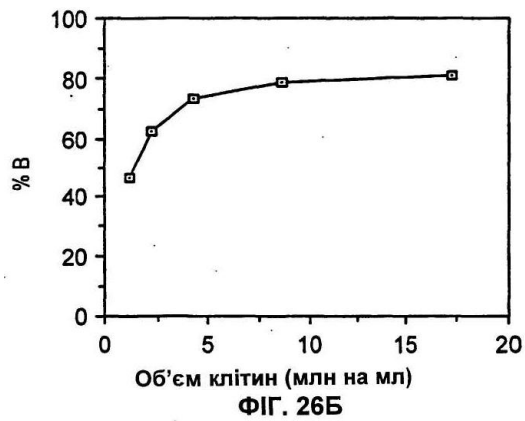


ФІГ. 25

Пухлинна локалізація [111]-In-2B8-MX-ДТПК



Зв'язування  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК з CD-20 позитивними людськими клітинами

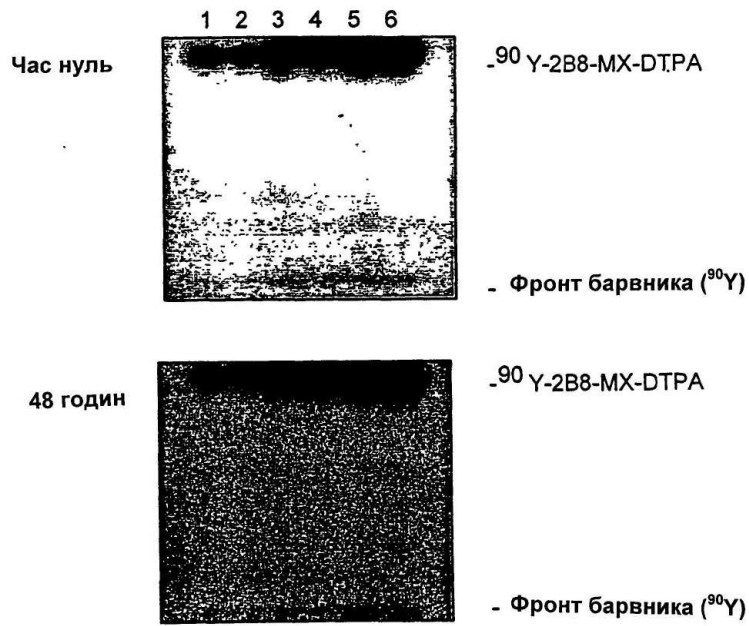


Зв'язування  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК з CD-20 позитивними людськими клітинами



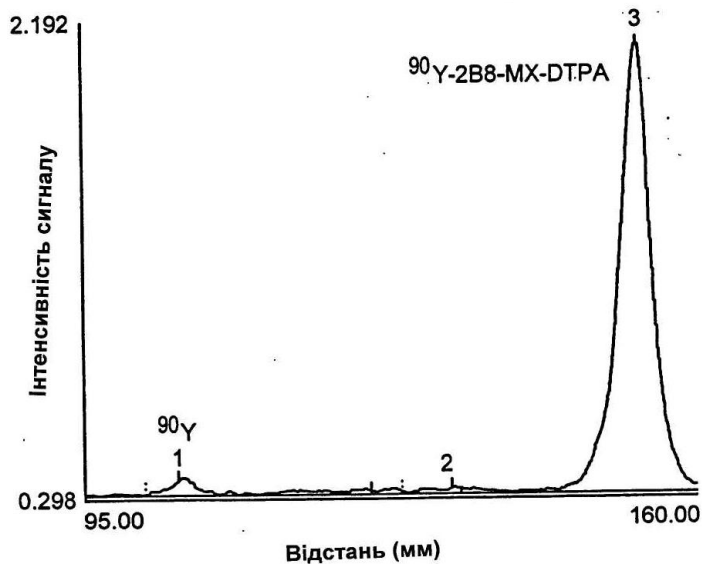
ФІГ. 27

Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК в PBS, який містить людський сироватковий альбумін і ДТП



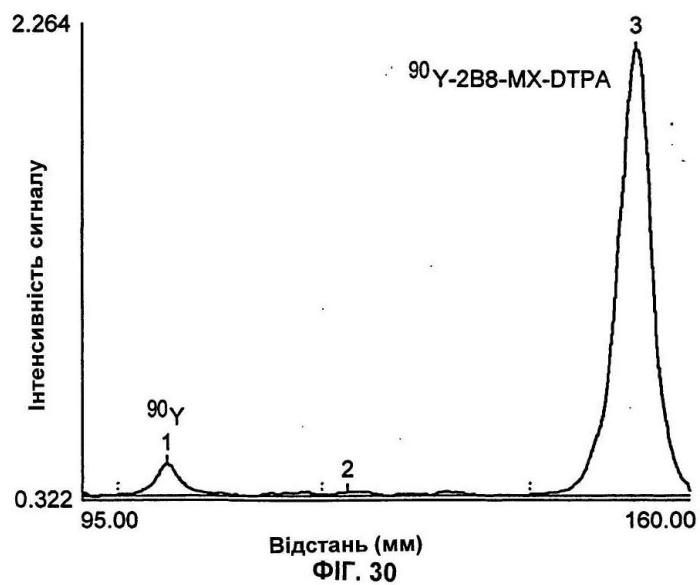
ФІГ. 28

Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК в PBS, який містить людський сироватковий альбумін і ДТП

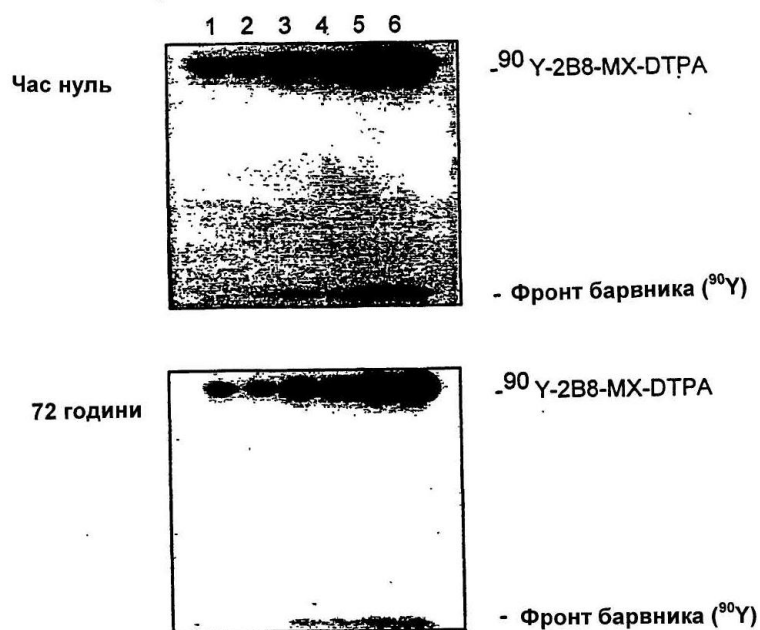


ФІГ. 29

Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК в PBS, який містить людський сироватковий альбумін і ДТПК

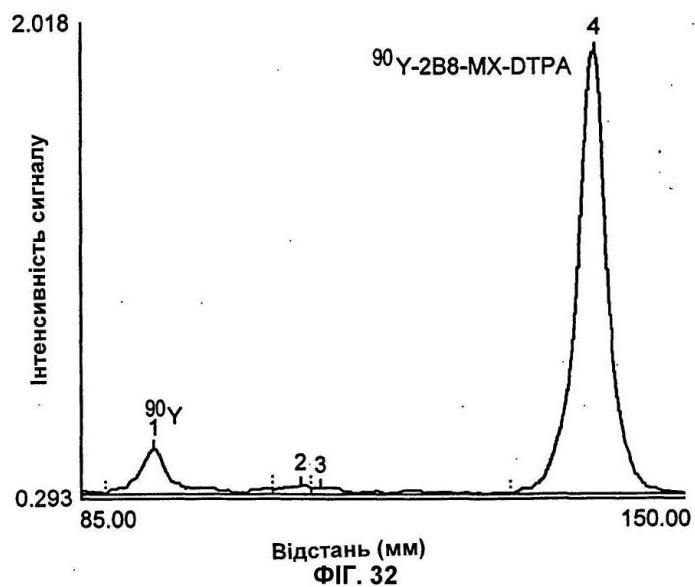


Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК, інкубованого в людській сироватці

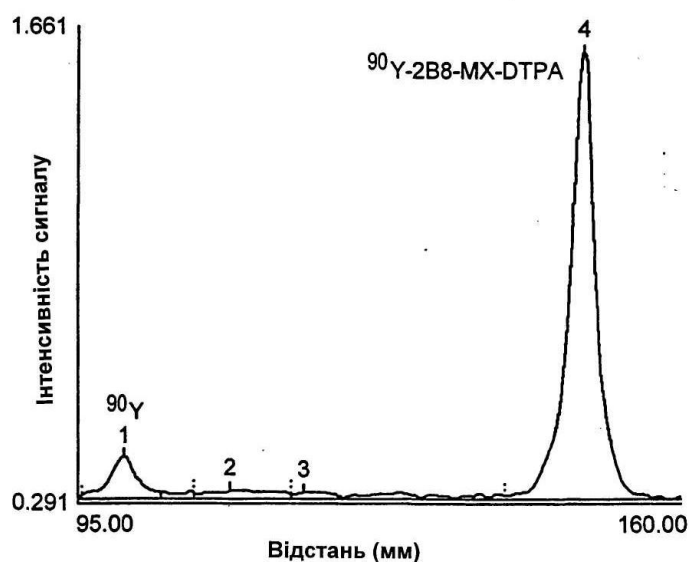


ФІГ. 31

Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК,  
інкубованого в людський сироватці

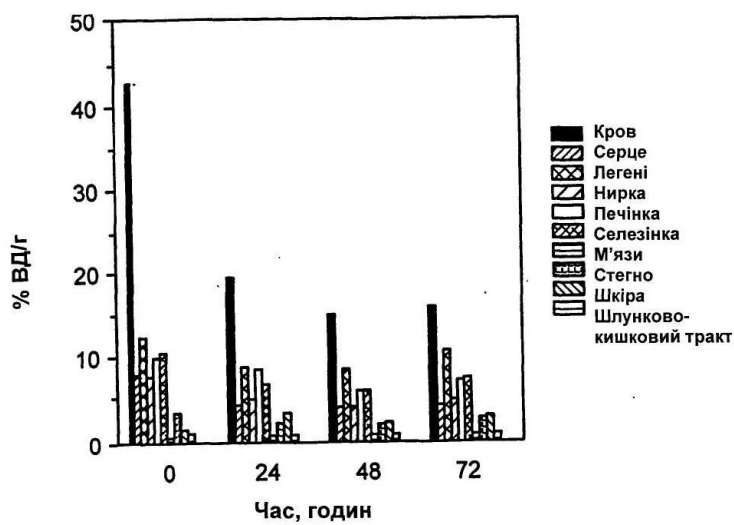


Стабільність *In Vitro*  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-MX-ДТПК,  
інкубованого в людський сироватці



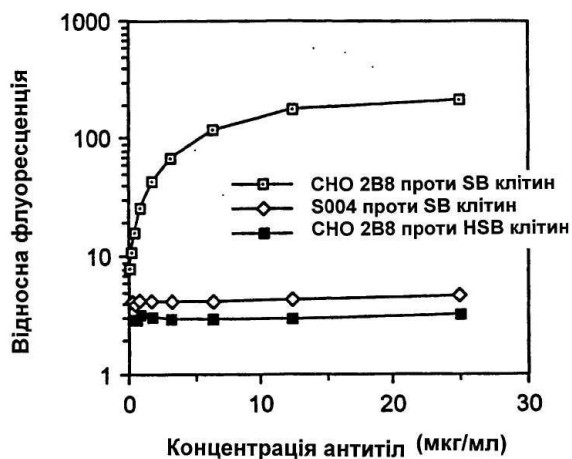
ФІГ. 33

Біорозподілення  $^{90}\text{Y}$ -міченого 2B8-МХ-ДТПК у мишей



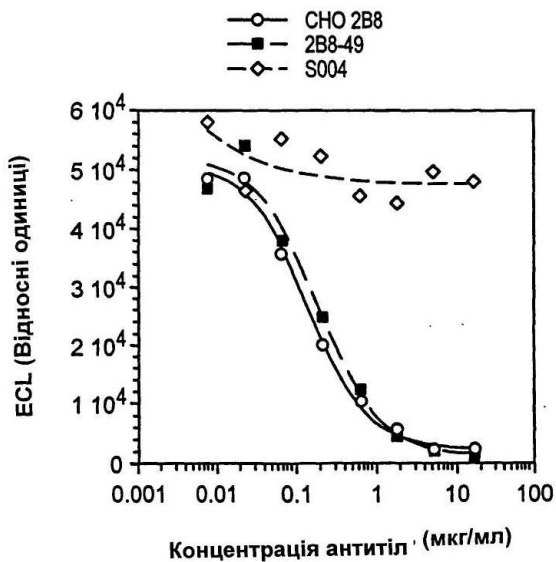
ФІГ. 34

Пряме зв'язування CHO-похідних 2B8 з CD20-позитивними і CD20-негативними людськими клітинами



ФІГ. 35

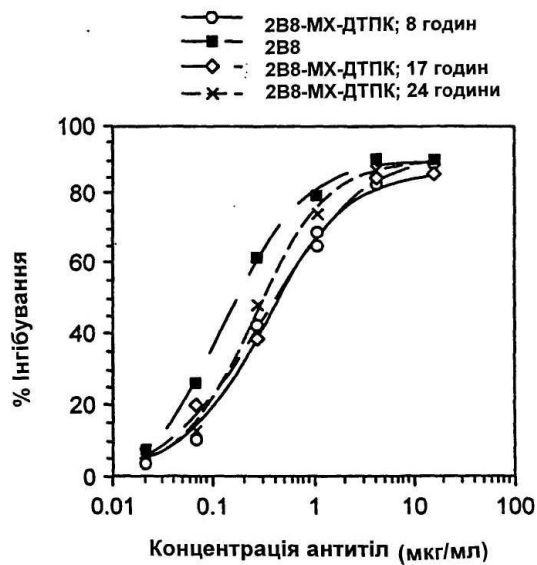
Конкурентне зв'язування CHO-похідних 2B8 з CD20-позитивними людськими клітинами





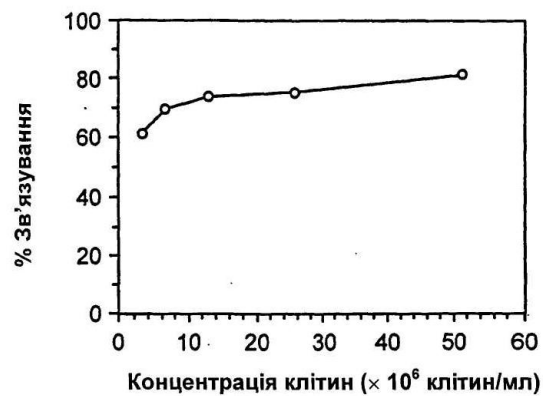
ФІГ. 36

Конкурентне зв'язування СНО-похідних 2В8 і 2В8-МХ-ДТПК з CD20-позитивними людськими клітинами



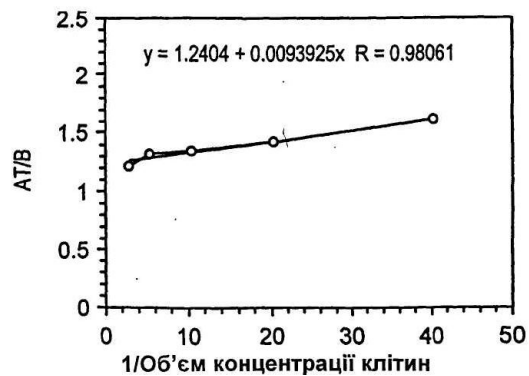
ФІГ. 37А

Зв'язування Іn2В8, яке приготували з СНО 2В8-МХ-ДТПК, з CD20-позитивними клітинами



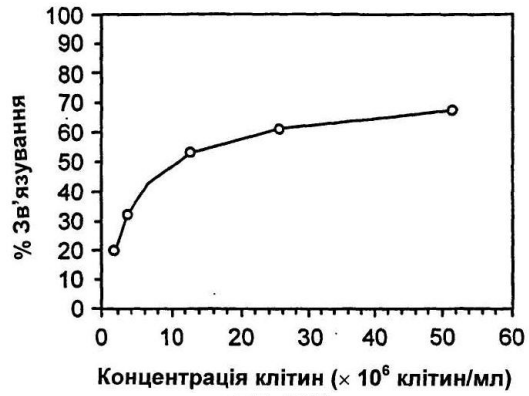
ФІГ. 37Б

Зв'язування Іn2В8, яке приготували з СНО 2В8-МХ-ДТПК, з CD20-позитивними клітинами



ФІГ. 38А

Зв'язування Іn2В8, яке приготували з СНО 2В8-МХ-ДТПК, з CD20-позитивними клітинами



ФІГ. 38Б

Зв'язування Іn2В8, яке приготували з СНО 2В8-МХ-ДТПК, з CD20-позитивними клітинами

