



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(51) Int. Cl.

G01N 33/60 (2006.01)

(45) 공고일자

2007년06월15일

(11) 등록번호

10-0729247

(24) 등록일자

2007년06월11일

(21) 출원번호	10-2001-7011093	(65) 공개번호	10-2002-0021772
(22) 출원일자	2001년08월31일	(43) 공개일자	2002년03월22일
심사청구일자	2005년02월28일		
번역문 제출일자	2001년08월31일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2000/005061	(87) 국제공개번호	WO 2000/52473
국제출원일자	2000년02월29일	국제공개일자	2000년09월08일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 리히텐슈타인, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 캐냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리비이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리제, 모잠비크,

AP ARIPO특허 : 캐냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브وار, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장

09/259,337

1999년03월01일

미국(US)

(73) 특허권자

바이오젠 아이텍 인크.

미국 02142 매사추세츠 캠브리지 센터 14

(72) 발명자

친풀

미국캘리포니아92084비스타버클리웨이815

모레나로날드

미국캘리포니아92020엘카존오렌지코트1421

레버레마이클

미국캘리포니아92107샌디에고나이아가라애비뉴4445

레오나드존이.  
미합중국캘리포니아92009칼스배드카미노알레그레3440

(74) 대리인 특허법인화우

(56) 선행기술조사문현  
WO9411026

심사관 : 김정태

전체 청구항 수 : 총 34 항

---

#### (54) 방사선표지 키트 및 결합 분석

---

#### (57) 요약

상업적 세팅에서 치료용 항체를 방사선표지하고 시험하기 위한 항체 결합 분석 및 방사선표지 키트가 개시된다. 특히, 이 키트는 치료에 사용될 방사선표지 항-CD20 접합체를 제작 및 평가하고, B 세포 림프종 종양을 이미지화하기 위해 디자인된다. 모든 키트 시약은 멸균되고, 고수준의 항체 방사선표지 및 생성물 안정성을 이루도록 디자인되어 고도로 재생가능하게 된다.

#### 특허청구의 범위

##### 청구항 1.

삭제

##### 청구항 2.

삭제

##### 청구항 3.

삭제

##### 청구항 4.

삭제

##### 청구항 5.

삭제

##### 청구항 6.

삭제

##### 청구항 7.

삭제

##### 청구항 8.

삭제

##### 청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

삭제

청구항 19.

삭제

청구항 20.

삭제

청구항 21.

삭제

청구항 22.

삭제

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

청구항 25.

삭제

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

삭제

청구항 31.

삭제

청구항 32.

삭제

청구항 33.

삭제

청구항 34.

삭제

청구항 35.

삭제

청구항 36.

삭제

청구항 37.

삭제

청구항 38.

삭제

청구항 39.

삭제

청구항 40.

삭제

청구항 41.

삭제

청구항 42.

삭제

청구항 43.

삭제

청구항 44.

삭제

청구항 45.

삭제

청구항 46.

삭제

청구항 47.

삭제

청구항 48.

삭제

청구항 49.

삭제

청구항 50.

삭제

청구항 51.

삭제

청구항 52.

삭제

청구항 53.

삭제

청구항 54.

삭제

청구항 55.

삭제

청구항 56.

삭제

청구항 57.

삭제

청구항 58.

삭제

청구항 59.

삭제

청구항 60.

삭제

청구항 61.

삭제

청구항 62.

삭제

청구항 63.

삭제

청구항 64.

삭제

청구항 65.

삭제

청구항 66.

삭제

청구항 67.

삭제

청구항 68.

삭제

청구항 69.

삭제

청구항 70.

삭제

청구항 71.

삭제

청구항 72.

삭제

청구항 73.

삭제

청구항 74.

삭제

청구항 75.

삭제

청구항 76.

삭제

청구항 77.

삭제

**청구항 78.**

삭제

**청구항 79.**

삭제

**청구항 80.**

삭제

**청구항 81.**

삭제

**청구항 82.**

삭제

**청구항 83.**

(i) 킬레이터-접합된 항체를 치료적 방사선표지를 포함하는 용액과 혼합시키는 단계;

(ii) 상기 혼합물을 95% 이상의 방사선 결합, 70% 이상의 면역반응성, 및 치료적 효능을 갖기에 충분한 특이적 활성을 갖는 방사선 표지된 항체를 생산하기 위한 적당한 온도 및 pH에서 30초 내지 10분 동안 배양하는 단계;

를 포함하는, 결합되지 않은 방사선표지로부터 방사선표지된 항체를 추가적으로 정제할 필요가 없는, 킬레이터-접합된 항체를 치료적 방사선표지로 방사선표지하는 방법.

**청구항 84.**

제83항에 있어서,

상기 치료적 방사선표지는  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  및  $^{131}\text{I}$ 로 구성된 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 85.**

제83항에 있어서,

상기 킬레이터는 MX-DTPA, 페닐-DTPA, 벤질-DTPA, CHX-DTPA 및 DOTA로 구성된 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 86.**

제85항에 있어서,

상기 방사선표지는  $^{90}\text{Y}$ 인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 87.**

제83항에 있어서,

상기 방사선표지를 포함하는 용액은 상기 퀼레이터-접합된 항체와 혼합되기 전에 pH 3 내지 6으로 조절되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 88.

제87항에 있어서,

상기 pH는 저금속 나트륨 아세테이트 용액으로 조절되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 89.

제88항에 있어서,

상기 나트륨 아세테이트는 10 내지 1000 mM의 농도인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 90.

제83항에 있어서,

상기 표지된 항체를 제제화완충액에 희석시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 91.

제90항에 있어서,

상기 제제화완충액은 생리식염수, 방사선보호제 및 비접합킬레이터를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 92.

제91항에 있어서,

상기 방사선보호제는 인간 혈청 알부민(HSA), 아스코르브산염, 아스코르브산, 폐놀, 설파이트, 글루타티온, 시스테인, 젠티스산, 니코틴산, 아스코르빌 팔미테이트, HOP(:O)H<sub>2</sub>, 글리세롤, 소디움 포름알데히드 설폭실레이트, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 및 SO<sub>2</sub>로 구성된 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 93.

제91항에 있어서,

상기 비접합된 퀼레이터는 DTPA 또는 EDTA인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 94.

제91항에 있어서,

상기 방사선보호제는 인간 혈청 알부민이고, 상기 비접합된 킬레이터는 DTPA인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 95.

83항에 있어서,

상기 (ii) 단계는 상기 혼합물을 3 내지 10분 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 96.

제83항에 있어서,

상기 (ii) 단계는 상기 혼합물을 5 내지 10분 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 97.

제86항에 있어서,

상기 킬레이터는 MX-DTPA이고, 상기 킬레이터 대 항체의 몰비는 1.5 내지 1인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 98.

제97항에 있어서,

상기 (ii) 단계는 상기 혼합물을 30초 내지 5분 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 99.

제83항에 있어서,

상기 항체는 항-CD20 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 100.

제99항에 있어서,

상기 항체는 쥐의 항-CD20 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 101.

제100항에 있어서,

상기 항-CD20 항체는 인간 CD20 항원에 특이적인 쥐의 모노클로날 항체인 2B8인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 102.

제99항에 있어서,

상기 치료적 방사선표지는  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  및  $^{131}\text{I}$ 로 구성된 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 103.

제99항에 있어서,

상기 퀄레이터는 DTPA, MX-DTPA, 폐닐-DTPA, 벤질-DTPA, CHX-DTPA 및 DOTA로 구성된 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 104.

제103항에 있어서,

상기 방사선표지는  $^{90}\text{Y}$ 인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 105.

제104항에 있어서,

상기 방사선표지 용액은 5 내지 100 mCi의  $^{90}\text{Y}$  클로라이드를 포함하고, 상기 사용된  $^{90}\text{Y}$  클로라이드의 부피량은 표지 시점에서 방사선표지 용액 내의  $^{90}\text{Y}$  클로라이드의 mCi값을 방사선활성농도(mCi/ml)로 나눈 값인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 106.

제105항에 있어서,

상기 방사선표지 용액은 45 mCi의  $^{90}\text{Y}$  클로라이드를 포함하고, 상기 사용된  $^{90}\text{Y}$  클로라이드의 부피량은 표지 시점에서 45 mCi를 방사선활성농도로 나눈 값인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 107.

제106항에 있어서,

상기 퀄레이터는 MX-DTPA이고, 상기 (ii) 단계는 0.5 내지 30 mg/ml의 농도에서 1 내지 2 ml의 MX-DTPA-접합된 항체를 방사선표지 용액과 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 108.

제104항에 있어서,

상기 퀼레이터는 MX-DTPA이고, 상기  $^{90}\text{Y}$ -표지된 항체의 특이적 활성은 10 내지 15 mCi/mg 항체의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 109.

제108항에 있어서,

상기 항-CD20 항체는 2B8인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 110.

제104항에 있어서,

상기 퀼레이터는 MX-DTPA이고, 상기  $^{90}\text{Y}$ -표지된 항체의 특이적 활성은 3.2 mCi/mg 보다 큰 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 111.

제104항에 있어서,

상기 퀼레이터는 MX-DTPA이고, 상기 (ii) 단계는 상기 혼합물을 30초 내지 10 분 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 112.

제104항에 있어서,

상기 퀼레이터는 MX-DTPA이고, 상기 (ii) 단계는 상기 혼합물을 3 내지 10 분 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 113.

제112항에 있어서,

상기 항-CD20 항체는 2B8인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 114.

제104항에 있어서,

상기 퀼레이터는 MX-DTPA이고, 상기 퀼레이터 대 항체의 몰비는 1.5 내지 1인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 115.

제114항에 있어서,

상기 (ii) 단계는 상기 혼합물을 30초 내지 5분 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 116.

제115항에 있어서,

상기 항-CD20 항체는 2B8인 것을 특징으로 하는 방법.

**명세서**

### 기술분야

본 발명은 항체 결합 분석 및 종양 및 종양 세포의 치료/이미지화를 위한 치료용 항체의 임상 효능을 시험하기 위한 방사선 표지 키트, 동결건조된 세포 제조, 시약 및 프로토콜에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 키트는 B세포 표면 항원 BP35 ("CD20")를 표적화하여 B-세포 림프종 종양을 치료 및 이미지화하기 위해 사용될 방사선표지 항체 접합체를 제조 및 평가하기 위해 사용된다.

### 배경기술

본 명세서 중의 모든 간행물 및 특히 출원은 각 개별 간행물 또는 특히 출원이 구체적 및 개별적으로 참조 문헌으로 통합되어 표시된 바와 같이 동일한 내용으로 참조문헌으로 통합되었다.

척추동물(예를 들어, 인간, 유인원, 원숭이 등을 포함하는 영장류)의 면역계는 척추동물-숙주에 침입한 이종 미생물("항원")을 정확하고 구체적으로 인식하고; 이러한 이종 미생물에 특이적으로 결합하고; 이러한 이종 미생물을 제거/파괴하기 위해 진화된 수많은 기관과 세포류로 이루어진다. 림프구는 다른 종류의 세포와 마찬가지로 면역계에서 중요하다. 림프구는 흥선, 비장 및 골수(성인)에서 생성되고, 인간(성인)의 순환계에 존재하는 전체 백혈구의 약 30%에 해당한다.

림프구에는 두 하위-집단이 있다: T 세포 및 B 세포. T 세포는 세포 매개 면역을 책임지고, B 세포는 항체 생성(체액 면역)을 책임진다. 그러나, T 세포 및 B 세포는 전형적인 면역 반응에서 상호 의존적인 것으로 여겨질 수 있고, T 세포는 T 세포 수용체가 항원 제시 세포의 표면 상에 주조직적합성 복합체("MHC") 당단백질에 결합하는 항원의 단편에 결합하는 경우 활성화되고, 이러한 활성화로 인해 본질적으로 B 세포가 분화하고, 항원에 대한 항체("면역글로불린")를 생산하도록 자극하는 생물학적 매개체("인터류킨")가 방출된다.

숙주 내의 각각의 B 세포는 이의 표면에서 다른 항체를 발현하므로, 하나의 B 세포는 하나의 항체에 대해 특이적인 항체를 발현하고, 다른 B 세포는 다른 항원에 대해 특이적인 항체를 발현한다. 따라서, B 세포는 매우 다양하고, 이 다양성은 면역계에서 중요하다. 인간에게 있어서, 각각의 B 세포는 대단히 많은 수의 항체 분자(즉, 약  $10^7$  내지  $10^8$ )를 생성할 수 있다. 이러한 항체 생성은 거의 일반적으로 이종 항원이 중화될 때 중지(또는 실질적으로 감소)된다. 그러나, 때로는 특정 B 세포의 증식이 계속 감소되지 않으며; 이러한 증식으로 인해 "B 세포 림프종"이라는 암이 발생할 수 있다.

T 세포 및 B 세포는 모두 분화 및 식별용 "마커"로 사용될 수 있는 세포 표면 단백질을 포함한다. 이러한 인간 B 세포 마커 중 하나는 "CD20"이라는 인간 B 림프구-제한된 분화 항원 Bp35이다. CD20은 전-B 세포 발달 초기에 발현되고, 플라스마 세포 분화시까지 남는다. 구체적으로, CD20 분자는 세포 순환 개시 및 분화에 필요한 활성화 과정 중의 한 단계를 조절 할 수 있고, 일반적으로 신생물("종양") B 세포 상에서 매우 고수준으로 발현된다. CD20은 정의에 의하면 "악성" B 세포, 즉, 줄지 않는 증식으로 B 세포 림프종을 초래할 수 있는 B 세포 뿐만 아니라 "정상" B 세포에도 모두 존재한다. 따라서, CD20 표면 항원은 B 세포 림프종의 "표적화"를 위한 후보자로 사용될 가능성성이 있다.

본질적으로, 이러한 표적화는 다음과 같이 이루어질 수 있다: B 세포의 CD20 표면 항원에 특이적인 항체가 예를 들면 환자에 주입된다. 이들 항-CD20 항체는 (표면상) 정상 및 악성 B 세포 모두의 CD20 세포 표면 항원에 특이적으로 결합하고; CD20 표면 항원에 결합한 항-CD20 항체로 인해 신생물 B 세포가 파괴 및 고갈될 수 있다. 또한, 종양을 파괴할 수 있

는 화학제 또는 방사능 표지는 시약이 예를 들면, 신생물 B 세포에 특히 "전달"되도록 항-CD20 항체와 접합할 수 있다. 방법에 관계 없이, 첫째 목적은 종양을 파괴하는 것이다: 특정 방법은 사용되는 특정 항-CD20 항체에 의해 결정될 수 있으므로, CD20 항원을 표적화하는 방법은 상당히 다양할 수 있다.

예를 들어, CD20 표면 항원의 이러한 표적화 시도가 보고되어 왔다. 보고에 따르면, 쥐(마우스)의 모노클로날 항체 1F5 (항-CD20 항체)를 B 세포 림프종 환자에게 연속으로 정맥내 주사로 투여하였다. 보고에 따르면, 순환 종양 세포를 고갈시키기 위해서는 매우 고수준(>2그램)의 1F5가 필요하고, 그 결과는 "일시적"인 것으로 나타났다[Press et al., "Monoclonal Antibody 1F5(Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas," Blood 69/2:584-591(1987)].

이 방법에 잠재된 문제점은 비-인간 모노클로날 항체(예를 들어, 쥐의 모노클로날 항체)는 일반적으로 인간 효과기 기능이 부족하여, 즉, 이들은 특히 항체 의존 세포 독성 또는 Fc-수용체 매개 세포 활동을 통해 보체 의존 용해를 매개하거나 인간 표적 세포를 용해시킬 수 없다는 것이다. 또한, 비-인간 모노클로날 항체는 인간 숙주에 의해 이종 단백질로 인식될 수 있고; 따라서, 이러한 이종 항체를 반복 주입하면 면역 반응을 유도하여 해로운 과민성 반응을 초래할 수 있다. 쥐-계 모노클로날 항체에 대해, 이것은 종종 인간 항-마우스 항체 반응 또는 "HAMA" 반응이라 부른다. 또한, 이들 "이종" 항체는 숙주의 면역계에 의해 공격을 받아, 이들이 표적 부위에 도달하기 전에 사실상 중화될 수 있다.

림프구 및 림프종 세포는 본질적으로 방사선치료에 민감하다. 따라서, B 세포 악성종양은 몇가지 이유로 방사선면역치료 (RIT)에 매력적인 표적이다: 방사선표지 항체의 이온화 방사선의 국부적 방출은 항원에 결합된 항체에 아주 근접하여 표적 항원(예를 들어, CD20)을 가지거나 또는 가지지 않은 세포를 죽일 수 있고; 투과 방사선, 즉, 베타 방출은 거대한 또는 다중 혈관화된 종양에서 항체에 대해 접근이 제한되는 문제를 예방할 수 있고; 필요한 항체의 총량을 줄일 수 있다. 방사성 핵종은 세포 치료 메커니즘이 세포를 계속 살아있게 할 수 없는 상태로 세포 DNA를 손상시킬 수 있는 방사성 입자를 방출 하므로; 따라서, 표적 세포가 종양인 경우, 방사능 표지는 유리하게 종양 세포를 죽인다. 방사선표지 항체는, 정의에 의하면, 건강 관리자(즉, 방사능으로 작업시 활동하는데 고도의 주의가 필요) 뿐만 아니라 환자(즉, 골수 이식이 가능) 모두에게 주의가 필요한 방사능 물질의 사용을 포함한다.

따라서, B-세포 질환의 치료에 영향을 주는 쥐의 모노클로날 항체의 능력을 개선하기 위한 방법은 방사능 표지를 항체에 접합시켜, 표지 또는 독소를 종양 부위에 위치시키는 것이다. 독소(즉, 독소루비신 또는 마이토마이신 C와 같은 화학치료제)는 또한 항체에 접합된다. 예를 들면, PCT 공개 출원 WO 92/07466 (1992년 5월 14일 공개)을 참조한다.

"키메라" 항체, 즉, 둘 이상의 다른 종(예를 들면, 마우스와 인간)으로부터의 부분을 포함하는 항체는 "접합된" 항체의 대안으로서 개발되었다. 마우스/인간 키메라 항체가 만들어졌고, 부모 마우스 항체의 결합 특성 및 인간 불변 영역과 관련된 효과기 기능을 나타내었다. 예를 들면, 모두 본 명세서에 참조문헌으로 통합된 캐빌리(Cabilly) 등의 미국 특허 제 4,816,567호; 슈메이커(Shoemaker)등의 미국 특허 제 4,978,745호; 비버스(Beavers)등의 미국 특허 제 4,975,369호; 및 보스(Boss) 등의 미국 특허 제 4,816,397호를 참고한다. 일반적으로 이러한 키메라 항체는 미리-존재하는 쥐의 하이브리도마로부터 추출한 DNA에서 게놈 유전자 라이브러리를 준비하여 구성한다[Nishimura et al.(1987) Cancer Reserch 47:999]. 그리고 나서, 이 라이브러리를 정확한 항체 단편 재배열 패턴을 나타내는 중쇄 및 경쇄로부터 가변 영역 유전자에 대해 스크리닝한다. 그리고 나서, 클로닝된 가변 영역 유전자들을 적당한 중쇄 또는 경쇄 인간의 불변 영역 유전자의 클로닝된 카세트를 함유하는 발현 벡터 속에 결찰한다. 그 후, 이 키메라 유전자는 선택한 세포주, 일반적으로는 쥐의 골수종 세포주에서 발현된다.

예를 들어, 문헌[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)]에는 CD20 항원에 대해 직접적인 마우스/인간 키메라 항체가 기재되어 있다. 또한, PCT 공개 번호 WO 88/04936을 참조한다. 그러나, 참조문헌에서 B 세포 질환을 치료하기 위한 리우(Liu)의 키메라 항체를 사용한 능력, 효능 또는 실용성에 대한 정보는 제공되지 않는다.

시험관내 기능 분석(예를 들어, 보체 의존성 용해("CDC")); 항체 의존성 세포 세포독성("ADCC")등)은 특정 항원을 발현하는 표적 세포를 파괴 또는 고갈시키기 위한 어떤 항체의 생체내 능력을 본질적으로 예측할 수 없다. 예를 들면, 문헌 [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)(검출불가능한 ADCC 활성을 가진 키메라 마우스-인간 항체)]을 참조한다. 따라서, 항체의 잠재적 치료 효능은 실제로 단지 생체내 실험에 의해서만 평가할 수 있다.

마지막으로, 전체 내용이 본 명세서에 참조문헌으로서 통합된 함께 출원중인 제08/475,813호, 제08/475,815호 및 제08/478,967호에는 치료 항체를 투여하기 전에 B 세포 림프종 종양의 진단상의 "이미지화"를 위한 방사선표지 항-CD20 접합체가 개시되어 있다. "In2B8" 접합체는 이작용기 킬레이트, 즉, 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸-DTPA 및 1-메틸-3-

이소티오시아나토벤질-DTPA의 1:1 혼합물을 포함하는 MX-DTPA(디에틸렌트리아민펜타아세트산)를 통해 인듐[111]<sup>(111)In</sup>에 부착된, 인간 CD20 항원에 특이적인 쥐의 모노클로날 항체, 2B8를 포함한다. 인듐-[111]은 감마 방사선을 방출하고, 이미지화제로서 이전에 사용되고 있기 때문에 진단 방사성 핵종으로 선택된다.

킬레이터 및 킬레이터 접합체와 관련된 특허는 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 간소우(Gansow)의 미국 특허 제 4,831,175호는 다치환 디에틸렌트리아민펜타아세트산 킬레이트 및 이를 함유하는 단백질 접합체, 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 간소우의 미국 특허 제5,099,069호, 제5,246,692호, 제5,286,850호, 및 제5,124,471호도 다치환 DTPA 킬레이터에 관한 것이다. 이 특허들은 본 명세서에 전체 내용이 통합되어 있다.

출원 제 08/475,813호, 제 08/475,815호, 및 제 08/478,976호에서 킬레이트화를 촉진하기 위해 사용된 특정 이작용기 킬레이터는 이것이 3가 금속에 대한 높은 친화력을 가지고, 종양 대 비종양 비율을 증가시키고, 뼈 용해를 감소시키고, 표적 부위, 즉, B-세포 림프종 종양 부위에서 방사성 핵종을 생체내에서 더 많이 보유하기 때문에 선택되었다. 그러나, 다른 이작용기 킬레이터들도 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 종양 치료에서 유리할 수 있다.

또한, 출원 제 08/475,813호, 제 08/475,815호 및 제 08/478,967호에 개시된 것은 B 세포 림프종 및 종양 세포의 표적화 및 파괴를 위한 방사선표지 치료 항체이다. 특히, Y2B8 접합체는 동일한 이작용기 킬레이터를 통해 이트륨-[90]<sup>(90)Y</sup>에 부착된 동일한 항-인간 CD20 쥐의 모노클로날 항체, 2B8를 포함한다. 이 방사성 핵종은 몇가지 이유로 치료용으로 선택되었다. <sup>90</sup>Y의 64시간 반감기는 종양에 의한 항체 축적을 하기에 충분히 길고, 예를 들어, <sup>131</sup>I와는 달리, 이것은 100 내지 1000 세포 직경의 범위로 봉괴시 감마 조사를 동반하지 않는 고에너지의 순수 베타 방사체이다. 투과 방사선이 매우 적으므로 <sup>90</sup>Y-표지된 항체는 외래 환자에게 투여할 수 있다. 또한, 표지된 항체의 내재화가 세포 사멸에 필요하지 않고, 이온화 방사선의 국부적 방출은 표적 항원이 부족한 근접 종양 세포에 대해 치명적이어야 한다.

<sup>90</sup>Y 방사성 핵종은 동일한 이작용기 킬레이터 분자 MX-DTPA를 사용하여 2B8 항체에 부착하므로, Y2B8 접합체는 예를 들어, 표적 부위(종양)에서 방사성 핵종의 보유력 증가와 같은 상기 논의된 동일한 이점을 가진다. 그러나, <sup>111</sup>In과는 달리, 이것은 관련된 감마 방사선의 부족으로 인해 이미지화 목적으로는 사용될 수 없다. 따라서, <sup>111</sup>In과 같은 진단상의 "이미지화" 방사성 핵종은 종양을 감소시킬 목적으로 치료용 키메라 또는 <sup>90</sup>Y-표지된 항체를 투여하기 전 및/또는 후에 종양의 위치 및 상대적 크기를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 인듐-표지된 항체로는 방사선량 평가를 할 수 있다.

의도된 항체의 용도, 즉, 진단시약 또는 치료시약으로서의 용도에 따라, 기타 방사선표지가 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 유사한 목적으로 사용되어 왔다. 예를 들어, 임상 진단에 사용되어 온 방사성 핵종으로는 <sup>111</sup>In 이외에도 <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>99</sup>Tc, <sup>67</sup>Ga가 포함된다. 항체는 또한 표적화된 면역치료에서 사용될 수 있도록 다양한 방사성 핵종으로 표지된다 (Peirersz et al.(1987) The use of monoclonal antibody conjugates for the diagnosis and treatment of cancer.

Immunol. Cell Biol. 65:111-125). 이러한 방사성 핵종은 <sup>90</sup>Y 뿐만 아니라 <sup>188</sup>Re 및 <sup>186</sup>Re 및 이보다 적은 정도로 <sup>199</sup>Au 및 <sup>67</sup>Cu를 포함한다. I-[131]은 또한 치료 목적을 위해 사용되어 왔다. 미국 특허 제5,460,785호는 이러한 방사성 핵종 목록을 제공하고, 본 명세서에 참조문헌으로 통합된다.

함께 출원중인 제08/475,813호, 제08/475,815호 및 제08/478,967호에 보고된 바와 같이, 비표지된 키메라 항-CD20 항체 뿐만 아니라 방사선표지 Y2B8 접합체의 투여는 B 세포 림프종 종양을 가진 마우스에서 종양을 상당히 감소시켰다. 또한, 보고된 인간 임상 실험은 림프종 환자에게 키메라 항-CD20 항체를 주입하여 상당한 B 세포 고갈을 나타내었다. 사실, 키메라 2B8은 최근 Rituxan<sup>®</sup> 이라는 이름으로 미국내 최초 FDA-승인 항암 모노클로날 항체로 알려졌다. 따라서, 하나 이상의 키메라 항-CD20 항체는 B 세포 림프종의 치료에서의 치료 효능을 나타내는 것으로 나타났다.

또한, 본 명세서에 참조문헌으로 통합된 미국 출원 번호 제 08/475,813호는 인듐-표지된 또는 이트륨-표지된 쥐의 모노클로날 항체 중 하나 또는 둘과 함께 키메라 항-CD20인 Rituxan<sup>®</sup>의 연속 투여를 개시하고 있다. 이러한 조합 치료에 사용되는 방사선표지 항체는 쥐 항체이지만, 키메라 항-CD20을 사용한 초기 치료는 B 세포수를 충분히 고갈시켜, HAMA 반응을 감소시키며, 이로써 조합 치료 및 진단법을 촉진한다.

따라서, 이러한 내용의 조합 면역치료에서, 쥐 항체는 특히 진단제로서 사용될 수 있다. 또한, 미국 출원 제 08/475,813호에는 Rituxan® 투여에 이은 이트륨-표지된 항-CD20 항체의 치료적으로 유효한 투여량은 (a) 키메라 항-CD20 항체에 의해 제거되지 않은 잔존하는 말초 혈액 B 세포를 제거하거나; (b) 림프절로부터 B 세포 고갈을 개시하거나; 또는 (c) 다른 조직으로부터 B 세포 고갈을 개시하는데 충분하다는 것이 나타나 있다.

따라서, 방사선표지를 암 치료 항체에 접합시키면, 이러한 항체의 잠재적인 치료 효능을 평가하는데 사용할 수 있는 유용한 임상 도구를 제공하고, 치료 과정을 검사하기 위한 진단시약을 만들 수 있고, 키메라 항체의 초기 종양-사멸 가능성성을 증진시키는데 사용될 수 있는 추가의 치료시약을 고안할 수 있다. 비-호지킨 림프종의 치료에서 항-CD20 항체의 효과가 입증되고, 방사능에 대한 힘프구의 민감도가 공지되면, 이러한 치료 항체를 상업적으로 이용가능한 키트 형태로 만들어, 방사선표지로 쉽게 변형되고, 임상 장소에서 환자에게 직접 투여할 수 있게 되어 매우 유리하다.

항체의 방사선표지를 하기 위한 방법 및 시약이 다수 존재하지만, 방사선표지가 상당히 소멸하거나 방사선표지로 인해 항체가 상당히 파괴되기 전에, 쉽게 생성되고, 환자에게 투여할 수 있는 방식으로, 이러한 시약을 임상 장소에 위치시키기 위한 편리한 수단은 이 기술분야에서 부족하다. 이 유용한 기술을 상업화하기 위한 이러한 편리한 수단이 부족한 이유는, 일부 공지된 표지 프로토콜에 의해 확인된 불충분한 결합 효율, 및 방사선표지 과정 후에 이어서 시약을 컬럼 정제할 필요가 있기 때문이다. 또한, 이러한 키트의 개발이 지연되는 이유는 부분적으로, 이어서 정제하지 않는, 효과적으로 표지된 생성물을 생성하는데 사용될 수 있는 순수 시판 방사성 동위원소에 대한 접근이 이전에는 어렵기 때문이다. 이와 달리, 이러한 키트가 일반적으로 사용가능하지 않은 이유는, 아마도 환자의 림프종을 치료하기 위한 Rituxan®의 효능 또는 승인을 얻을 수 있는 항체가 실제로 부족하다는 것이다.

예를 들어, 본 발명에 참조문헌으로 통합된 미국 특허 제 4,636,380호에 기재된 바와 같이, 과학계에서 일반적으로 방사성 약제의 임상적 유용성을 밝히기 위해서는 길고 지루한 분리 및 정제 과정을 견뎌야한다고 한다. 사실, 환자에게 비결합된 방사선표지를 주입하는 것은 바람직하지 않다. 특히 치료법을 정제하기 위한 장비도 시간도 없는 의사들에게는, 추가적인 정제 단계가 필요하다는 것은 임상 장소에서, 항체를 방사선표지하는 과정을 불가능한 일로 만든다.

또한, 방사선표지 단백질, 특히, 매우 근접하게 부착되어 더 오래 항체를 손상시키는 경향이 있는 <sup>90</sup>Y와 같은 방사선헌 동위원소로 표지된 것들은 본질적으로 불안정할 수 있다. 그 다음, 이러한 방사선헌에는 표적 항원에 대한 방사선표지 손실 및/또는 감소된 결합으로 인해 치료 효과를 신뢰할 수 없게 하고, 변성 단백질에 대해 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있다. 그러나, 임상 장소에서 항체를 표지 및 정제하기 위한 설비 없이, 임상의는 이미 표지된 치료적 항체를 주문하거나 이것들을 관련 설비에서 임상 장소 밖에서 표지하고, 표지한 후 환자에게 투여하기 위해 옮길 수 밖에 없다. 이러한 모든 조작은 표지 및 투여 사이의 기간에 귀한 시간을 추가하여, 임상 장소에서 방사선표지 키트의 유용성이 사실상 감소되며, 치료가 불안정해진다.

다른 이들은 별도의 항체 분리 단계를 생략하기에 충분히 능숙한 항체 방사선표지 키트를 개발하려고 하였으나 성공을 거두지 못하였다. 예를 들어, 사이토겐(Cytogen)은 최근 종양-관련 당단백질 TAG-72에 대한 쥐의 모노클로날 항체를 방사선표지하기 위한 키트를 시판하기 시작하였다. 그러나, 사이토겐의 항체는 특히 저장하는 동안 이후 여과 단계에서 제거되어야 하는 미립자를 발달시키는 경향이 있어 키트를 형성하지 못한다. 또한, 사이토겐의 항체는 HAMA 반응으로 인해 환자에게 부작용을 일으킨다.

다른 이들은 분리 정제 단계가 필요하지 않은 키트 포맷에 따르는 방사선표지 프로토콜을 개발했다고 주장하고 있다 (Richardson et al.(1987) Optimization and batch production of DTPA-labeled antibody kits for routine use in <sup>111</sup>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). 그러나, 이러한 프로토콜은 본 발명자들이 본 명세서에 개시한 프로토콜을 사용하여 달성한 결합수준인 95% 이상의 결합효과를 달성할 수 없다. 이러한 결합수준은 부가적으로 안정성을 증가시켜, 실질적으로 낮은 방사선헌의 결과로 환자에게 비결합 표지는 주입되지 않는다.

본 발명의 키트에 포함된 프로토콜은 신속하게 표지하여 표지에 따라 약 반시간 또는 5분 정도 내에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 본 발명의 키트 프로토콜은 95% 이상의 표지 효율을 가져 추가 정제가 필요 없다. 추가 정제가 필요 없으므로, 방사선표지의 반감기 및 항체의 완전성은 표지된 치료 목적을 위해 보존된다.

본 출원은 진단 및 치료 항체가 방사선표지될 수 있고, 재생가능하고, 믿을만하고, 편리한 방법으로 환자에게 투여될 수 있는 편리한 키트 및 방법을 개시한다. 본 발명의 키트는 항체 표지 방법을 환자 치료 프로토콜을 대단히 용이하게 하는 혼란

없고, 걱정 없는 표준화된 방법으로 변형시킨다. 본 발명의 키트는 치료제 또는 진단제를 표지 및 투여하기 위한 최적 파라미터를 결정하여, 제품의 비용을 줄이므로 종래 기술 이상의 이점을 제공한다. 본 명세서에 기재된 키트는 특정 표지에 따른 최적 파라미터를 제공하므로, 특정 표지에 대해 디자인된 키트를 사용하면 또한 특히 특정 표지에 대해 부적당한 키트를 사용하는 경우에 발생할 수 있는 분해를 최소화할 것이다. 다음으로 분해를 피하면 최적 표지 효율도 얻는다. 또한, 무균성, 발열원 시험 및 표지 후 시약 정제가 불필요하므로, 각각의 키트와 함께 포함된 무균, 무발열원 성분 및 프로토콜은 이 방법을 사용자에게 더 편리하도록 한다.

## 발명의 상세한 설명

본 발명은 적어도 (i) 킬레이터-접합된 항체를 함유하는 바이알, (ii) 방사선표지 항체를 안정화 및 투여하기 위한 제제화 완충액을 함유한 바이알, 및 (iii) 항체를 방사선표지하기 위한 지시를 포함하고, 상기 바이알 성분이 키트 지시에 따른 충분한 순도 및 활성의 방사선표지와 결합하는 경우, 환자에게 투여하기 전에 표지된 항체를 더 정제할 필요가 없는 양 및 농도로 공급되는 것을 특징으로 하는, 환자에게 투여하기 전에 진단 또는 치료 항체를 방사선표지하기 위한 키트를 포함한다. 또한, 키트 지시에 따라 충분한 순도 및 활성의 방사성 동위원소로 방사선표지되는 경우, 이러한 동위원소 결합은 95% 이상 및 98%나 그 이상의 수준에도 도달할 수 있다.

키트 내에 포함된 항체는 항-CD20 항체인 것이 가장 바람직하다. 항체는 이작용기 킬레이터에 부착된 형태로 공급된다. 항체는 MX-DTPA에 접합되는 것이 바람직하나, 폐널- 또는 벤질-접합 DTPA, 사이클로헥실-DTPA, EDTA 유도체 및 DOTA와 같은 다른 킬레이터가 사용될 수도 있다. 본 발명에 따른 킬레이터는 이작용기 이상, 즉, 둘 이상의 결합 부위(금속 이온과 킬레이팅하기 위한 하나 이상의 부위 및 단백질 리간드와 결합하기 위한 하나 이상의 부위)를 가지면 어느 킬레이터든지 가능하다.

사용되는 항체에 따라, 접합된 항체는 일반적으로 0.5 내지 30 mg/ml, 더 바람직하게는 2 mg/ml의 농도로 공급된다. 접합된 항체의 부피는 방사선표지에 따른 최적 표지를 위해 필요한 농도 및 양에 따라 달라진다. 그러나, 접합된 항체는 전체 부피가 멸균 주사기 및 무균 기술을 사용하여 반응 바이알에 첨가되는 부피 및 농도로 공급된다. 이로써 재생가능성이 증가하고, 사용이 용이해진다. 본 명세서에 기재된 키트의 모든 시약은 무균 및 무발열원이고, 특히 항체 실험부터 투여까지 직접 진행함에 있어서 간단하고 신속하도록 디자인된다. 일부 표지에 대해서는 표지 효과를 시험할 필요가 없다.

키트의 특히 유익한 성분은 방사선헌해의 효과에 대해 안정화 및 방사선표지 접합된 항체를 환자에 투여하기 위한 제제화 완충액이다. 제제화 완충액은 표지된 항체를 위한 희석액 및 투여 완충액으로서 모두 작용하는 약학적으로 허용가능한 담체이다. 약학적으로 허용가능한 희석액은 치료 또는 진단 항체를 환자에게 투여하는데 사용될 수 있지만, 본 발명의 제제화 완충액은 특히 방사선표지 항체를 투여하는데 적합하다.

예를 들어, 본 발명의 제제화 완충액은 이트륨 및 더 낮은 정도의 인듐으로 인한 방사선헌해를 최소화하는, 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 아스코르브산염과 같은 방사선보호제(radioprotectant)를 포함한다. 다른 방사선보호제, 즉, 자유 라디칼 스캐빈저(페놀, 살파이트, 글루타티온, 시스테인, 젠티스산(gentisic acid), 니코틴산, 아스코르빌 팔미테이트, HOP(:O)H<sub>2</sub>, 글리세롤, 소디움 포름알데히드, 세록실레이트, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 및 SO<sub>2</sub> 등)도 당해 기술분야에 공지되어 있고, 본 발명의 제제화 완충액에서 사용될 수 있다.

방사선보호제는 일반적으로 방사선헌해로부터 항체를 보호하기 위해 제제화 완충액에 사용되지만, 방사선보호제를 반응 완충액에도 포함시킴으로써 보호에 더 영향을 줄 수 있다. 표지 과정을 방해하는 금속의 존재로 인해, 이것은 일반적으로 이전에 즉, HSA와는 행해진 적이 없다. 그러나, 킬레이팅 수지를 사용하여 HSA를 "제거"할 수 있으므로, 이것은 반응 완충액에도 포함될 수 있다. 아스코르브산염 또는 다른 방사선보호제는 또한 오염 금속을 제거하기 위해 처리될 필요가 있을 수 있다.

본 발명의 제제화 완충액은 또한 과량의 비접합 킬레이터를 포함한다. 비접합 킬레이터를 포함시키는 이유는 이 킬레이터가 환자 내에 있는 어떤 비-단백질 결합 방사선표지를 포착하는 역할을 하고, 방사선표지의 배출에 영향을 주어 환자의 뼈에 의한 "뼈-추적" 동위원소, 즉 <sup>90</sup>Y의 흡수를 줄이기 때문이다. 예를 들어, 키트의 항체가 DTPA 킬레이터와 접합하는 경우, 과량의 DTPA 또는 임의의 다른 킬레이터가 제제화 완충액에 포함될 수 있다. 이 제제화 완충액은 또한 전체 내용물이 반응 바이알로 이동되는 부피로 공급되는 것이 바람직하다. 상기한 바와 같이, 정확한 부피가 측정 및 이동될 필요가 없으므로 이로써 사용의 용이성 및 재생가능성이 증가한다.

바람직한 제제화 완충액으로는 포스페이트 완충 또는 생리 식염수, 인간 혈청 알부민 및 DTPA를 들 수 있다. 인간 혈청 알부민은 약 1 내지 25% (w/v)의 농도가 바람직하고, 보다 바람직하게는 약 7.5% (w/v)의 농도이다. DTPA의 농도는 약 1 mM인 것이 바람직하다. 아스코르브산염은 인간 혈청 알부민의 대안물로 사용될 수 있고, 일반적으로 약 1 내지 100 mg/ml의 농도로 사용된다. 더 넓은 범위의 농도는 환자의 안전을 위태롭게하지 않으면 사용될 수 있다.

방사선표지 키트의 항체는 본 발명의 방법에 따른 이작용기 칼레이터를 통해 선택된 방사성동위원소로 쉽게 표지된다. 이 점에서 더 간단해지도록, 본 발명의 키트는 또한 방사성 동위원소 용액의 pH를 조절하기 위한 완충액을 함유하는 바이알, 및 표지 및 이후 제제화 완충액 내에 최종 방사선표지 항체를 재현탁하기 위한 멸균 유리 반응 바이알을 포함할 수도 있다. 10 ml 반응 바이알이면 일반적으로 충분하지만, 5 내지 20 ml를 담을 수 있는 바이알도 사용될 수 있다. 완충액은 10 내지 1000 mM, 더 바람직하게는 50 mM의 농도인 저-금속 소디움 아세테이트 용액인 것이 바람직하다.

본 발명의 특정 키트는 MX-DTPA 접합 항체, 2B8-MX-DTPA를 포함한다. 2B8은 램프종 환자에게 투여시 B 세포 고갈에 영향을 주는 것으로 보이는 항-CD20 항체이다. 그러나, 본 발명의 방사선표지 키트가 다른 항-CD20 항체, 또는 DTPA 또는 다른 다가 칼레이터에 접합된 다른 항체의 방사선표지를 위해 최적화될 수 있다는 것은 당해 기술분야의 기술자에게 명백할 것이다. 본 발명의 바람직한 키트는 적어도 (i) 용액 중 또는 동결건조된(재구성 필요) MX-DTPA 접합 2B8 항체를 함유하는 바이알; 및 (ii) 방사선표지 항체를 환자에 투여하기 위한 제제화 완충액을 함유하는 바이알을 포함할 수 있다. 바람직한 키트는 또한 (iii) 동위원소 pH를 조절하기 위한 완충액, 및 (iv) 반응 바이알을 포함할 것이다. 이와 달리, 및 더 바람직하게는, 완충액은 반응 바이알에 공급되어, 완충액을 측정 및 이동하는 단계를 없애고, 키트 성분의 단순성, 일관성 및 무균성을 증가시킨다. 그러나, 다른 실시예들은 또한 즉, 완충액을 동위원소 바이알에 먼저 첨가한 다음, 완충된 동위원소를 반응 바이알에 옮기는 것을 보여준다. 이 경우, 반응 바이알은 필요한 항체 부피로 공급될 수 있다. 이와 달리, 동위원소/완충액 바이알은 항체 접합체의 첨가물을 수용하기에 충분히 크게 즉, 공급자의 바이알로 직접적으로 만들어질 수 있다. 이로써 반응 바이알이 불필요해진다.

상기한 바와 같이, 다른 바람직한 키트 형태는 반응 바이알 자체가 필요한 부피의 접합된 항체(즉,  $^{111}\text{In}$  및  $^{90}\text{Y}$ 에 대해 각각 1 또는 1.5 ml)를 함유하는 것을 포함한다. 항체는 원하는 특정 동위원소에 따라 적당한 방사선표지 pH(즉,  $^{111}\text{In}$ 에 대해서 pH 3-6,  $^{90}\text{Y}$ 에 대해서 pH 3-5)를 제공하는 완충액에 공급될 수 있다. 동위원소에 따라 다른 완충액을 사용할 수 있다(즉,  $^{90}\text{Y}$ 에 대해 소디움 아세테이트,  $^{111}\text{In}$ 에 대해 소디움 시트레이트). 완충액의 pH 및 조성은 또한 표지되는 결합 리간드의 성질에 따라 다를 수 있다(즉, 표지 웨პ티드는 <pH 3이 사용되게 할 수 있다). 그리고 나서, 본질적으로 동위원소는 제제화 완충액에서와 같이, 반응 바이알에 직접 이동된다. 키트의 사용을 두 이동 단계로 제한하는 것은 재생가능성 및 단순성을 더 증가시키고, 키트 성분이 조작되는 동안 멸균물이 오염될 기회를 줄인다.

본 발명의 방사선표지 키트는 또한 방사성 동위원소의 바이알을 포함할 수 있고, 또는 방사성 동위원소는 적당한 공급자로부터 별도로 주문할 수 있다. 본 발명의 바람직한 방사성 동위원소는 HCl 중의  $^{111}\text{In}$  클로라이드 및  $^{90}\text{Y}$  클로라이드이지만, 개시된 방법은 이들 동위원소에 한정되지 않는다. 이미지화에 적용하기 위해 사용되는 다른 방사성 핵종은 당해 기술분야, 즉, 본 명세서에 참조문헌으로 통합된 미국 특허 제 4,634,586호, 제 5,460,785호 및 제 5,766,571호에 기재된 바와 같이 공지되어 있다. 인듐-[111]은 B 세포 종양을 이미지화하는데 특히 유리하고,  $^{90}\text{Y}$ 와 같은 베타 방사체는 방사선치료제로서 특히 유용하다. 이 목적 또는 다른 목적에 적합한 다른 방사성 동위원소들, 즉, 알파 방사체도 항체 접합에 사용되는 칼레이터에 따라 사용될 수 있다.

미국 출원 번호 제 08/475,813호에 개시된 조합 치료법의 효능이 입증되면, 다른 키트 실시예는 또한 방사선표지 항-CD20 항체 전 또는 후에 투여되도록 키메라 항체, 즉 Rituxan<sup>®</sup>의 별도의 바이알을 포함할 것이다. 키메라 항체를 방사선표지 항체 전에 투여하는 경우, 쥐의 항-CD20 항체 투여에 반응하여 일반적으로 발생하는 HAMA 반응이 상당히 감소되어, 방사선표지 쥐 항체의 치료적 유용성을 증가시킬 것이다. 또한, 키메라 항-CD20이 순환 B 세포를 제거하는데 사용되는 경우, 이어서  $^{111}\text{In}$ -표지된 항체로 이루어지는 진단 이미지가 더 뚜렷해질 것이다.

진단 방사선표지 항체 및 치료 방사선표지 항체는 모두 조합 치료법에서 함께 사용될 수 있다는 것이 명백하다. 이 점에서, 진단 항체는 치료 전후에 종양 크기를 가시화하기 위해 치료 항체 전 또는 후에 사용될 수 있다. 이 경우, 본 발명의 키트는 사용되는 특정 방사성 동위원소로 항체를 방사선표지하는데 필요한 최적 pH에 따라 특이적으로 제제화된, 별도의, 아마도

컬러-암호화된, 완충액 바이알을 포함할 수 있다. 이러한 시스템은 적당한 완충액이 각각의 표지에 대해 사용된다는 것을 보증하고, 임상의가 마치 두 키트를 구입한 것처럼 두 항체를 방사선표지하는 것을 동일하게 용이하게 한다. 이러한 키트는 효과상 두 방사선표지 키트로부터의 성분을 하나로 결합시킨다.

본 발명의 방사선표지 키트의 성분들은 적당한 농도 및 pH에서 공급되어, 항체 투여 전에 멸균성이 쉽게 유지되고, 이로써 추가의 완충액 또는 배지가 거의 필요하지 않다. 그러나, 당해 기술분야의 기술자들에게는 시약 중 일부가 임상 장소에서 제조, 멸균 및 멸균성에 대해 시험될 수 있다는 것이 명백하다. 따라서, 본 발명의 키트의 다양성은 소비자의 예산 및 선호도에 따라 다를 수 있다.

본 발명의 방사선표지 키트는 환자에게 투여하기 위한 킬레이터-접합된 항체를 방사선표지하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 이러한 방법은 일반적으로, (i) 킬레이터-접합된 항체를 방사성 동위원소를 함유하는 용액과 혼합하는 단계; (ii) 이 혼합물을 적당한 온도에서 적당량의 시간 동안 배양하는 단계; 및 (iii) 방사선표지 항체가 더 정제되지 않고 환자에게 직접 투여될 수 있도록 표지 항체를 제제화 완충액에서 적당한 농도로 희석시키는 단계를 포함한다.

항체는 항-CD20 항체인 것이 가장 바람직하고, 특히 항-CD20 항체는 2B8일 수 있다. 항체는 임의의 적당한 킬레이터, 즉, MX-DTPA, CHX-DTPA, 폐닐- 또는 벤질-DTPA, DOTA, EDTA 유도체 등과 접합될 수 있다. MX-DTPA가 바람직하다. 항체 접합에 영향을 미치는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[Kozak et al.(1989); Mirzadeh et al.(1990), Brachbiel et al.(1986)].

본 발명자들은 킬레이터-접합된 항체를 방사선표지하는 방법이 킬레이터-접합 항체와 혼합되기 전에 방사선표지 함유 용액은 pH가 약 3.0 내지 6.0, 더 바람직하게는 약 4.2로 조절되는 경우 가장 잘 작동한다는 것을 발견하였다. 다른 완충액이 사용될 수 있으나, pH를 조절하기 위해서는 저-금속 소디움 아세테이트가 특히 바람직하다. 소디움 아세테이트는 약 10 내지 1000 mM의 농도인 것이 바람직하고, 50 mM의 농도인 것이 더 바람직하다.

방사성 동위원소가  $^{111}\text{In}$  클로라이드인 경우, 단일 투여량을 제조하는데 사용되어야 하는  $^{111}\text{In}$  클로라이드의 부피량은 일반적으로 표지될 때의 방사능 농도로 나누면 약 5.5 mCi이다. 환자에게 투여하기 위한  $^{111}\text{In}$ 의 전형적인 진단 투여량은 약 2 내지 10 mCi이다. pH를 조절하기 위해 사용되는 소디움 아세테이트의 양은 소디움 아세테이트 농도 및 동위원소 담체 용액에 따라 다르므로 매우 광범위할 수 있다. 소디움 아세테이트의 농도가 50 mM인 경우, pH를 조절하기 위해 필요한 양은 일반적으로 다량이 사용되더라도 사용된  $^{111}\text{In}$  클로라이드 부피량의 약 1.2배이다. HCl에 대한 소디움 아세테이트의 비율이 중요하고, 사용된 소디움 아세테이트의 양이 완충액 중의 HCl의 양 및 농도에 따라 변한다는 것을 알아야 한다. 그리고 나서, 약 2 mg/ml의 농도에서 약 1 ml의 킬레이터-접합된 항체는 방사선표지 아세테이트 용액과 혼합되고, 이 혼합물을 약 30분, 또는 항체의 최적 표지를 이루기에 충분한 시간 동안 배양된다. 이러한 시간은 약 30초 내지 약 60분의 범위일 수 있다. 그리고 나서, 제제화 완충액은 약 10 ml의 전체 최종 부피를 달성하기에 필요한 양으로 첨가된다.

항체를 표지하는데 필요한 최적의 시간은 사용된 항체, 특정 방사선표지 및 특정 접합체에 따라 다를 수 있다. 방사선표지를 위해 할당된 시간의 최적화에 내재하는 인자는, 표지되는 시약의 항체에 대한 킬레이터의 비율이다. 예를 들어, 항체에 대한 킬레이터의 비율은 치료적으로 유용한 수준의 결합을 달성하기에 충분히 높은, 즉, 방사성 동위원소에 따라 90 내지 95%이어야 하지만, 또한 항체의 구조적 완전성 또는 면역 반응성이 위태롭도록 너무 높아도 안된다. 이것은 어떤 경우 접합된 킬레이터의 수준을 더 낮추고, 표지 시간 더 늘리는 어떤 균형 과정을 필요로 한다.

예를 들어, 2B8 및 MX-DTPA에 대해, 단지 항체에 대한 킬레이터의 몰비를 약 1½ 내지 1로 하여,  $^{90}\text{Y}$ 에 대해 5분 이내,  $^{111}\text{In}$ 에 대해 약 30분 이내에 표지함으로써 원하는 수준의 방사선풀합을 달성할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 원하는 수준의 방사선풀합은 달성되었으므로, 항체에 대한 킬레이트 비율을 증가시킬 필요는 없었다. 또한, 접합된 킬레이터의 양을 증가시키는 것은 항체 면역 반응성에 영향을 줄 수 있으므로 유익하지 않았다. 이러한 파라미터들은 본 발명에 기재된 바와 같은 키트의 디자인을 위한 다른 항체에 대해 실험적으로 결정될 수 있다.

방사성 동위원소가  $^{90}\text{Y}$  클로라이드인 경우, 단일 투여량을 제조하기 위해 사용된  $^{90}\text{Y}$  클로라이드의 부피량은 일반적으로 표지시간의 방사능 농도로 나누면 약 10 내지 50 mCi의 범위이고, 바람직하게는 약 45 mCi이다. pH를 조절하기 위해 사용된 소디움 아세테이트의 양은 소디움 아세테이트 농도 및 동위원소 담체의 농도에 따라 다르므로 매우 광범위할 수 있다. 소디움 아세테이트의 농도가 50 mM이고,  $^{90}\text{Y}$ 가 50 mM HCl로 공급되는 경우, pH를 조절하기 위해 필요한 양은 일반적으로 사용된  $^{90}\text{Y}$  클로라이드의 부피량의 약 1.2배이다. 그리고 나서, 약 2 mg/ml의 농도에서 약 1.5 ml의 킬레이터-접

합된 항체는 방사선표지 아세테이트 용액과 혼합되고, 약 5분, 또는 항체의 최적 표지화를 달성하기에 충분한 시간 동안 배양된다. 이러한 시간은 약 30초 내지 약 60분일 수 있다. 제제화 완충액은 약 10 ml의 전체 최종 부피를 달성하는데 필요한 양으로 첨가된다.

본 발명의 방사선표지 방법은 본 명세서에 기재된 방사선표지 키트를 사용하여 수행되는 것이 바람직하다. 그러나, 당해 기술분야의 기술자들에게는 바람직한 성분 및 조건이 단지 본 발명의 방법을 실시하기 위한 단순히 허용가능한 가이드라인이고, 적당한 최적화로 어느 정도 변경될 수 있다는 것이 명백할 것이다. 바람직한 것과는 거리가 있어도 본 방법의 목적을 달성하는 조건이라면 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 생각된다.

본 발명의 방사선표지 키트는 방사선표지 후에 항체의 결합 친화력을 편리하게 입증하는데 적합한 시약과 함께 공급될 수도 있다. 이런 경우, 본 발명의 키트는 항체를 환자에게 투여하기 전에 이의 표적 세포에 대한 방사선표지 항체의 %결합을 결정하는데 사용될 수도 있다. 본 발명자들은 또한 기재된 특정 결합 분석 키트가 일반적으로 정제된 항원이 이용 불가능한 임의의 항체에 대한 친화력을 시험하기에 유용할 수 있다는 것을 발견하였다. 따라서, 결합 분석 성분은 별도의 키트로서 시판될 수도 있다.

일반적으로, 결합 분석 및 방사선표지 키트는 (i) 키트 내에서 항체에 의해 인식되는 항원을 발현하는 동결건조된 세포의 바이알 하나 이상; (ii) 퀄레이터-접합된 항체를 함유하는 바이알; (iii) 제제화 완충액을 함유하는 바이알, 및 (iv) 방사선표지 키트에 대해 상기한 바와 같이, 이 키트는 방사성 동위원소의 pH를 조절하기 위한 완충액을 함유하는 바이알 및 멸균 유리 반응 바이알을 포함할 수도 있다. 완충액은 약 10 내지 1000 mM의 농도의 저-금속 소디움 아세테이트 용액이고, 유리 반응 바이알은 5 ml 이상의 부피를 보유하는 것이 바람직하다. 항체는 항-CD20 항체인 것이 바람직하고, 퀄레이터는 MX-DTPA인 것이 바람직하다. 상기한 바와 같이 다른 퀄레이터도 사용될 수 있다. 어떤 퀄레이터-접합된 항체가 표지될 수 있고, 이의 친화력이 평가될 수 있지만, 바람직한 접합된 항체는 2B8-MX-DTPA이다. 제제화 완충액은 상기한 바와 같이 방사선포호제 및 비접합 퀄레이터를 포함하는 포스페이트 완충 식염수이고, 방사성 동위원소는 포함되거나 포함되지 않을 수 있으며, 바람직하게는  $^{111}\text{In}$  클로라이드 또는  $^{90}\text{Y}$  클로라이드이다. 퀄레이터에 따라 다른 방사성 동위원소가 사용될 수 있다.

결합 분석/방사선표지 키트와 상기 방사선표지 키트 사이의 차이는 항체 친화력을 시험하기 위한 기질 표적으로 작용하기 위한 항원-양성 세포의 함유이다. 항원이 CD20인 경우, 바람직한 CD20-양성 세포는 SB 세포(ATCC # CCL 120)이지만, 임의의 CD20-양성 세포도 사용할 수 있다. 결합 분석 및 방사선표지 키트는 또한 음성 대조구로 사용하기 위한 항원-음성 세포를 포함할 수 있다. 바람직한 CD20-음성 세포는 HSB 세포(ATCC # CCL 120.1)이지만, 임의의 CD20-음성 세포도 사용할 수 있다.

물론, 결합된 방사선표지 및 결합 분석 키트는 또한 조합 치료법에 영향을 미치는 목적을 위해 또는 진단 이미지화 전에 말초 B 세포를 제거하기 위해 표지되는 항체 이외에 키메라 항-CD20 항체의 바이알을 포함할 수 있다. 이러한 별도의 항체는 바람직하게는 Rituxan<sup>®</sup>이지만, 종양 세포 사멸을 일으키는 임의의 항체일 수 있다. 사실, 조합 치료법이 동일한 종류의 세포, 즉, B 세포 림프종을 표적하는데 사용되는 한, 두 가지 다른 종류의 항체 즉, 두 가지 다른 종류의 B 세포 항원에 대한 항체는 한 키트로 결합될 수 있다.

키트의 성분이 다른 항체를 표지하는데 사용될 수 있는 것과 같이, 표적 항원에 따라 항체 친화력을 실험하기 위한 다른 세포도 준비될 수 있다. 그러나, 항-CD20 항체에 대해서는, 표적 세포가 동결건조된 형태로 제공되기 때문에 본 발명의 결합 분석 및 방사선표지 키트가 시판 세팅에 특히 적합하다. 이로써 간단하고 체계적으로 항체 효능을 입증할 수 있고, 조직 배양 설비를 유지하는데 드는 비용 및 혼란을 없앨 수 있다. 동결건조된 세포는 일반적으로 본 발명의 방법에 따라 바이알 당 0.5 내지  $500 \times 10^6$  세포 분취량으로 공급된다.

특정 설비는 이미 방사선표지된 항체를 주문하는 것이 더 좋을 수 있으며, 이 경우 이러한 설비는 항체가 표적 친화력을 유지한다는 것을 확인하기 위해 결합 분석 시약을 필요로 할 수 있다. 이 경우, 본 발명은 또한 표적 세포에 대한 방사선표지 항체의 %결합을 측정하기 위한 결합 분석 키트를 제공한다. 이러한 키트는 고정 및/또는 동결건조된 항원-양성 세포의 바이알을 하나 이상 포함하고, 상기한 바와 같이 결합 분석 및 방사선표지 키트를 위한 항원-음성 세포를 선택적으로 포함할 수 있다. 또한, 이러한 키트의 변형은 경쟁 분석을 통한 소비자 항체의 결합 특이성을 입증하기 위해 비표지된 대조구 항체를 포함할 수 있음이 명백하다.

또한, 항원이 CD20인 경우, CD20-양성 세포는 SB 세포(ATCC # CCL 120)인 것이 바람직하고, CD20-음성 세포는 HSB 세포(ATCC # CCL 120.1)인 것이 바람직하며, 이들은  $0.5 \text{ ml} \times 50 \times 10^6$  세포의 분취량으로 동결건조된 형태로 공급된다. 이 경우, 항체는  $^{111}\text{In}$  또는  $^{90}\text{Y}$ 로 표지된 2B8의 MX-DTPA 접합체인 것이 바람직하다.

본 명세서에 기재된 추가의 키트 실시예 관점에서, 본 발명의 방사선표지 키트 및 방법의 이점 중 하나는 추가 정제 단계가 필요하지 않다는 것과, 방사선표지 항체가 환자에게 직접 투여되어 유용한 시간을 절약할 수 있고, 항체 안전성을 증가시킬 수 있다는 것이 강조되어야 한다. 따라서, 임상의가 투약하기 전에 방사선표지 항체의 결합 특이성 및 친화력을 시험 또는 입증하는 것이 바람직할 수 있지만, 항체 안정성 및 방사선분해의 억제가 이트륨을 사용하는 것과 같이 특정한 것이라면 특정 관심사라면, 이러한 시험을 특정 방사성 동위원소 없이 할 수 있음이 강조된다. 결합 친화력 및 특이성이 시험되는 키트 실시예를 제공함으로써, 본 발명자들이 제안하는 것은 이러한 실험들이 본 발명의 키트 또는 방법에 절대적으로 필요하다는 것이 아니다. 이러한 항체 유효성을 시험하는 것에 대한 선택은 순전히 임상의의 선택에 달렸다.

본 발명자들은 또한 본 발명의 결합 분석 키트를 위해 고정 및 동결건조된 세포를 준비하는데 사용되는 방법이 시판 키트를 위한 세포를 준비하는데 특히 적합하다는 것을 알았다. 세포들은 동결건조되기 전에 고정되어 구조/안정성이 개선될 수 있다. 특히, 본 발명의 세포들은 항체 결합 분석에 사용되는 경우에 고도의 재생가능성을 나타낸다.

특히, 본 발명은 (i) 원심분리기에 의해  $0.5 \text{ ml}$  당  $2 \times 10^6$  세포의 세포 밀도로 세포를 수집하는 단계; (ii) 평형 염용액, 즉, HBSS에서 세포를 1회 이상 세척하는 단계; (iii) 펠렛화된 세포를 담체 단백질 및 한 종류 이상의 당을 함유하는 평형 염용액을 포함하는 동결건조 완충액 중에서 재현탁하는 단계; (iv) 재현탁된 세포의 분취량을 마이크로퓨즈튜브 또는 유리 바이알에 분배하는 단계; 및 (v) 약  $30\text{--}60$  밀리리터에서  $12\text{--}96$ 시간 및 더 바람직하게는  $24\text{--}72$ 시간 세포를 동결건조시키는 단계를 포함하는 동결건조된 세포의 제조방법을 포함한다. 이 방법은 상기 세포가 SB 세포(ATCC #CCL 120) 또는 HSB 세포(ATCC # CCL 120.1)인 경우 동결건조된 세포를 제조하는데 특히 적합하지만, 다른 종류의 세포에도 적용될 수 있다.

완충액은 일반적으로 담체 단백질로서 1%(w/v) 농도의 소혈청 알부민 및 10% 농도의 만니톨을 포함하는 것이 바람직하다. 그러나, 생각할 수 있는 다른 담체 단백질, 즉, HSA, 및 다른 당도 사용될 수 있다. 세포는 약 1300 rpm의 속도에서 원심분리하여 수집되고, 염용액 HBSS(Hank's balanced salt solution)이 첨가된다. 세포는 일반적으로  $50 \times 10^6$  세포의 농도로 재현탁된다. 그러나, 당해 기술분야의 기술자들은 상기 조건이 세포 생존 능력을 명백히 손상시키지 않으면서 약간 변형될 수 있다는 것을 잘 알 것이다. 또한, 상기 조건들은 다량의 세포를 위한 공정을 최적화하기 위해 디자인된 추가의 공정에 의해 보완될 수 있고, 그 예로는, 세포를 동결건조 완충액으로 교환하기 위한 접선 흐름 투석여과를 들 수 있다.

본 발명의 결합 분석 키트는 방사선표지 항체의 결합 친화력을 평가하기 위한 분석에 사용될 수 있다. 이러한 분석은 본 발명의 한 주제이기도 하다. 표적 세포에 대한 방사선표지 항체의 %결합을 측정하기 위한 결합 분석은 일반적으로 하기 단계를 포함한다: (i) 방사선표지 항체의 분취량 하나 이상과 항원 양성 세포의 분취량 하나 이상을 혼합하는 단계; (ii) 단계 (i)의 분취량과 동일한 방사선표지 항체의 분취량 하나 이상과 대조구로서 단계 (i)의 항원-양성 세포의 분취량과 동일한 부피의 희석 완충액의 분취량 하나 이상을 혼합하는 단계; (iii) 원심분리에 의해 세포를 펠렛화하는 단계; (iv) 펠렛화된 세포 및 대조구의 상동액에서 방사능을 측정하는 단계; 및 (v) 세포 상동액 중의 방사능의 양과 대조구에서 방사능의 양을 비교하는 단계.

본 발명의 방사선표지 키트가  $^{111}\text{In}$  클로라이드 또는  $^{90}\text{Y}$  클로라이드를 선택적으로 함유하는 것과 같이, 본 발명의 결합 분석은 일반적으로  $^{111}\text{In}$  또는  $^{90}\text{Y}$ 로 표지된 항체를 사용하여 수행된다.  $^{111}\text{In}$ 가 방사선표지인 경우, 분석 튜브에서 방사능은 감마 계수기를 사용하여 측정한다.  $^{90}\text{Y}$ 가 표지인 경우에는 감마 계수기가 사용될 수도 있으나 섬광 계수기를 사용하여 방사능을 측정한다.

본 발명의 결합 분석을 위해 바람직한 항체는 항-CD20 항체이고, 항-CD20 항체는 2B8인 것이 바람직하며, 여기서 2B8 항체는 본 발명의 방사선표지 키트를 사용하여 표지된다. 그러나, 임의의 방사선표지 항체는, 세포가 특정 항원을 발현할 수 있다면 시험될 수 있다. CD20이 항원인 경우, 분석하기에 바람직한 세포는 SB 세포(ATCC # CCL 120)이나, 분석은 임의의 방사선표지 항체 및 적당한 표적 세포를 사용하여 최적화 및 수행될 수도 있다.

분석에 사용되는 희석 완충액은 항체의 결합을 유지해야 하며, 세포에 대한 비-특이 결합을 최소화하기 위한 담체 단백질, 예를 들면, BSA를 함유할 수 있는 생리학적 완충액이다. 희석 완충액을 가진 튜브가 대조구로 작용하지만, 항원-음성 세포를 사용하여 다른 대조구가 분석에 포함될 수 있다. 이 경우, 결합 분석은 하기 단계를 더 포함한다: (i) 방사선표지 항체의 분취량 하나 이상과 항원-음성 세포의 분취량 하나 이상을 혼합하는 단계; (ii) 항원-음성 세포를 원심분리기로 펠렛화하는 단계; (iv) 항원-음성 펠렛화된 세포의 상등액에서 방사능을 측정하는 단계; 및 (v) 항원-음성 세포 상등액에서 방사능의 양과 항원-양성 세포 상등액 및 대조구의 상등액에서 방사능의 양을 비교하는 단계. 이 튜브로부터 얻는 방사능을 희석 완충액 대조구와 비교함으로써 항원-양성 세포에 대한 비-특이적 결합의 양을 측정할 수 있다. CD20이 항원인 경우, CD20-양성 세포는 SB 세포이고, CD20 음성 세포는 HSB 세포(ATCC # CCL 120.1)인 것이 바람직하다.

상기한 바와 같이, 본 발명의 동결건조된 세포는 방사선표지 항체의 결합 효능을 실험하기 위한 간단하고, 효과적이고, 재생 가능한 기준을 제공한다. 따라서, 본 발명의 결합 분석은 본 발명의 결합 분석 키트에 포함된 동결건조 세포를 사용하여 수행되는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명의 방사선표지 분석은 본 발명의 결합 분석과 조합될 수 있고, 여기서 항체는 본 발명에 기재된 바와 같이 킬레이터-접합된 항체를 표지하는 방법을 사용하여 먼저 표지된다. 본 발명의 결합 분석은 본 명세서에 기재된 결합 분석 및 방사선표지 키트 중 하나를 사용하여 수행되는 것이 더 바람직하다.

항체의 친화력이 시험 또는 입증되지만 방사선표지가 부착되지 않은 예들도 있을 수 있다. 예를 들어, 어떤 환경, 즉, 트리블-슈팅하에서, 방사선표지하기 전에 항체의 결합 친화력을 시험하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 경우, 본 발명은 또한 표적 세포에 대한 시험 항체의 친화력을 평가하기 위한, (i) 동일한 항원에 대해 특이적인 공지된 항체를 사용하여 루테늄-표지된 대조구 항체를 제조하는 단계; (ii) 각각 별개 농도의 시험 항체 및 각각 별개 농도의 대조구 항체가 각각 별개의 튜브에 있는 것을 특징으로 하는, 증가량의 시험 항체 및 증가량의 비표지 대조구 항체를 고정 농도의 표적 세포 및 소량의 루테늄-표지된 항체와 함께 배양시키는 단계; (iii) ORIGEN 기구를 사용하여 상대 전기화학발광(ECL)에 기초하여 각 반응 튜브에서 결합의 양을 측정하는 단계; 및 (iv) 시험 항체의 평균 친화력 값을 계산하는 단계를 포함하는 경쟁 결합 분석을 포함한다. 평균 친화력 값은 멀러(Muller, J. Immunological Methods(1980) 34:345)의 방법 또는 임의의 다른 적당한 방법을 사용하여 EC50 값 및 공지된 농도의 소량 항체로부터 계산할 수 있다. 이 분석은 방사선표지 항체, 또는 항원이 정제될 수 없고, 세포가 항원 공급원으로서 필요한 경우의 임의의 항체의 친화력을 시험하기 위해 사용될 수도 있다. 본 발명의 고정, 동결건조된 세포들은 표적 세포로 사용될 수 있다.

본 발명의 경쟁 결합 분석이 항-CD20 항체의 친화력을 시험하기 위해 수행되는 경우, 대조구 항체는 2B8, 또는 다른 비접합 항-CD20 항체일 수 있다. 대조구 항체는 킬레이터-접합 항체일 수 있다. 시험 항체는 또한 대조구 항체의 킬레이터-접합체일 수 있다. 이와 달리, 시험 항체는 2B8과 비교한 CD20에 대한 결합 친화력이 흥미있는 다른 항-CD20 항체일 수 있다. 그러나, 분석은 적당한 표적 세포가 사용 가능한 한 다른 특이성을 가진 항체를 사용하기 위해 변형될 수 있다.

본 발명의 경쟁 결합 분석에서, 바람직한 표적 세포는 CD20-양성 세포이고, 더 바람직하게는 SB 세포(ATCC # CCL 120)이고, 본 발명의 방법에 따라 제조된 재현탁 동결건조된 SB 세포인 것이 더 바람직하다. 다른 방법으로 동결건조된 세포 또는 고정된 세포도 사용될 수 있다. 루테늄-표지된 항체는 일반적으로 대조구 항체를 루테늄(II) 트리스-비페리딘 킬레이터의 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(TAG-NHS)와 배양시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조되지만, 항체를 표지하는 다른 공지된 방법도 고려될 수 있다. 표지하기 위해, 대조구 항체 및 TAG-NHS는 약 1:15의 몰비로 배양되는 것이 바람직하다.

본 발명의 이 실시형태 및 다른 실시형태는 하기 도면, 실시예 및 발명의 상세한 설명을 참조하여 명백히 설명될 것이다.

## 정의

본 명세서에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 달리 정의되지 않으면, 본 발명이 포함되는 당해 기술분야의 기술자들에게 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동일한 방법 및 재료가 본 발명의 실습 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 기재된다. 본 발명의 목적을 위해, 하기 용어를 다음과 같이 정의한다.

**저금속 - 금속 불순물을 방사선결합에 영향을 주지 않는 수준으로 줄이기 위해 처리된 시약을 말한다.**

**항원 양성 - 항체가 결합할 수 있는 방식으로 본 발명의 특정 항체에 의해 인식되는 항원을 발현하는 것을 의미한다.**

% 방사선결합 - 초기에 반응에 첨가된 방사선표지의 총량과 관련하여 항체에 접합되는 방사선표지 반응으로부터의 방사선표지량을 말한다.

%결합 - 특이성을 가지거나 가지지 않고, 표적 항원에 결합한 시료에서의 항체의 양을 말한다.

% 면역반응성 또는 결합 특이성 - 특이성을 가지고 표적 항원에 결합한 항체 시료의 양을 말한다.

진단 항체 - 종양 및 항원 양성 세포의 진단 이미지화에 영향을 줄 수 있는  $^{111}\text{In}$ 과 같은 방사선표지에 접합된 항체를 말한다.

치료 항체 - 표적 항원에 결합하여 세포 사멸에 영향을 줄 수 있는 알파 또는 베타 방출 방사선표지(예를 들면  $^{90}\text{Y}$ )에 접합된 항체를 말한다.

### 쥐의 모노클로날 항-CD20 항체 2B8, 접합된 2B8,

#### $^{111}\text{In}$ 및 $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8의 임상전 개발

I. 쥐의 모노클로날 항-CD20 항체 2B8, 접합 2B8-MX-DTPA,  $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA 및 HPLC-정제된  $^{90}\text{Y}$ -MX-DTPA의 개발을 위한 재료 및 방법

##### A. 재료.

###### 1. 세포.

인간 세포주 SB 및 HSB는 ATCC(American Type Culture Collection)으로부터 입수하여, 10% 우태아 혈청을 함유하는 RPMI-1640에서 배양하였다. CD20-양성 SB 세포주는 급성 림프아세포 백혈병을 가진 환자의 말초 혈액 버피 코트(buffy coat)에서 유래한 B 림프아세포 세포주이다(1). 항원-음성 세포주 HSB는 신생 시리아 햄스터에서 유도된 종양에서 유래한 T 림프아세포 세포주이다(2). 쥐의 골수종 세포주 SP2/0은 10% 우태아 혈청을 함유한 RPMI-1640에서 이와 유사하게 유지하였다.

###### 2. 항체.

항-CD20 항체 B1 및 Leu 16은 각각 Coulter Immunology 및 Becton/Dickinson으로부터 구입하였다.  $^{125}\text{I}$ -표지된 염소 항-마우스 IgG 및 염소 항-인간 IgG 항체는 ICN으로부터 입수하였다. 염소 F(ab')2 항-마우스 IgG는 Cappel로부터 입수하였다.

###### 3. 시약.

프伦트(Freund)의 완전 및 비완전 보강제는 Sigma Chemical Company에서 구입하였다. 폴리에틸렌 글리콜, HAT 농축물, 및 HT 농축물은 모두 Boehringer Mannheim으로부터 입수하였다. 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)는 Sigma Chemical Company에서 구입하였다. 인듐-[111] 클로라이드 및  $^{90}\text{Y}$  클로라이드는 Amersham 또는 NEN Dupont으로부터 입수하였다. 이트륨-[89] 클로라이드는 Aldrich Chemical Company에서 구입하였다. 다른 모든 시약은 표준 공급원으로부터 입수하였다.

접합 및 방사선표지 프로토콜에 사용되는 시약은 방사선표지 단계에서 방사성 동위원소와 경쟁할 수 있는 불순한 중금속 이온을 제거하기 위해 처리하였다. 시약들은 일반적으로 Chelex 100 이온 교환 수지(BioRad Industries) 컬럼을 통해 용액을 통과시켜 처리하거나, 또는 제조된 용액에 Chelex 100을 첨가하여 배치 처리하였다. 저금속-함유수(Milli-Q-정제 또는 관주수(Water for Irrigation: WFIr))를 모든 제조 및 희석에서 사용하였다. 무금속 용액을 멸균여과하고, 멸균 플라스틱 용기에 수집하였다.

##### B. 방법.

## 1. RIA를 사용한 2B8 하이브리도마 상등액의 생산 및 스크리닝.

10마리의 BALB/c 마우스를 프룬트 완전 보강제를 함유한 PBS 중에 혼탁된 2천만 SB 세포로 면역 시켰다. 세포들을 동물의 여러 부위에 s.c 및 i.p 주입하였다. 마우스를 2주 동안 방치한 후, 프룬트 불완전 보강제에 에멀션화된 SB 세포로 제2주입하였다. 이어서 매주 일정으로 PBS 중에 혼탁된 SB 세포로 면역 추가자극을 행하였다. 마우스를 6주 내지 4개월 동안 면역시켰다.

이 때 동물 두 마리에서 경부탈구로 치사시키고, 이들의 비장을 꺼내어 쥐의 골수종 SP2/0와 융합시켰다. 인간 SB 세포에 대해 방사선표지 코울터(Coulter) B1 항-CD20 항체의 결합을 효과적으로 억제하는 면역-후 혈청의 능력을 기준으로 동물들을 선택하였다. 각각 주입하기 3일 전에 선택된 동물들에게 PBS 중의 2천만 SB 세포를 최종적으로 1회 정맥내(꼬리 정맥) 주사하였다. 치사 직후, 무균 조건 하에서 비장을 꺼내고, 비장 세포를 5:1 비율(비장 세포:SP2/0)로 SP2/0 세포로 융합하였다. 융합된 세포는 조직 배양배지에서 세척하고, HAT 선택 매질을 함유하는 96 웰 플레이트에 분배하였다. 하이브리도마는 10-14일 후 코울터 B1 항체를 사용하여 억제 방사성면역분석으로 스크리닝하였다.

획립된 방사선표지 방법을 사용하여 항-CD20 항체를 분비하는 하이브리드의 스크리닝을 하였다. 요약하면, 코울터 B1 항-CD20 항체는 단백질 A 친화 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 제조자의 과정 이후에 요오드비즈(Pierce Chemical Co.)의 존재 하에서 간단한 산화에 의해 정제된 항체 50  $\mu\text{g}$ 을  $^{125}\text{I}$ 에 결합시켰다. 방사선표지 항체를 암버라이트 수지 상에서 탈염하고, 희석 완충액(0.2% 젤라틴, 0.02% 소디움 아자이드, 및 1.0% BSA를 함유하는 pH 7.4인 PBS) 중에 저장하였다. 시험 웰로부터 하이브리도마 상등액 50  $\mu\text{l}$ 과 함께 방사선표지 항체 10 나노그램을 미리 차단된 필터 분석 플레이트(차단 완충액: 10% PBS 함유하는 희석 완충액)의 각 웰에 넣고, 100,000 SB 세포를 50  $\mu\text{l}$  희석 완충액에 혼탁하였다. 혼탁액을 주변 온도에서 한 시간 동안 배양하였다. 이 플레이트를 V&P 과학 진공 매니폴드 상에서 세척 완충액 0.2% 젤라틴 및 0.02% 소디움 아자이드를 함유하는 pH 7.4인 PBS)으로 완전히 세척하고, 포획된 SB 세포를 함유하는 필터 하부는 감마 계수기로 읊겼다. HAT 매질 및 표지된 B1 항체만을 함유하는 웰은 배경 대조구로 사용되고, SB 세포를 함유하는 동일한 웰은 양성 대조구로 사용되었다. 억제 대조구는 방사선표지 B1 및 다양한 양의 비표지 B1 항체를 2  $\mu\text{g}$  내지 2ng의 범위로 포함했다.

## 2. 유세포 분석 연구.

### a. 세포주.

예비 유세포 분석 연구는 2B8 하이브리도마 배양의 상등액으로 수행하였다. 하이브리도마 상등액 100  $\mu\text{l}$ 을 SB 세포와 함께 주변 온도에서 한 시간 동안 배양하고, 이어서 1/400 희석으로 사용된 제2항체(염소 F(ab')2 항-마우스 IgG; Cappel)를 첨가하고, 한 시간 동안 어둠 속에서 배양을 계속하였다. 세포들을 5회 세척하였다. 대조구는 단지 자동형광성이 측정된 세포(제1차 또는 제2차항체 없음), 비-특이적 결합을 측정하기 위해 단지 제2차항체를 가진 세포 및 CD20 집단 대조구로서 상업적으로 입수 가능한 플루오레세인 이소티오시아네이트-접합 B1(B1-FITC)를 포함하였다.

일부 실험에서, 플루오레세인은 아미노기와 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)와의 반응을 통해 정제된 2B8 항체와 결합하였다. 요약하면, 2B8 항체(1.2mg/ml)는 pH 9.5, 단백질 mg 당 150-200  $\mu\text{g}$  FITC를 가진 0.1M 소디움 카보네이트 완충액에서 배양하였다. 이 용액을 2시간 동안 실온에서 배양하고, 생성된 2B8-FITC 접합체는 세파덱스 (Sephadex) G-25 컬럼 상에서 정제하였다. B1 및 Leu 16과 같이 이 연구에 사용된 다른 시약들은 플루오레세인 접합체로서 코울터 또는 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)으로부터 직접 구입하였다.

분석할 세포들을 수집하고, 0.2% BSA 및 0.1% 소디움 아자이드를 함유한 PBS로 3회 세척하였다. 생존 능력은 >90%의 생존력 요건을 트리판 블루 배제법으로 측정하였다. 세포 농도는 96 웰 U-바닥 플레이트에 웰 당 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 ml 당 3백만으로 조절하였다. 제1차항체(50  $\mu\text{l}$ )를 적당한 웰에 첨가하고, 이 혼합물을 30분 내지 1시간 동안 주변온도에서 배양하고; 이어서 세포들을 0.2% BSA 및 0.02% 소디움 아자이드를 함유하는 PBS를 200  $\mu\text{l}$ /웰로 5회 세척하였다. 세포들을 Sorvall 원심분리기 내의 플레이트 안에서 1300 RPM으로 1분간 원심분리하고, 플레이트를 부드럽게 "휘둘러(flicking)" 상등액을 제거하였다. 필요시 제2차항체를 첨가하고, 어둠 속에서 주변온도로 추가로 30분 내지 1시간동안 배양하고; 그 후, 웰들을 상기와 같이 세척하였다. 최종적으로, 200  $\mu\text{l}$ 의 고정 완충액(1% 파라포름알데히드를 함유하는 0.15M 소디움 클로라이드, pH 7.4)을 각 시료에 첨가하고, 분석하기 위해 처리된 세포를 12X75 mm 튜브로 읊겼다.

### b. 계집이 원숭이의 전혈

혈장을 제거한 후, 세포들을 원심분리 및 HBSS에서의 재현탁으로 2회 세척하였다. 우태아 혈청(2 mL)을 첨가하고, 세포들을 재현탁하였다. 그리고 나서, 재현탁 세포 100  $\mu\text{l}$ 를 각각 6, 15 ml 원뿔형 원심분리 튜브에 분배하였다. 형광-표지된 모노클로날 항체를 다음과 같이 첨가하였다:

튜브 1번: 쥐의 항-CD20-FITC(AMAC), 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5 $\mu\text{g}$ ;

튜브 2번: 염소 항-인간 IgM-FITC(Fisher) 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5 $\mu\text{g}$ ;

튜브 3번: 염소 항-마우스 IgG-RPE(Fisher) 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5 $\mu\text{g}$ ;

튜브 4번: 염소 항-인간 IgM-FITC + 염소 항-마우스 IgG-RPE

(흡수됨), 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5 $\mu\text{g}$ ;

튜브 5번: 항-인간 CD20-FITC(항-Leu 16, Becton Dickinson), 5 $\mu\text{g}$ ;

튜브 6번: 세포만(자동-형광).

표지된 항체 및 세포들을 1500 rpm에서 2분간 원심분리하여 세포와 항체를 혼합시키고, 이어서 시료 6개를 모두 얼음 위에 놓고, 30분간 배양하였다. 이어서, 튜브를 얼음에서 꺼내어 용해 완충액(37°C로 예열)을 12 mL의 부피로 첨가하였다. 그리고 나서, 이 시료들을 실온에서 15분간 배양하고, 1500 rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리하고, 상등액을 제거하였다. 그리고 나서, 세포 펠렛을 표지 완충액(1% BSA 및 0.05% 소디움 아자이드를 함유한 PBS)으로 2회 세척하였다.

이어서, 세포들을 튜브 당 고정 완충액(1% 파라포름알데드를 함유하는 pH 7.4인 0.15M 염화나트륨 0.5mL)를 첨가하여 고정시키고, 자동보정 및 눈금 측정 비즈(Calibrite beads)로 예비눈금측정을 사용하여 Becton Dickinson FACScan 상에서 분석하였다. FL1 모드에서 형광체로부터 녹색 형광을 측정하고, FL2 모드에서 피코에레테린(phycoeretherin)으로부터 레드 형광을 측정하였다. 데이터는 로그 형태로 나타내었다. 생존가능한 림프구 집단은 초기에 점 도시 비트맵에서 전면 대각광스캐터를 사용하여 확인하였다. 그리고 나서, 모든 다른 것을 게이트로 차단하여 전체 림프구 집단을 분리하였다. 이어서 형광 측정은 게이트 영역 내에서 발생한 특이적인 것들만 반영하였다.

고투여 약리학/독물학 연구를 위해서, 사전-조사 림프구 수준을 각각의 게잡이 원숭이에 대해 측정하고, 기준값으로 사용하였다. T- 및 B-세포의 백분율 및 T:B 비율을 계산하고, 고갈 참조로 사용하였다. 사전-조사 B 세포수는 Leu 16 및 항-인간 IgM 항체를 사용하여 계산하였다.

2B8을 원숭이에게 주입한 후, CD20 항원을 2B8로 포화시켰을 때, 전체 집단 중에서 B 세포의 백분율은 염소 항-인간 IgM-FITC, 항-마우스 IgG-RPE 및 이들 두 마커를 함유하는 이중 염색 집단을 사용하여 어렵잖았다. 이중 염색 집단은 2B8이 동물의 말초 혈액으로부터 모두 제거될 때까지 정량화하는데 사용되었다. 전체 림프구 집단에서 T 세포의 백분율은 항-CD2-FITC를 사용하여 평가하였다. 데이터는 셋의 평균이고, 각 시료에 대해 10,000회 측정하였다. 그 후, 각각의 지정된 혈액 시료로부터의 세포들을 평가하고, 각 경우 전체 림프구 집단 내의 T- 및 B-세포 하위집단을 계산하였다. T:B 비율도 조사하였다. 각 개별 원숭이에 대해 원래 B-세포 수준과 관련한 B-세포의 감소 %로서 B-세포의 고갈을 계산하였다.

### 3. CD20의 방사선요오드화 및 면역침전.

$^{125}\text{I}$  및 요오드비즈(Pierce Chemical Co.)로 표면 요오드화한 후 1억개의 SB 세포를 동등한 두 부분으로 분배하였다. 이 세포들을 상등액의 방사능 수준이 배경으로 돌아갈 때까지 원심분리로 반복 세척하였다. 100  $\mu\text{g}$ 의 2B8 또는 B1(Coulter Immunology) 항체를 표지된 B 세포의 두 시료 중 하나에 첨가하였다. 항체 및 SB 세포를 밤새 배양하고 나서, 모든 비결합 항체가 제거될 때까지 원심분리로 3회 세척하였다. 그리고 나서, 결합 2B8 및 B1을 함유하는 세포 펠렛을 용해시키고, pH 8인 0.1 M 트리스-HCl 중의 1% NP-40 세제를 첨가하여 추출하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 이 추출물을 30분 동안 고속으로 마이크로퓨즈 내에서 원심분리하고, 상등액을 새로운 튜브로 옮겼다. 단백질 A-세파로즈(300 $\mu\text{l}$ )를 각각의 튜브에 첨가하고, 수지를 원심분리로 펠렛화하였다. 그리고 나서, 단백질 A-세파로즈를 20회 세척하여 비특이적으로 결합된 요오드화 단백질을 제거하였다. 비드-대-상등액 방사능 비율이 100의 값에 도달하면, 펠렛을 SDS PAGE 시료

완충액으로 추출하고, 가열하여 끓였다. 냉각시킨 후, 각 추출물의 약 15,000 cpm을 10% 폴리아크릴아미드 겔의 웰에 첨가하였다. 저분자량 사전-염색된 표준(BioRad Inc.)을 별도의 웰에 첨가하고, 분자량 평가를 위해 사용하였다. 전기영동으로 단백질을 분해하고, 겔을 건조시키고, -70°C에서 24시간 동안 X-선 필름 한장에 노출하고; 이어서 그 필름을 현상 및 분석하였다.

#### 4. 2B8 결합의 스캐챠드 분석

스캐챠드 분석을 사용하여 정제된 2B8을 걸보기 친화력에 대해 평가하였다. 요오드비즈의 존재하에  $^{125}\text{I}$ 와 반응시켜 방사선표지 2B8을 제조하였다. 유리 요오드를 제거한 후, 방사선표지 항체를 10,000 SB 세포와 함께 웰 당 5000ng 내지 35ng/웰의 범위인 다양한 농도에서, 이중으로 배양하였다. 세포에 결합하는 항체의 양은  $^{125}\text{I}$ -표지된 2B8의 고유방사능으로부터 계산하였다. 결합/유리 항체의 비율을 결합 항체의 몰농도에 대해 도시하고, X 및 Y 축 절편의 비율로부터 걸보기 친화력 상수를 확인하였다.

#### 5. 2B8-MX-DTPA의 제조

##### a. MX-DTPA의 공급원

일부 임상전 연구들에서, 탄소-14-표지된 1-이소티오시아노토벤질-3-메틸디에틸렌트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)를 건고체로서 제공하고(Dr. Otto Gansow at the National Institute of Health), 빛으로부터 보호된 4°C에서 건조 저장하였다. 킬레이트의 저장액은 Milli-Q 워터에서 제조하고, 방사능을 평가하고, 화합물의 고유방사능을 사용하여 농도를 측정하였다. 저장액은 일반적으로 2-5 mM이었고, 폴리프로필렌 튜브에서 -70°C에서 저장하였다. 다른 연구에서는, MX-DTPA를 물 중에 디소디움 염으로서 코울터 이뮤놀러지로부터 입수하여, -70°C에서 저장하였다.

##### b. 무금속 상태 유지

무금속 시약을 사용하는 것 이외에, 모든 시약은 금속 오염의 가능성을 최소화하도록 취급하였다. 가능하다면, 플라스크, 비이커 및 눈금 있는 실린더와 같은 폴리프로필렌 플라스틱 용기를 사용하였다. 이들은 알코녹스(Alconox)로 세척하고, 사용하기 전에 Milli-Q 워터로 철저히 헹구었다. 또한, 작은 부피를 정확히 다루기 위해 무금속 피펫 팁(BioRad)을 사용하였다. 큰 부피의 시약을 다루기 위해, 플라스틱 혈청학적 피펫(1 내지 25 ml 크기로 사용가능)을 사용하였다. 통상적으로 반응은 나사마개, 폴리프로필렌 마이크로퓨즈 튜브(Sardstedt Industries; 1.5mL 용량) 또는 폴리프로필렌 원뿔형 튜브(Costar; 15 mL 및 50 $\mu\text{l}$ )에서 수행하였다. 투석 튜브류를 다루는 경우, 미리 Milli-Q 워터로 행군 일회용 수술용 장갑을 켰다.

##### c. 항체 제조

주의 항-CD20 항체 2B8는 단백질 A 및 QAE 크로마토그래피를 사용하여 초기에 복수(腹水)로부터 정제하였다. 이후 실험에서, 2B8을 동일한 정제 방법을 사용하여 중공-섬유 생물반응기 상등액으로부터 정제하였다. 중공-섬유-유래 항체를 이제 상업화할 목적으로 실시예 2에 기재된 CHO-유래 항체로 대체하였다.

투석 또는 반복 완충액 교환을 사용하여 150 mM NaCl을 함유하는 pH 8.6인 무금속 50 mM 바이신-NaOH로 옮겨 접합 용 항체를 제조하였다. 일부 연구에서는, 완충액 교환에 센트리콘 30(Centricon 30; Amicon) 스펀 필터(30,000D MWCO)를 사용한 반복 한외여과를 사용하였다. 일반적으로 50-200 $\mu\text{l}$ 의 단백질(10mg/mL)을 필터단위에 첨가하고, 2mL의 바이신 완충액을 첨가하였다. 이 필터를 45분 동안 6,000 rpm의 Soval SS-34 로터에서 4°C에서 원심분리하였다. 남은 부피는 약 50-100 $\mu\text{l}$ 이었다. 이 과정을 동일한 필터로 2회 반복하였다. 잔여물을 폴리프로필렌 1.5 mL 나사마개 튜브로 옮기고, 단백질에 대해 분석하고, 10.0 mg/mL로 희석하고, 접합에 사용할 때까지 4°C에서 저장하였다. 일부 연구에서는, 상기한 것과 동일한 프로토콜을 사용하여 단백질을 150 mM NaCl 및 0.05% 소디움 아자이드를 함유하는 pH 5.5인 50 mM 소디움 시트레이트 속으로 옮겼다.

##### d. 접합 프로토콜

2B8과 MX-DTPA의 접합은 주변 온도에서 폴리프로필렌 튜브 내에서 수행하였다. MX-DTPA의 냉동된 저장액은 사용하기 바로 전에 녹였다. 일반적으로, 10 mg/mL의 항체 50-200 $\mu\text{l}$ 를 킬레이트-대-단백질을 4:1의 몰비로 킬레이트와 반응 시켰다. 반응은 킬레이트 저장액을 첨가하고 부드럽게 혼합하여 시작하고; 접합은 밤새, 일반적으로는 14 내지 20시간 동

안 주변 온도에서 진행하였다. 비반응 킬레이트는 상기한 바와 같이 투석 및 반복 한외여과를 사용하여 접합체로부터 0.05% 소디움 아자이드를 함유하는 무금속 일반 식염수(0.9% w/v)로 읊겼다. 이 단백질 농도를 10 mg/mL로 조절하고, 방사선표지될 때까지 폴리프로필렌 튜브에서 4°C에서 저장하였다.

#### e. 킬레이트 결합 측정

킬레이트 결합은 섬광 계수 및 정제된 접합체를 사용하여 얻은 값을 탄소-[14]-표지된 킬레이트의 고유방사능과 비교하여 측정하였다. 코울터 이뮤놀러지로부터 얻은 비-방사성 킬레이트를 사용한 이후의 연구에서는, 접합체를 공지된 농도 및 고유방사능의  $^{90}\text{Y}$ 의 과량의 방사능 담체 용액과 함께 배양하여 킬레이트 결합을 평가하였다.

요약하면, 공지된 농도의 이트륨 클로라이드의 저장액을 무담체  $^{90}\text{Y}$ (클로라이드염)이 첨가된 무금속 0.05 N HCl에서 제조하였다. 이 용액의 분취량은 액체 섬광 계수로 분석하여 이 시약의 정확한 고유방사능을 측정하였다. 항체에 부착될 것으로 기대되는 킬레이트의 몰수의 3배에 해당하는 이트륨 클로라이드 시약의 부피, 일반적으로는 2 몰/몰 항체를 폴리프로필렌 튜브에 첨가하고, pH는 2 M 소디움 아세테이트를 사용하여 4.0-4.5로 조절하였다. 이어서 접합된 항체를 첨가하고, 이 혼합물을 주변온도에서 15-30분간 배양하였다. 20mM EDTA를 최종 농도 1mM가 되도록 첨가함으로써 반응을 정지시키고, 용액의 pH는 2M 소디움 아세테이트를 사용하여 약 pH 6으로 조절하였다.

5분 배양 후, 전체 부피를 다음과 같은 고성능 크기-배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 용리된 단백질-함유 단편을 결합하고, 단백질 농도를 측정하고, 분취량을 방사능에 대해 평가하였다. 킬레이트 결합은  $^{90}\text{Y}$  클로라이드 제조의 고유방사능 및 단백질 농도를 사용하여 계산하였다.

#### f. 2B8-MX-DTPA의 면역반응성

접합된 2B8의 면역반응성은 전세포 ELISA를 사용하여 평가하였다. 중간-로그상 SB 세포를 원심분리하여 배양액으로부터 수집하고, 1X HBSS로 2회 세척하였다. 세포를 HBSS에 1-2 X  $10^6$  세포/mL로 희석하고, 50,000-100,000 세포/웰로 96-웰 폴리스티렌 마이크로리터 플레이트로 분취하였다. 플레이트를 40-45°C에서 2시간 동안 진공 하에서 건조시켜, 세포를 플라스틱에 고정시켰다. 플레이트를 사용할 때까지 -20°C에서 건조 저장하였다. 분석하기 위해, 플레이트를 사용하기 직전에 주변온도로 가온하고, 그 후, 1% BSA를 함유하는 pH 7.2-7.4인 1X PBS로 차단하였다(2h). 분석하기 위한 시료를 1X PBS/1% BSA에 희석시키고, 플레이트에 적용하고, 동일한 완충액으로 연속으로 희석 시켰다(1:2). 플레이트를 주변 온도에서 1시간 동안 배양한 후, 1X PBS로 3회 세척하였다. 제2차항체(염소 항-마우스 IgG1-특이적 HRP 접합체) ( $50\mu\text{l}$ )를 웰(1X PBS/1% BSA 중의 1:1500 희석액)에 첨가하고, 주변온도에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 1X PBS로 4회 세척한 후, ABTS 기질 용액을 첨가하였다(0.01% ATBS 및 0.001%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 함유하는 pH 4.5인 50 mM 소디움 시트레이트). 플레이트를 15-30분 배양한 후 405 nm에서 읽었다. 항원-음성 HSB 세포는 비-특이적 결합을 검사하기 위한 분석에 포함되었다. 접합체의 면역반응성은 흡수치 대 각각의 희석 인자를 도시하고, 동일한 플레이트 상에서 시험한 음성 항체(100% 면역반응성을 나타냄)를 사용하여 얻은 값과 이를 비교하여 계산하였다. 적정 프로파일의 선형부분에서 여러 값들을 비교하고, 평균값을 결정하였다.

#### g. 최연 2B8 및 2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성

항체 및 접합체 안정성에 대한 12주 평가에서, 2B8 항체 및 2B8-MX-DTPA의 분취량을 일반식염수 또는 pH 6.8인 10 mM 글리신-HCl을 함유하는 일반식염수 중에서 제제화하였다. 두 세트의 시료를 4° 및 30°C에서 배양하고, 시료들을 하기 방법을 사용하여 매주 분석하였다: SDS-PAGE(환원성 및 비환원성), 포획자로서 SB(항원-양성) 또는 HSB(항원-음성)세포를 사용한 전세포 효소 면역분석에 의한 면역반응성, 및 등전 집중 겔 전기영동(pH 범위, 3-10). 또한, 접합체의 방사선 표지 효과를  $^{90}\text{Y}$ 를 가진 접합체를 방사선표지하고, SDS-PAGE 및 방사선사진 분석에 의해 생성물을 분석하여 4, 8, 및 12주에 평가하였다. 최종적으로, 별도의 연구에서, 4° 및 30°C에서 10주 동안 배양한 2B8-MX-DTPA의 분취량을  $^{111}\text{In}$ 으로 방사선표지하고, 상기한 바와 같이 BALB/c 마우스 중의 생체분포 연구에서 평가하였다.

#### h. 면역조직학 연구

IMPATH 실험실은 아세톤으로 고정된 인간 조직의 단편을 사용하여 천연 및 접합(2B8-MX-DTPA) 항체로 면역조직학 연구를 수행하였다. 단백질 A 및 Q 세파로즈 상에서 크로마토그래피하여 중공섬유 생물반응기 상등액으로부터 항체를 정제하였다. 상기 프로토콜에 따라 코울터 이뮤놀러지로부터 MX-DTPA를 사용하여 임상-등급의 접합체를 제조하였다.

### i. 방사선표지 2B8-MX-DTPA의 시험관내 면역반응성

일부 실험에서, 비표지된 2B8-MX-DTPA에 사용된 전세포 ELISA 프로토콜을 사용하였다. 이후의 실험에서는, 린드모(Lindmo)가 기술한 변형된 전세포 결합 분석을 사용하여  $^{111}\text{In}$  및  $^{90}\text{Y}$ -표지된 접합체(각각 IDEC Pharmaceuticals 또는, 이와 달리, MPI Pharmacy Services사에서 제조)의 면역반응성을 측정하였다(3). 요약하면, 중간-로그상의 농도를 증가시키면서 항원-양성 SB 세포 또는 항원-음성 HSB 세포[희석 완충액(1% BSA, 0.1% 젤라틴, 및 0.02% 소디움 아자이드를 포함하는 pH 7.4인 PBS) 중의  $20\text{--}30 \times 10^6$  세포/mL]를 두 세트의 투브에 첨가하였다. 희석 완충액을 사용하여 방사선표지 접합체를 1-5 ng/mL의 최종 항체 농도로 희석시키고, 0.35 mL를 각각의 투브에 첨가하였다. 주변온도에서 75-90분 배양한 후, 세포들을 원심분리하여 펠렛화하고, 상동액을 수집하였다. 상동액 분획에 잔존하는 방사능을 감마 또는 섬광 계수기로 측정하였다. 데이터를 첨가된 총 방사능을 세포-관련 방사능으로 나눈 몫 대 투브 당 세포수의 역수로 도시하였다. 따라서, y축 절편은 면역반응 비율을 나타낸다.

### j. 인간 혈청 중에서 방사선표지 2B8-MX-DTPA의

#### 시험관내 안정성

$^{111}\text{In}$ - 및  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성은 37°C에서 96시간 동안 인간 혈청 중에서 배양하여 평가하였다. 상기한 바와 같이 접합된 항체를 제조하고,  $^{111}\text{In}$ ("믹스-&-슈트" 프로토콜) 또는  $^{90}\text{Y}$ 로 방사선표지하였다.  $^{111}\text{In}$  및  $^{90}\text{Y}$ -표지된 접합체의 고유방사능은 각각 2.5 및 14.6 mCi/mg이었고; 방사선표지 접합체는 75 mg/ml 인간 혈청 알부민(HSA) 및 1 mM DTPA(이트륨-표지된 접합체)를 함유하는 완충액 또는 50 mg/mL HSA(인듐-표지된 접합체)를 함유하는 완충액 중에 혼탁하였다. 방사선표지 접합체는 정상 인간 혈청(열불활성화되지 않은 것)을 사용하여 1:10으로 희석시키고, 분취량을 무균적으로 멀균 마개로 닫힌 투브에 넣고; 그리고 나서, 이 투브를 96시간 이하 동안 37°C에서 배양하였다. 선택 시점에서, 접합체 시료를 꺼내어, 4-20% 구배 겔 중에서 비-환원성 SDS-PAGE로 분석하고, 방사선사진 및 즉시 박막 크로마토그래피하였다.

### k. 임상적으로 제제화된 $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성

2B8-MX-DTPA 접합체를  $^{111}\text{In}$ 으로 방사선표지하고, HPLC 정제 없이 사용하였다("믹스-&-슈트" 프로토콜). 방사선표지 항체를 PBS로 희석하고, 인간 혈청 알부민(HSA)을 최종 농도가 50 mg/mL가 되도록 첨가하였다. 제제화된 방사선표지 접합체의 고유방사능은 2.2 mCi/mg이었다. 이어서 제제화된 접합체를 4°C에서 48시간 동안 배양하고, 4-20% 구배 겔에서 비-환원성 SDS-PAGE를 사용하여 0, 24시간 및 48시간에 분취량을 분석하고, 방사선사진 및 즉시 박막 크로마토그래피하였다. 상기 섹션 1에 기재된 전세포 혼탁액을 사용하여 각 시점에서 면역반응성을 평가하였다.

### l. 임상적으로 제제화된 $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성

2B8-MX-DTPA 접합체를  $^{90}\text{Y}$ 로 방사선표지하고, 용리 완충액으로서 1X PBS를 사용하여 HPLC 상에서 크기-배제 크로마토그래피로 정제하였다. 방사선표지 접합체 단편을 담고(pooled), 인간 혈청 알부민 및 DTPA를 최종 농도가 각각 75 mg/mL 및 1 mM가 되도록 첨가하였다. 제제화된 방사선표지 접합체의 고유방사능은 14.6 mCi/mg이었다. 이어서 제제화된 접합체를 4°C에서 48시간 동안 배양하고, 4-20% 구배 겔에서 비-환원성 SDS-PAGE를 사용하여 0, 24시간 및 48시간에 분취량을 분석하고, 방사선사진 및 즉시 박막 크로마토그래피하였다. 상기 섹션 1에 기재된 전세포 혼탁액 분석을 사용하여 각 시점에서 면역반응성을 평가하였다.

### 2. 동물 연구

#### a. 2B8을 사용한 유인원 고투여 약리학/독성학 연구.

화이트 샌드 리서치 센터(White Sands Research Center)(연구번호 920111)에서 GLP 규제 하에서 행해진 고투여 약리학 연구에서 항체 2B8을 평가하였다. 성인 마카카 다발꼴(Macaca fascicularis)(게잡이) 원숭이를 사용하였다; 연구 그룹

은 각각 암컷 한마리와 수컷 한마리로 구성되었다. 항체를 48시간마다 정맥내 주사하여 총 7회 주입하였다. 이 연구는 5 그룹으로 구성되었다: 그룹 I(식염수); 그룹 II(0.6 mg/kg); 그룹 III(2.5 mg/kg); 그룹 IV(10 mg/kg); 및 그룹 V(0일에만 10 mg/kg).

연구를 시작하기 전에, 모든 10마리 동물에게서 혈액을 채취하여, 시약 배경 및 초기 B 세포 수를 결정하는데 사용하였다. 이후의 모든 혈액 시료는 각 항체를 주입하기 전에 채취하였다. 그룹 III 및 IV는 완전 검시 및 조직병리학을 위해 13일째에 치사시켰다.

그룹 I, II 및 V의 동물들은 0, 1, 3, 7, 13, 21, 37 및 52일째에 전혈을 채취하였다. 약 5 mL의 전혈을 해파린화된 투브에 넣었다. 전혈을 4°C에서 유지하고, 24시간 내에 분석하였다. 각 동물들로부터 얻은 혈액을 2000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하고, 상등액 혈장을 제거하여 RIA(특이적 분석법에 대한 RIA 과정 참조)에 의해 혈청 2B8 수준을 분석하였다. PBLs 및 RBCs를 함유하는 펠렛화된 물질을 FCS에 재현탁하여 FACS 분석하였다.

#### b. 2B8 및 2B8-MX-DTPA로 약물 생체 반응 연구

(상기) 그룹 V의 동물을 사용하여 계집이 원숭이에서 2B8의 평균 혈청 베타 반감기를 측정하였다. 염소 항-마우스 IgG1 (Fisher Scientific)을 pH 9.6인 10 mM 보레이트 완충액에서 ml 당 2.0 $\mu$ g으로 희석시키고, 50 $\mu$ l를 96-웰 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 4°C에서 밤새, 또는 주변온도에서 2시간 동안 배양하는 동안 항체가 플레이트와 결합하도록 하였다. 각 플레이트를 주변온도에서 30분 동안 웰 당 1% BSA를 함유하는 PBS 150 $\mu$ l으로 차단하였다. 플레이트를 증류수로 세척하고, 혈청 또는 혈장 시료를 초기에는 1:100 희석, 이어서 1:2 일련희석으로 개별 웰에 삼중으로 적용하였다. 사전 채취한 혈청에 정제된 2B8을 첨가하고, 0.5 mg/mL로 시작하는 표준 곡선으로 사용하기 위해 희석하고; 시료를 1:100으로 희석한 후, 연속으로 다른 시료와 같이 희석하였다. 이 플레이트를 주변 온도에서 1시간 동안 배양하고, 증류수로 4회 세척하였다. 그리고 나서, 제2시약(염소 항-마우스 IgG1-HRPO)을 1:4000 희석으로 첨가하고, 주변 온도에서 1시간 더 배양하였다. 이 플레이트를 다시 증류수로 세척하고, 과산화수소를 함유하는 퍼옥시다아제 기질 0.1 mL을 첨가하였다. 20분간의 반응에서 색이 나타나도록 하고; 이어서 마이크로플레이트 ELISA 판독기를 사용하여 405 nm에서 흡수도를 측정하였다. 그 결과를 혈청 mL 당  $\mu$ g C 체로 도시하였다.

또한, 2B8 및 2B8-MX-DTPA의  $\beta t_{\frac{1}{2}}$ 값은 BALB/c 마우스에서 측정하였다. 1X PBS, pH 7.4/10% 글리세롤 중에 -70°C에서 저장된 비접합 2B8을 녹이고, 0.5 mg/mL로 희석시키고, 멸균 여과하였다. 표준 프로토콜에 따르되 탄소-[14]-표지된 킬레이트를 사용하여 접합된 항체를 제조하였고; 킬레이트 결합은 1.5 몰/몰 항체이었다. 정제된 접합체를 일반식염수(0.9%)에 0.5 mg/mL로 희석시키고, 멸균 여과하고, 사용될 때까지 천연 항체와 함께 4°C에서 저장하였다.

6 내지 8주령 마우스에게 250  $\mu$ g/mL의 농도에서 정제된 2B8 항체 100 $\mu$ l를 주입하였다. 이어서 마우스를 0 내지 264시간 범위의 다양한 시점에서 레트로-오비탈 천자로 혈액을 채취하고, 이들의 혈청을 포획자로서 항원-양성 B-세포주 SB를 사용하여 전세포 효소 면역분석으로 천연 및 접합된 2B8 항체의 존재에 대해 분석하였다. 결과 데이터를 2B8 또는 2B8-MX-DTPA의 농도 대 시간으로 도시하고; 이 결과로부터 선형 회귀 도시하고, 기울기를 사용하여  $\beta t_{\frac{1}{2}}$ 값을 결정하였다.

#### c. 계집이 원숭이에서 [89]-Y-2B8-MX-DTPA의 약리학/독성학.

HPLC 정제를 사용하지 않은 것을 제외하고는 <sup>90</sup>Y의 삽입에 대해 기재한 프로토콜을 사용하여 이트륨-[89]-함유 2B8-MX-DTPA를 제조하였다. 75 mg/mL HSA 및 1 mM DTPA를 함유하는 1X PBS 중에서 비-방사능, 금속-함유 접합체를 제제화하고, 화이트 샌드 리서치 센터의 GLP 연구 번호 920611에서 평가하였다. 각 네 그룹에는 암컷 한마리 및 수컷 한마리의 원숭이가 포함되었다. 이 동물들에게 다음과 같은 양의 약제를 48시간마다 정맥내 주사하여 총 7회 주입하였다: 그룹 I(식염수); 그룹 II(0.003 mg/kg); 그룹 III(0.03 mg/kg); 및 그룹 IV(0.3 mg/kg). 연구하는 동안 체중 및 체온, 음식 및 물 섭취, 배설, 혈청 화학, 혈액학, 소변 검사, 및 신체검사를 측정하여 동물들을 평가하였다. 주입하기 전에 0, 2, 7, 10 및 14일째에 그룹 I 내지 IV의 동물들의 혈액을 채취하고, FACS 분석으로 그 혈액의 순환 B-세포 수준을 분석하였다.

#### d. 방사선표지 2B8-MX-DTPA의 생체분포

예비 연구에서, <sup>111</sup>In-표지된 2B8-MX-DTPA를 6-8주령 BALB/c 마우스에서 조직 생체분포에 대해 평가하였다. 상기 "믹스-&-슈트" 프로토콜에 이어 임상-등급 2B8-MX-DTPA를 사용하여 방사선표지 접합체를 제조하였다. 접합체의 고유

방사능은 2.3 mCi/mg이었고, 접합체는 50 mg/mL HSA를 함유하는 pH 7.4인 PBS에서 제제화하였다. 마우스에게 100 $\mu$ l의  $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA(약 21  $\mu\text{Ci}$ )를 정맥내 주사하고, 세마리로 된 그룹을 0, 24, 48 및 72 시간에 경부탈구로 치사시켰다. 치사시킨 후, 꼬리, 심장, 폐, 간, 신장, 비장, 근육 및 대퇴부를 꺼내어, 세척하고, 무게를 채고; 혈액 시료 하나를 꺼내어 분석하였다. 감마 계수를 사용하여 각 표본과 관련된 방사능을 측정하고, 이어서 조직 g 당 %주입투여량을 측정하였다. 개별 기관과 관련된 혈액에 의해 나타난 활성 분포를 감소시키는 시도는 없었다.

별도의 프로토콜에서, 4° 및 30°C에서 10주 동안 배양된 2B8-MX-DTPA의 분취량을 두 제조에 대해 2.1 mCi/mg의 고유 방사능으로  $^{111}\text{In}$ 으로 방사선표지하였다. 그리고 나서, 이들 접합체는 상기와 같이 마우스에서 생체분포 연구에 사용하였다.

방사 선량 측정을 위해, 2B8-MX-DTPA를 2.3 mCi/mg의 고유방사능으로  $^{111}\text{In}$ 으로 방사선표지하고, 약 1.1  $\mu\text{Ci}$ 를 각각의 20마리의 BALB/c 마우스에 주입하였다. 이어서, 다섯마리의 마우스로 된 그룹을 1, 24, 48 및 72 시간에 치사시키고, 이들의 기관을 꺼내고 준비하여 분석하였다. 또한, 피부, 근육 및 뼈의 일부를 꺼내고, 처리하여 분석하고; 소변 및 대변도 모아서 24-72 시간의 시점 동안 분석하였다.

유사한 방법을 사용하여, 2B8-MX-DTPA를 또한  $^{90}\text{Y}$ 로 방사선표지하고, 이의 생물학적 분포를 BALB/c 마우스에서 72 시간에 걸쳐 평가하였다. HPLC 크기 배제 크로마토그래피로 정제한 후, 각각 다섯마리의 마우스로 구성된 네 그룹을 약 1  $\mu\text{Ci}$ 의 임상적으로-제제화된 접합체(고유방사능: 12.2 mCi/mg)를 사용하여 정맥내 주사하고; 이어서 그룹들을 1, 24, 48 및 72 시간에 치사시키고, 이들의 기관 및 조직을 상기와 같이 분석하였다. 감마 섬광 계수기를 사용하여 제동복사 에너지를 측정하여 각 조직 표본과 관련된 방사능을 측정하였다. 이어서, 조직 g 당 %주입투여량 또는 기관 당 %주입투여량으로 방사능값을 나타내었다. 기관 및 다른 조직을 반복적으로 헹구어 표면의 혈액을 제거하였지만, 기관은 관류시키지 않았다. 따라서, 기관 방사능값은 내부 관련 혈액으로 나타낸 방사능 분포에 대해 감소되지 않았다.

#### e. $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 종양 위치

라모스 B-세포 종양을 가진 무흉선 마우스에서 방사선표지 2B8-MX-DTPA의 위치를 확인하였다. 무흉선 마우스에서 성장하도록 적응된  $1.2 \times 10^7$  라모스 종양 세포를 함유하는 RPMI-1640 0.1mL를 6-8주령 무흉선 마우스에 피하(왼쪽 뒤 대퇴부) 주사하였다. 종양은 2주 내에 발생하여, 0.07 내지 1.1 g의 중량이 되었다. 마우스에 100  $\mu\text{l}$ 의  $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA(16.7  $\mu\text{Ci}$ )를 정맥내 주사하고, 세마리 마우스로 된 그룹을 0, 24, 48 및 72 시간에 경부탈구로 치사시켰다. 치사시킨 후, 꼬리, 심장, 폐, 간, 신장, 비장, 근육, 대퇴부, 및 종양을 꺼내고, 세척하고, 중량을 채고; 혈액 시료도 꺼내어 분석하였다. 감마 계수를 사용하여 각각의 표본과 관련된 방사능을 측정하고, 조직 g 당 %주입투여량을 측정하였다.

### 3. 방사 선량 계산

$^{111}\text{In}$  또는  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA(표 1-4 및 5-8)중 하나를 주입한 BALB/c 마우스를 사용하여 얻은 생체분포 데이터를 사용하여, 핵의학회의 MIRD(Medical Internal Radiation Dose) 위원회에 의해 채택된 방법을 사용하여 70Kg 환자에게 투여한 1.0 mCi 투여량으로부터 흡수된 방사선투여량의 평가를 계산하였다. 방사선표지 접합체의 생물학적 반감기는 각각의 방사선면역접합체에 대한 생체분포 데이터로부터 측정한 기관 당 주입 투여량의 값으로부터 결정하였다. 혈액과 같은 일부 조직에서, 방사선접합체의 생물학적 붕괴는 두-구획 모델의 이들 구획으로부터의 지수적 붕괴로 이어지는 것으로 생각되었다. 활성 수준이 72시간 생체분포 연구 전체에서 거의 일정하게 유지되는 간과 같은 다른 조직에서는, 생물학적 반감기는 매우 길고, 1000시간으로 정해지는 것으로 생각되었다.

## [표 1]

<sup>111</sup>In-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

1.0시간 후 방사능 분포

평균치 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	<b>1.47 ± 0.17</b>	<b>40.3 ± 5.32</b>	<b>58.4 ± 3.1</b>
심장	<b>0.087 ± 0.01</b>	<b>5.88 ± 0.76</b>	<b>0.51 ± 0.05</b>
폐(2)	<b>0.149 ± 0.01</b>	<b>14.2 ± 1.4</b>	<b>2.10 ± 0.17</b>
신장(1)	<b>0.127 ± 0.02</b>	<b>9.82 ± 0.86</b>	<b>1.22 ± 0.12</b>
간	<b>1.06 ± 0.20</b>	<b>10.32 ± 1.58</b>	<b>10.76 ± 1.93</b>
비장	<b>0.090 ± 0.01</b>	<b>6.94 ± 1.17</b>	<b>0.61 ± 0.03</b>
근육	<b>8.39 ± 0.98</b>	<b>0.70 ± 0.25</b>	<b>5.67 ± 1.35</b>
뼈	<b>3.15 ± 0.35</b>	<b>2.97 ± 0.71</b>	<b>9.10 ± 1.09</b>
피부	<b>3.15 ± 0.35</b>	<b>0.96 ± 0.29</b>	<b>3.0 ± 1.12</b>
GI관	<b>2.58 ± 0.31</b>	<b>6.10 ± 2.00</b>	<b>7.80 ± 1.80</b>
소변			—
대변			—
		<b>총</b>	<b>99.04 ± 4.8</b>

마우스 수 = 5

평균 중량 = 20.97 ± 2.46 그램

**[표 2]**

<sup>111</sup>In-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

24시간 후 방사능 분포

평균치 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	<b>1.47 ± 0.07</b>	<b>21.97 ± 1.87</b>	<b>32.22 ± 1.35</b>
심장	<b>0.128 ± 0.03</b>	<b>4.02 ± 0.23</b>	<b>0.38 ± 0.01</b>
폐(2)	<b>0.152 ± 0.02</b>	<b>7.90 ± 1.61</b>	<b>1.20 ± 0.18</b>
신장(1)	<b>0.128 ± 0.01</b>	<b>5.94 ± 0.40</b>	<b>0.76 ± 0.04</b>
간	<b>1.11 ± 0.10</b>	<b>10.08 ± 1.83</b>	<b>11.20 ± 2.23</b>
비장	<b>0.082 ± 0.01</b>	<b>5.04 ± 0.75</b>	<b>0.40 ± 0.02</b>
근육	<b>8.41 ± 0.38</b>	<b>1.24 ± 0.05</b>	<b>10.44 ± 0.76</b>
뼈	<b>3.15 ± 0.14</b>	<b>2.02 ± 0.33</b>	<b>6.31 ± 0.81</b>
피부	<b>3.15 ± 0.14</b>	<b>3.75 ± 0.39</b>	<b>11.77 ± 1.09</b>
G이관	<b>2.91 ± 0.27</b>	<b>4.50 ± 0.52</b>	<b>6.65 ± 0.56</b>
소변			<b>0.98</b>
대변			<b>2.54</b>
		<b>총</b>	<b>87.10 ± 1.68</b>

마우스 수 = 5

평균 중량 = 21.03 ± 0.94 그램

**[표 3]**

<sup>111</sup>In-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 경맥주사하고

48시간 후 방사능 분포

평균치 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	<b>1.45 ± 0.13</b>	<b>22.41 ± 3.95</b>	<b>31.90 ± 2.89</b>
심장	<b>0.090 ± 0.01</b>	<b>4.05 ± 0.94</b>	<b>0.36 ± 0.06</b>
폐(2)	<b>0.155 ± 0.02</b>	<b>8.45 ± 0.53</b>	<b>1.31 ± 0.19</b>
신장(1)	<b>0.125 ± 0.01</b>	<b>6.16 ± 1.15</b>	<b>0.76 ± 0.07</b>
간	<b>1.040 ± 0.11</b>	<b>9.41 ± 2.33</b>	<b>9.84 ± 3.18</b>
비장	<b>0.082 ± 0.01</b>	<b>5.32 ± 0.71</b>	<b>0.48 ± 0.11</b>
근육	<b>8.26 ± 0.77</b>	<b>1.42 ± 0.58</b>	<b>11.62 ± 4.67</b>
뼈	<b>3.10 ± 0.29</b>	<b>2.08 ± 0.16</b>	<b>6.41 ± 0.44</b>
피부	<b>3.10 ± 0.29</b>	<b>3.43 ± 0.59</b>	<b>10.54 ± 1.69</b>
GI관	<b>2.96 ± 0.20</b>	<b>5.05 ± 0.63</b>	<b>7.46 ± 0.60</b>
소변			<b>1.46</b>
대변			<b>6.41</b>
		<b>총</b>	<b>88.49 ± 6.87</b>

마우스 수 = 5

평균 중량 = 20.65 ± 1.93 그램

## [표 4]

<sup>111</sup>In-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

72시간 후 방사능 분포

평균치 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	<b>1.52 ± 0.06</b>	<b>18.97 ± 1.31</b>	<b>28.51 ± 2.03</b>
심장	<b>0.094 ± 0.01</b>	<b>3.71 ± 0.31</b>	<b>0.35 ± 0.04</b>
폐(2)	<b>0.161 ± 0.01</b>	<b>7.60 ± 0.30</b>	<b>1.18 ± 0.09</b>
신장(1)	<b>0.135 ± 0.01</b>	<b>5.55 ± 0.53</b>	<b>0.76 ± 0.09</b>
간	<b>1.11 ± 0.11</b>	<b>9.90 ± 1.77</b>	<b>11.00 ± 2.03</b>
비장	<b>0.095 ± 0.01</b>	<b>5.12 ± 0.75</b>	<b>0.48 ± 0.04</b>
근육	<b>8.58 ± 0.34</b>	<b>1.04 ± 0.09</b>	<b>8.95 ± 0.68</b>
뼈	<b>3.22 ± 0.12</b>	<b>1.73 ± 0.34</b>	<b>6.04 ± 0.51</b>
피부	<b>3.22 ± 0.12</b>	<b>3.16 ± 0.60</b>	<b>10.19 ± 2.03</b>
GI관	<b>2.79 ± 0.19</b>	<b>4.53 ± 0.83</b>	<b>6.37 ± 1.38</b>
소변			<b>2.49</b>
대변			<b>11.50</b>
		<b>총</b>	<b>87.80 ± 4.79</b>

마우스 수 = 5

평균 중량 = 21.46 ± 0.84 그램

## [표 5]

<sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

1.0시간 후 방사능 분포

평균치 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	1.27 ± 0.06	39.23 ± 2.45	49.77 ± 1.72
심장	0.086 ± 0.01	5.80 ± 0.84	0.50 ± 0.09
폐(2)	0.137 ± 0.01	12.11 ± 1.08	1.66 ± 0.17
신장(1)	0.120 ± 0.01	10.23 ± 1.30	1.15 ± 0.12
간	0.921 ± 0.05	12.12 ± 1.72	11.17 ± 1.66
비장	0.080 ± 0.01	9.27 ± 0.46	0.74 ± 0.07
근육	7.27 ± 0.32	0.78 ± 0.13	5.72 ± 1.05
뼈	2.73 ± 0.12	4.35 ± 0.39	11.89 ± 1.47
피부	2.73 ± 0.12	2.12 ± 0.78	5.82 ± 2.24
GI관	2.22 ± 0.06	3.52 ± 1.12	4.22 ± 0.84
소변	—	—	—
대변	—	—	—
총			94.85 ± 3.47

마우스 수 = 5

평균 중량 = 18.17 그램 ± 0.81 그램

## [표 6]

<sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

24시간 후 방사능 분포

평균치 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	1.517 ± 0.090	8.35 ± 2.547	12.83 ± 4.60
심장	0.092 ± 0.005	2.63 ± 0.142	0.240 ± 0.006
폐	0.141 ± 0.005	4.56 ± 0.393	0.644 ± 0.047
신장	0.138 ± 0.007	5.63 ± 0.222	0.779 ± 0.040
간	0.438 ± 0.098	5.22 ± 0.335	2.259 ± 0.399
비장	0.081 ± 0.003	4.23 ± 0.180	0.345 ± 0.011
근육	8.668 ± 0.514	0.976 ± 0.164	8.55 ± 1.945
뼈	3.246 ± 0.186	1.326 ± 0.102	4.289 ± 0.154

마우스 수 = 3

평균 중량 = 21.671 ± 1.11 그램

## [표 7]

<sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

48시간 후 방사능 분포

평균치 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	<b>1.33 ± 0.06</b>	<b>17.34 ± 2.0</b>	<b>23.03 ± 1.95</b>
심장	<b>0.088 ± 0.01</b>	<b>3.56 ± 0.31</b>	<b>0.31 ± 0.04</b>
폐(2)	<b>0.139 ± 0.01</b>	<b>7.54 ± 0.88</b>	<b>1.05 ± 0.15</b>
신장(1)	<b>0.122 ± 0.01</b>	<b>6.53 ± 0.42</b>	<b>0.79 ± 0.01</b>
간	<b>0.968 ± 0.04</b>	<b>9.05 ± 1.70</b>	<b>8.92 ± 1.57</b>
비장	<b>0.087 ± 0.01</b>	<b>6.52 ± 1.13</b>	<b>0.57 ± 0.07</b>
근육	<b>7.26 ± 0.36</b>	<b>1.05 ± 0.18</b>	<b>8.01 ± 1.17</b>
뼈	<b>2.86 ± 0.14</b>	<b>3.34 ± 0.42</b>	<b>9.53 ± 1.08</b>
피부	<b>2.86 ± 0.14</b>	<b>4.13 ± 0.76</b>	<b>11.75 ± 1.82</b>
GI관	<b>2.84 ± 0.19</b>	<b>2.74 ± 0.34</b>	<b>3.80 ± 0.30</b>
소변	—	—	<b>4.29</b>
대변	—	—	<b>7.67</b>
		<b>총</b>	<b>79.72 ± 3.23</b>

마우스 수 = 5

평균 중량 = 19.07 ± 0.91 그램

**[표 8]**

<sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

72시간 후 방사능 분포

평균치 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	<b>1.35 ± 0.02</b>	<b>15.40 ± 1.63</b>	<b>20.71 ± 2.13</b>
심장	<b>0.088 ± 0.01</b>	<b>3.12 ± 0.24</b>	<b>0.28 ± 0.01</b>
폐(2)	<b>0.142 ± 0.01</b>	<b>8.23 ± 1.05</b>	<b>1.17 ± 0.20</b>
신장(1)	<b>0.123 ± 0.01</b>	<b>6.45 ± 0.57</b>	<b>0.79 ± 0.07</b>
간	<b>0.02 ± 0.06</b>	<b>8.39 ± 1.04</b>	<b>8.58 ± 1.31</b>
비장	<b>0.103 ± 0.01</b>	<b>5.90 ± 1.19</b>	<b>0.59 ± 0.08</b>
근육	<b>7.68 ± 0.11</b>	<b>1.01 ± 0.15</b>	<b>7.73 ± 1.05</b>
뼈	<b>2.88 ± 0.05</b>	<b>3.20 ± 0.25</b>	<b>9.20 ± 0.61</b>
피부	<b>2.88 ± 0.05</b>	<b>3.97 ± 0.49</b>	<b>11.42 ± 1.36</b>
GI관	<b>2.86 ± 0.18</b>	<b>2.90 ± 0.65</b>	<b>4.06 ± 0.93</b>
소변	—	—	<b>3.00</b>
대변	—	—	<b>11.08</b>
		<b>총</b>	<b>78.62 ± 2.63</b>

마우스 수 = 5

평균 중량 = 19.21 ± 0.27 그램

유사한 방법으로 지수적 붕괴에 대한  $t_{1/2}$  을 계산하기 위해 표준식을 사용하여 다른 생물학적 반감기 수치를 할당 및 계산하였다. 일단 이들 값이 결정되면, 표 9 및 10에 나열된  $T_{ue}$ ,  $T_{e1}$ ,  $T_{e2}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$  및 A에 대한 변수를 이 표의 위에 제공된 식을 사용하여 각각의 방사선표지 접합체에 대하여 결정하였다(출력 변수). 이 값들은 이어지는 표에 나타낸 것과 마찬가지로, 필립 하간(Mr. Phillip Hagan, MS, Nuclear Medicine Service, VA Medical Center, La Jolla, CA 92161)에 의한 심포니 스프레드시트(Lotus Development Corp.)에 기록된 프로그램을 사용하여 계산하였다.

[표 9a]

입력 변수  
 $A_0 = \text{투여된 투여량}$   
 $T_p = \text{방사성 핵증의 물리적 반감기}$   
 $T_u = \text{생물학적 흡수 반감기}$   
 $Tb1 = \text{제1성분의 생물학적 소멸 반감기}$   
 $Tb2 = \text{제2성분의 생물학적 소멸 반감기}$   
 $f1 = Tb1의 생물학적 반감기에 대한 A0의 분율}$   
 $f2 = Tb2의 생물학적 반감기에 대한 A0의 분율$   
 $S = \frac{f1}{f2} - \text{투여량/단위 축적된 방사능}$

출력 변수  
 $Tue = \text{유효 흡수 반감기}$   
 $Tel = \text{제1성분의 유효 소멸 반감기}$   
 $Tel = \text{제2성분의 유효 소멸 반감기}$   
 $A1 = \text{제1성분의 축적된 방사능}$   
 $A2 = \text{제2성분의 축적된 방사능}$   
 $A = \text{총 축적된 방사능}$   
 $Tue = Tu^*Tp/(Tu+Tp) A1-1.44^*f1^*A0^*Tel^* (Tue/Tu)$   
 $Tel = Tb1^*Tp/(Tb1+Tp) A2-1.44^*f2^*A0^*Te2$   
 $Te2 = Tb2^*Tp/(Tb2+Tp) A-A1+A2$

실시 예: 간에 대한  $A1 = 1.44^*11.000\%*1000^*63.2^*1.00 = 10007.5$  마이크로카리 축적된 방사능

축적된 방사능 (A)을 평가하기 위해 사용된 입력 및 출력 변수의 표

	Tu (hr)	f1	$\alpha$	Tb1 (hr)	Tb2 (hr)	Tue (hr)	Tel (hr)	Te2 (hr)	A1 (uCi·hr)	A2 (uCi·hr)	A (uCi·hr)
부신 부-교 합량	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
위 합량	2.78E-04	1.000%	0.00%	4	0	2.78E-04	3.8	0.0	54.4	0.0	54
SM.INT. 합량	2.78E-04	6.650%	0.00%	1.5	0	2.78E-04	1.5	0.0	140.5	0.0	141
ULL_ 합량	2.78E-04	6.650%	0.00%	3.5	0	2.78E-04	3.3	0.0	318.6	0.0	319
ULL_ 합량	2.78E-04	6.650%	0.00%	4.5	0	2.78E-04	4.2	0.0	404.0	0.0	404
신장 간	2.78E-04	1.220%	0.00%	35	0	2.78E-04	23.0	0.0	404.8	0.0	405
폐	2.78E-04	2.100%	1.20%	30	1000	2.78E-04	20.8	63.2	10007.5	0.0	10008
다른 조직 (전체)	2.78E-04	0.000%							627.9	1091.7	1720

[표 9b]

	Tu (hr)	r	D	Tb1 (hr)	Tb2 (hr)	Tue (hr)	Tel (hr)	Te2 (hr)	Al (uCi-hr)	A2 (uCi-hr)	A (uCi-hr)
근육	2.78E-04	10.400%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	9461.7	0.0	9462
지방	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
혈액	2.78E-04	58.400%	32.22%	15	1000	2.78E-04	12.3	63.2	10319.2	29313.1	39632
노	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
심장	2.78E-04	0.510%	0.38%	57	1000	2.78E-04	30.9	63.2	226.9	345.7	573
나수	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
췌장	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
골격(전체)	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
피질글	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
소주글	2.78E-04	9.100%	6.30%	45	1000	2.78E-04	63.2	0.0	3536.8	5731.6	9268
글수(레드)	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
글수(옐로우)	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
연골	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
다른 성분	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
피부	2.78E-04	11.770%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	10708.1	0.0	10708
비장	2.78E-04	0.610%	0.40%	39	1000	2.78E-04	24.7	63.2	217.1	363.9	581
정소	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
감상선	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	63.2	0.0	0.0	0.0	0
진신	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000							

[표 10a]

입력 변수  
 $A_0$  = 투여된 투여량  
 $T_p$  = 방사성 핵종의 물리적 반감기  
 $T_u$  = 생물학적 흡수 반감기  
 $T_{b1}$  = 제1성분의 생물학적 소멸 반감기  
 $T_{b2}$  = 제2성분의 생물학적 소멸 반감기  
 $f_1$  =  $T_{b1}$ 의 생물학적 반감기에 대한  $A_0$ 의 분율  
 $f_2$  =  $T_{b2}$ 의 생물학적 반감기에 대한  $A_0$ 의 분율  
 $S$  = 평균 투여량/단위 축적된 방사능

출력 변수  
 $T_{ue} = \frac{S}{f_1 + f_2}$  흡수 반감기  
 $T_{el}$  = 제2성분의 유효 소멸 반감기  
 $A_1$  = 제1성분의 축적된 방사능  
 $A_2$  = 제2성분의 축적된 방사능  
 $A$  = 총 축적된 방사능  
 $T_{ue} = T_u^* T_p / (T_u + T_p)$   $A_1 = 1.44^{*} f_1 A_0^{*} T_{el} / (T_{ue}/T_u)$   
 $T_{el} = T_{b1} T_p / (T_{b1} + T_p)$   $A_2 = 1.44 f_2 A_0 T_{el}$   
 $T_{el} = T_{b2} T_p / (T_{b2} + T_p)$   $A = A_1 + A_2$

실시 예: 간에 대한  $A_1 = 1.44^{*} 9.000\% * 1000 * 60 / 2^{*} 1.00 = 7795.5$  마이크로库里 축적된 방사능  
 축적된 방사능 ( $A$ )을 평가하기 위해 사용된 입력 및 출력 변수의 표

	$T_u$ (hr)	$f_1$	$f_2$	$T_{b1}$ (hr)	$T_{b2}$ (hr)	$T_{ue}$ (hr)	$T_{el}$ (hr)	$T_{e2}$ (hr)	$A_1$ ( $\mu$ Cl·hr)	$A_2$ ( $\mu$ Cl·hr)	$A$ ( $\mu$ Cl·hr)
부신	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0
방광합령	2.78E-04	1.000%	0.00%	4	0	2.78E-04	3.8	0.0	54.2	0.0	54
위합령	2.78E-04	4.220%	0.00%	1.5	0	2.78E-04	1.5	0.0	89.1	0.0	89
SMINT. 합령	2.78E-04	4.220%	0.00%	3.5	0	2.78E-04	3.3	0.0	201.7	0.0	202
ULI_합령	2.78E-04	4.220%	0.00%	4.5	0	2.78E-04	4.2	0.0	255.5	0.0	255
LLI_합령	2.78E-04	4.220%	0.00%	4.2	0	2.78E-04	3.9	0.0	239.5	0.0	240
신장	2.78E-04	1.150%	0.87%	70	1000	2.78E-04	33.4	60.2	553.6	753.6	1307
간	2.78E-04	9.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	7795.5	0.0	7795
폐	2.78E-04	1.200%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	1039.4	0.0	1039
다른 조직(전체)	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	7552.9	0.0	7553
근육	2.78E-04	8.720%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0
지방	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0
혈액	2.78E-04	25.90%	49.770%	13	1000	2.78E-04	10.8	60.2	7743.9	22433.7	30178

[豆 10b]

	Tu (hr)	t1	t2	Tb1 (hr)	Tb2 (hr)	Tue (hr)	Tel (hr)	Te2 (hr)	Al (uCi-hr)	A2 (uCi-hr)	A (uCi-hr)
노 심장	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	51	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0.0
나 소 체 장	2.78E-04	0.500%	0.36%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	204.4	311.8	516.0
금 속 (전 체)	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0.0
피 질 글 수 (레 드)	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0.0
골 수 (옐 로 우)	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0.0
연 골	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0.0
다 른 성 분	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0.0
피 부	2.78E-04	15.600%	9.38%	67	1000	2.78E-04	32.7	60.2	5604.4	8038.0	13647.0
비 장	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0.0
장 소	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0.0
감 상 선	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0.0
진 신	2.78E-04	0.000%	0.00%	1000	0	2.78E-04	60.2	0.0	0.0	0.0	0.0

표 9 및 10의 총 축적된 방사능(A) 값, 및 MIRD 팜플렛 제11호(표 11 및 12, 및 13 및 14)에서 제공된 S 값을 사용하여, 나열된 조직에 대한 각각의 방사선표지 접합체에 대해 방사선 흡수 투여량을 평가하였다(표 15, 16, 17 및 18). 표 19에 제공된 인듐-표지된 접합체에 대한 요약 방사선 투여량 평가를 측정하는데 있어서, 주어진 기관의 자가-투여량은 근접 기관 또는 조직 내의 방사능에 의해 생성된 흡수된 투여량을 합산하였다. 그러나, 이트륨-표지된 접합체에 대한 방사선 투여량 평가 값을 계산하는데 있어서(표 20), 어떤 값들은 나열된 조직에 대해 존재하지 않는다(예를 들어, 부신). 방출된 g 입자의 경로에 대해 방출된 13 입자의 경로가 더 짧아, 근접 조직에 대해 방사능이 거의 미치지 않아 이들 조직의 1차 생체분포 데이터가 없다.

[표 11a]

단위 축적된 방사능 당 S.흡수된 투여량, (RAD/IC1-H)  
인듐-[111] 반감기 67.44시간

표 자 기 관	공급 기관				신 장  간 격	폐  다 른 ( 군 육 )				
	부 신  방 광 학 관		장 관							
	위 합 량	Si 합 량	Ujj 합 량	Ljj 합 량						
부신	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
방광액	3.0E-07	4.5E-04	7.3E-07	8.0E-06	6.4E-06	2.0E-05	9.3E-07	5.2E-07	1.5E-07	5.5E-06
뼈	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
G(위액)	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
G(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
G(UJLI 벡)	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
G(LLJI 벡)	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

[표 11b]

표 기 관 기 관	공급 기관				신장 간 폐 ( 근 육 )					
	부신 방광 합광		장관							
	우 침 랑	Si 침 랑	Uli 침 랑	Li 침 랑						
신장	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
간	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
폐	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
골수(췌드)	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
다른조직(근육)	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
난소	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
췌장	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
피부	1.8E-06	1.7E-06	1.4E-06	1.4E-06	1.6E-06	1.8E-06	1.6E-06	1.8E-06	2.5E-06	-
비장	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
정소	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
갑상선	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

[표 11c]

부산 포적 기관	공급 기관				신장	간	폐	다른 조직 (근육)
	방광	함량	장관	위				
			Si	U <sub>H</sub>	L <sub>i</sub>			
자궁(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
전신	6.6E-06	6.2E-06	6.1E-06	7.3E-06	6.8E-06	6.9E-06	6.6E-06	5.9E-06
								5.6E-06

[표 12a]

단위 축적된 방사능 농 S 흡수도 투여량, (RAD)/ICl-H)  
인辱-[111] 반감기 67.44시간

표 기 관	난소	췌장	금속			피부	비장	정소	감상선	전신					
			R	골격											
				골수	피질골										
금금 기관															
부신	1.1E-06	2.6E-05	7.9E-06	3.9E-06	2.4E-06	2.0E-05	1.4E-07	4.7E-07	7.0E-06						
방광벽	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					
뼈	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					
G(우벽)	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					
G(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					
G(ULI벽)	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					
G(LLI 벽)	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					
신장	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					
간	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					
폐	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					
골수(레드)	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					
다른 조직(근육)	6.3E-06	5.7E-06	3.2E-06	3.2E-06	2.5E-06	4.6E-06	3.6E-06	4.3E-06	5.6E-06						

[표 12b]

표적 기관	공급 기관								
	난소	체장	골격		피부	비장	정소	갈상선	전신
			R	골수					
난소	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
췌장	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
피부	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
비장	1.6E-06	6.2E-05	2.7E-06	2.0E-06	2.0E-06	1.7E-05	9.1E-04	8.9E-08	3.5E-07
정소	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
김상선	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
지궁(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
전신	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

[표 13a]

단위 축적된 방사능 당 S.흡수된 투여량, (RAD/UCI-H)  
이트롬-[90] 반감기 64시간

		공급 기관								
		부신		방광		장관		신장	간	폐
표적 기관	위 험량	위 험량	SI	U <sub>II</sub>	L <sub>II</sub>					다른 조직 (급속)
		험량	첨량	첨량	첨량					
부신	1.4E-01	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
방광벽	0.0	5.0E-03	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
폐	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
G(위벽)	0.0	0.0	4.0E-03	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
G(SI)	0.0	0.0	0.0	2.5E-03	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
G(UU벽)	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5E-03	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
G(LLI벽)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.4E-03	0.0	0.0	0.0	0.0
신장	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.4E-03	0.0	0.0	0.0	0.0
간	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1E-03	0.0	0.0	0.0
폐	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0E-03	0.0	0.0
콜수(레드)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[표 13b]

부신 기관 포지 션	공급 기관					신장 간 폐 ( 다른 조직 군집)	
	방광 합량		장관				
	우 회 합량	SI 합량	Uji 합량	Lji 합량			
다른 조직(근육)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
난소	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
췌장	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
피부	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
비장	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
정소	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
갈상선	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
자궁(NONGRVO)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
전신	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	

[표 14a]

기관	포적	공급 기관			피부	비장	정소	갑상선	전신					
		콜恪		소주콜										
		콜수	피질콜											
부신	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					
방광벽	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					
뼈	0.0	0.0	1.1E-04	4.0B-04	2.3E-04	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					
GI(위벽)	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	2.8E-05					
GI(LLI벽)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					
신장	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					
간	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					
폐	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					
콜수(췌드)	0.0	0.0	8.5E-04	3.3E-03	5.7E-04	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					
다른 조직(근육)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					

[표 14b]

포적 기관	공급 기관						피부	비장	정소	갈상선	전신					
	난소			췌장												
	콜수	피질콜	콜액	콜수	피질콜	소주콜										
난소	1.8E-01	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05						
췌장	0.0	2.0E-02	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					
피부	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.6E-04	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05					
비장	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1E-02	0.0	0.0	2.8E-05						
정소	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.7E-02	0.0	2.8E-05						
갈상선	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.9E-02	2.8E-05						
지궁(NONGRVO)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8E-05						
전신	2.8E-05															

[표 15a]

부신 기관 표적 기관	공급 기관				신장 간 폐	다른 조직		
	방광 합관		장관					
	위 합관	Si 합관	Ui 합관	Lii 합관				
부신	0.0E+00	3.1E-05	1.0E-03	1.4E-03	4.9E-04	1.4E-02		
방광벽	0.0E+00	2.4E-02	1.1E-04	2.5E-03	2.6E-03	2.6E-04		
G(위벽)	0.0E+00	4.6E-05	4.8E-02	3.5E-03	2.2E-02	2.0E-03		
G(SI)	0.0E+00	4.7E-04	1.1E-03	6.7E-03	2.2E-02	1.1E-02		
G(ULI 벽)	0.0E+00	3.8E-04	1.5E-03	2.6E-02	1.3E-01	5.3E-03		
G(LLI 벽)	0.0E+00	1.2E-03	5.3E-04	7.6E-03	3.8E-03	1.0E-01		
신장	0.0E+00	4.6E-05	1.5E-03	2.9E-03	3.4E-03	1.1E-03		
간	0.0E+00	3.4E-05	8.3E-04	1.8E-03	3.2E-03	3.2E-04		
폐	0.0E+00	4.5E-06	7.3E-04	2.4E-04	3.4E-04	9.8E-05		
다른 조직								
근육	0.0E+00	3.0E-04	6.0E-04	1.5E-03	1.8E-03	3.4E-02		
						7.6E-03		
						3.7E-01		

[표 15b]

표 작 기 관	부신 방광 침강	공급 기관				신장	간	폐	다른 조직	
		장관	장관	장관	장관					
지방	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
철액	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
뇌	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
심장	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
난소	0.0E+00	1.3E-03	1.3E-04	1.1E-02	1.5E-02	2.4E-02	1.5E-03	1.4E-02	6.2E-04	2.8E-01
췌장	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
골격										
피질관	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
소주관	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
골수(레드)	0.0E+00	2.9E-04	5.0E-04	3.5E-03	3.7E-03	4.6E-03	3.9E-03	4.1E-02	8.3E-03	2.6E-01
골수(옐로우)	0.0E+00	2.9E-04	5.0E-04	3.5E-03	3.7E-03	4.9E-03	3.9E-03	4.1E-02	8.3E-03	2.6E-01
연골	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
다른 성분	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
피부	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

[표 15c]

부산 기관 기관	공급 기관				신장 간	폐 다른 조직				
	부산 방광 침량	장관	Uii	Lii						
	우 침량	Si 침량	Uii 침량	Lii 침량						
비 진 정 소 김 상 선 자 금 (NONGRV) 전 신	0.0E+00 0.0E+00 0.0E+00 0.0E+00 0.0E+00	4.1E-05 7.6E-04 6.5E-07 3.4E-04 2.7E-03	4.4E-03 2.5E-05 2.2E-05 8.6E-04 9.2E-03	1.5E-03 3.2E-04 3.0E-05 2.3E-03 6.1E-03	1.7E-03 4.0E-04 1.0E-05 2.7E-03 8.0E-03	9.1E-04 2.2E-03 8.1E-05 2.6E-03 1.3E-03	1.1E-02 1.4E-04 6.2E-03 6.6E-02 1.2E-02	2.8E-02 2.5E-03 4.5E-03 1.0E-02 4.8E-04	1.2E-02 6.7E-05 2.1E-01 3.7E-01 2.8E-01	2.3E-01 1.3E-01 2.1E-01 3.7E-01 2.8E-01

[표 16a]

방사선 흡수된 투여량, ( $RAD = A * S$ )  
 입도-[111] 반감기 67.44시간

표 작 기 관	공급 기관									
	부수	제작	글격			피부	비장	정소	급상선	전신
			R	글수	피질글					
부신	0.03+00	0.05+00	0.0E+00	0.0E+00	3.6E-02	2.6E-02	1.2E-02	0.03+00	0.0E+00	0.03+00
방광액	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	1.4E-02	1.7E-02	2.7E-04	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
G(우역)	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
G(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
G(ULI 역)	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

[표 16b]

표 작 기 관	공급 기관						피부	비장	정소	감상선	전신					
	난소	췌장	골격		피질골	소주골										
			R	골수												
G(LLI 벽)	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	0.0E+00					
신장	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	0.0E+00					
간	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	0.0E+00					
폐	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	0.0E+00					
다른 조직																
근육	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	0.0E+00					
지방	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	0.0E+00					
혈액	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	0.0E+00					
뇌	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	0.0E+00					

[표 16c]

표적 기관	공급 기관						피부	비장	정소	길상선	전신					
	난소	췌장	급격			소주글										
			R 글수	피질글	글격											
심장			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					
난소			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				
췌장			0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0B+00	2.9E-02	1.8E-02	3.5E-02	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00				
골격																
피질글			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				
소주글			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				
골수(레드)			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				
골수(옐로우)			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				
연골			0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0B+00	2.4E-01	3.1E-02	1.7E-03	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00				

[표 16d]

표 작 기 관	난소	취장	공급 기관			피부	비장	정소	감상선	전신					
			골격												
			R 골수	피질골	소주골										
다른 성분	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	2.4B:01	3.1B:02	1.7E-03	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00					
피부	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					
비장	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					
정소	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					
감상선	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					
자궁(NONGRVD)	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	1.7B-02	0.0E+00	7.0E-04	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00					
전신	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	5.5B-02	4.1E-02	3.8E-03	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00					

[표 17a]

방사선 흡수된 투여량, ( $RAD = A * S$ )  
이트륨-[90] 반감기 64시간

표 기 관	공급 기관				신장	간	폐	다른 조직
	부신	방광	침관	장관				
	위 침관	St 침관	Ui 침관	Lii 침관				
부신	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
방광벽	0.0E+00	2.7E-01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
GI( 위벽 )	0.0E+00	0.0E+00	3.6E-01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
GI(SI)	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	5.0E-01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
GI(LLI 벽)	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	1.1E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
GI(LLI 벽)	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	1.8E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00

[표 17b]

부산 기관 포지 션	금급 기관			신장 간 폐	다른 조직
	부산 법관 증명	부산 법관 증명	부산 법관 증명		
	우 체 증 명	St 체 증 명	Uji 체 증 명	Lji 체 증 명	
신장	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
간	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	8.4E+00
폐	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
다른 조직					
근육	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
지방	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
혈액	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
뇌	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
심장	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00

[표 17c]

표 작 가 관	부신				공급 기관				신장				간		폐		다른		
	방광 합관		장관		방광 합관		장관		신장		간		폐		다른				
	우 합관	Si 합관	Uji 합관	Lji 합관															
난소	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	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	
췌장	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	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	
골격																			
피질골	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	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	
소주골	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	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	
골수(췌드)	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	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	
골수(엘로우)	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	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	
연골	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	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	
다른 성분	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	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	

[표 17d]

표 기 관	부신		공급 기관		신장		간		폐		다른 조치
	방 한 랑	방 한 랑	장관	장관	신장	간	폐	폐	폐	폐	
	위 한 랑	Si 한 랑	Uii 한 랑	Lii 한 랑							
피부	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	
비장	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	
정소	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	
김상선	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	
자궁(NONGRVD)	0.0E+00	1.7E-04	7.6E-03	4.6E-03	3.6E-03	4.1E-03	3.7E-02	2.2E-01	2.9E-02	0.0E+00	
전신	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	1.1E+00	

[표 18a]

방사선 흡수된 투여량, (RAD = A \* S)  
이트륨-[90] 반감기 64.00시간

표적 기관	공급 기관			피부	비장	장소	갈상선	전신
	난소	췌장	골격					
			R 쿠수	피질골	소주골			
부신	0.0E+00							
방광벽	0.0E+00							
G(위벽)	0.0E+00							
G(SI)	0.0E+00							
G(LLI벽)	0.0E+00							
신장	0.0E+00							
간	0.0E+00							
폐	0.0E+00							
다른 조직								

[표 18b]

표 작 기 관	난소	췌장	증증 기관			피부	비장	정소	김상선	전신					
			증증												
			R	글수	피질글										
근육			0.0E+00												
지방			0.0E+00												
혈액			0.0E+00												
뇌			0.0E+00												
심장			0.0E+00												
난소			0.0E+00												
췌장			0.0E+00												
골격															
피질글			0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	3.1E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00					
소주글			0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	3.1E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00					
글수(레드)			0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	7.8E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00					
글수(옐로우)			0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	7.8E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00					
연골			0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	3.1E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00					
다른 성분			0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	3.1E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00					

[표 18c]

포적 기관	공급 기관						피부	비장	정소	감상선	전신					
	난소			췌장												
	R	글수	피질글	글각	피질글	소주글										
피부	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	0.0E+00					
비장	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	0.0E+00					
정소	0.0E+00															
감상선	0.0E+00															
자궁(NONGRVD)	0.0B+00															
전신	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	0.0E+00					

[표 19]

주입 후 72시간에 걸친 동물 분포 데이터를 기준으로 한 표준 인간(70Kg)에  
균일하게 분포된 인듐-[111] 표지된 2B-MX의 투여에 의해 발생한 방사 선량 평가

방사능의 양 =	1000 마이크로케리/환자 투여량
RADS	RADS
부신 0.493	난소 0.387
방광벽 0.348	췌장 0.362
위벽 0.412	골격
소장 0.434	피질골 0.474
UL 장벽 0.533	소주골 0.474
LL 장벽 0.505	골수(레드) 0.602
신장 0.625	골수(옐로우) 0.602
간 1.533	연골 0.474
폐 0.582	다른 성분 0.474
다른 조직	피부 0.564
근육	비장 0.854
지방	정소 0.239
혈액	갑상선 0.276
뇌	자궁(NONGRVD) 0.473
심장	천신 0.417

참조문헌: A Schema for Absorbed-dose Calculation for Biologically  
Distributed Radionuclides, MIRD J. of Nucl. Med./Suppl. #1, 2/68  
필립 엘 하간(Philip L. Hagan, MS Nuclear Medicine Service VA Hospital  
San Diego, CA 92161)에 의해 제작된 심포니(Lotus Development Corporation)의 스  
프레드시트 주형을 사용하여 계산함.

### [표 20]

주입 후 72시간에 걸친 동물 분포 데이터를 기준으로 한 표준 인간(70Kg)에

균일하게 분포된 이트륨-[90] 표지된 2B-MX의 투여에 의해 발생한 방사 선량 평가

방사능의 양 =	1000 마이크로뢴리/환자 투여량
부신	RADS 0.000
방광벽	0.271
위벽	0.356
소장	0.504
UL 장벽	1.150
LL 장벽	1.772
신장	8.366
간	8.575
폐	2.079
다른 조직	
근육	2.716
지방	2.716
혈액	2.716
뇌	2.716
심장	2.176
난소	RADS 0.000
췌장	0.000
골격	
피질골	3.138
소주골	3.138
골수(레드)	7.776
골수(옐로우)	7.776
연골	3.138
다른 성분	3.138
피부	10.269
비장	8.965
정소	0.000
갑상선	0.000
자궁(NONGRVD)	0.304
전신	1.854

참조문헌: A Schema for Absorbed-dose Calculation for Biologically

Distributed Radionuclides, MIRD J. of Nucl. Med./Suppl. #1, 2/68

필립 엘 하간(Phillip L. Hagan, MS Nuclear Medicine Service VA Hospital

San Diego, CA 92161)에 의해 제작된 심포니(Lotus Development Corporation)의 스

프레드시트 주형을 사용하여 계산함.

## 1. II. 결과

### A. 2B8 및 2B8-MX-DTPA를 사용한 시험관 내 연구

#### 1. 항 CD20 항체 2B8의 생산 및 특성화

총 9번의 융합으로 방사선포지 코울터 B1 항체와 효과적으로 경쟁하는 항체를 생산하는 3개의 하이브리도마를 얻었다. 각 경우에, 하이브리도마를 24웰 플레이트에 전개시켰다. 융합 3과 4로부터 분리된 첫번째 2가지 항체는 아이소타입(isotype)이었고, 모두 IgM으로 확인되었다. 융합 5에서 생산되어 2B8로 명명된 세번째 항체는 IgG1 카파 아이소타입으로 확인되었고, 계속 연구하기 위해 선택하였다. 클론 2B8.H11을 전개시켜 액체질소에서 장기간 저장하였다. 클론 2B8.H11을 서브클로닝하여 클론 2B8.H11.G3를 생산하고 다시 클론 2B8.H11.G3.G9를 생산하였다. 추가연구를 위해 이 클론을 전개시키고, 단백질 A 친화크로마토그래피에 의해 항체를 정제하였다.

비표지 2B8, B1 및 Leu 16과 방사선포지 코울터 B1을 사용한 경쟁분석은 B1이 CD20에 결합하는 것을 동일한 농도의 B1이나 Leu 16보다 2B8이 더 효과적으로 억제할 수 있었다는 것을 나타내었다(도 1). FITC-접합 2B8, 천연 B1 및 비관련 항체 UPC-10 및 S-003(각각 IgG 2a 및 1 아이소타입)을 사용한 경쟁연구에서 유사한 결과가 얻어졌다(데이터는 나타내지 않음).

2B8과 B1 항체에 의한 세포 CD20 항원에 대한 직접결합을 CD20-양성 SB세포와 CD20-음성 HSB세포를 사용한 FACS 분석에 의해 비교하였다. 도 2에 나타낸 결과는 동등한 양의 항체에 대하여, B1보다 더 많은 2B8이 SB세포에 결합하였음을 나타낸다. 비관련 항체에 대해서는 SB세포에 대한 뚜렷한 결합을 관찰하지 못했다. HSB세포와 함께 사용된 시약에 대해서는 배경형광만이 관찰되었다. 이 결과는 2B8과 CD20항원과의 상호작용의 특이성을 확인하고, 세포표면항원에 대하여 2B8이 B1보다 더 높은 친화력을 가질 수 있음을 암시한다.

2B8의 겉보기 친화력을 확인하기 위하여, 정제된 항체를  $^{125}\text{I}$ 로 방사선표지하고 표지된 항체의 농도를 증가시키면서 항원-양성 SB세포와 함께 배양하였다; 1시간 동안 배양한 후 세포관련 방사능을 측정하였다(도 3). 그 결과는 2B8 항체가  $4.3 \times 10^{-9}\text{M}$ 의 겉보기 친화력 상수로 CD20 항원에 결합한다는 것을 나타낸다.

인간의 정상 말초혈액 림프구를 사용한 유세포분석 연구는 2B8이 B-세포에 특이적이고 다른 형태의 림프구(예를 들면, T-세포, 단핵세포, 대식세포)와는 반응하지 않는다는 것을 나타내었다. FITC-표지 2B8을 동일수의 인간림프구를 사용하여 B1-FITC 및 Leu 16-FITC와 비교하였다. 표 21에 나타낸 결과는 2B8이 약 14%의 말초혈액 림프구와 반응한 반면, Leu 16은 약 12%와 반응하고 B1은 약 11%와 반응하였음을 나타낸다. 다른 B림프구표지(CD19)에 근거한 림프구수는 11 내지 14%였다. 마지막으로, 인간 말초혈액 림프구를 2B8 및 B1 또는 Leu 16 중 하나와 함께 배양한 후 CD19 표지(Becton/Dickinson)로 대비염색하였을 때, 이중염색 B림프구는 2B8에 대하여 9%, B1 또는 Leu 16에 대해서는 10%였다. 이 결과는 3가지 시약의 유사성을 확인해준다.

### [표 21]

다른 B- 및 T-림프구 특이적 시약을 사용한  
2B8과 인간 말초 혈액 림프구의 결합 비교

항체 마커	CD45 캐이트 림프구의 퍼센트
A. 단일 염색:	
없음(자동형광)	0
B1-FITC(Coulter Immunology, IgG2a,k)	11
Leu 16 FITC (Becton Dickinson, IgGl,k)	12
2B8-FITC (EDEC, IgGl,k)	14
B72.3-FITC (IgGl,k 무관련 대조구)	4
항-CD4-FITC (Goulter Immunology)	37
항-CD3-FITC (Becton Dickinson)	59
항-CD19-RPE (Becton Dickinson)	11
항-CD19-FITC (Becton Dickinson)	14
B. 이중 염색:	
B1-FITC/항 CD19-RPE	10
Leu 16-FITC/항 CD 19-RPE	10
2B8 FITC/항 CD19-RPE	9
항-CD19 FITC/항 CD19-RPE	13
B1-FITC/항 Hu Ig RPE	10
2B8-FITC/항 Hu Ig RPE	10
B72.3-FITC/항 Hu Ig RPE	2
Leucogate Simultest	99

2B8 또는 B1에 의한 방사선표지 세포 CD20 항원의 면역침전 결과, 약 33 및 35KD의 분자량을 가진 구별할 수 없는 이중 단백질종의 침전이 생겼다(데이터는 나타내지 않음).

## 2. 2B8-MX-DTPA의 생산 및 특성화

항체를 4:1 몰 과량의 아이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌-트리아민펜타아세트산과 반응시켜 2B8-MX-DTPA 접합체를 생산하였다. 일반적으로, 2B8 항체 1mol당 1 내지 2mol의 MX-DTPA 칼레이트를 도입하였다. 도 4에 제시된 결과에 의해 알 수 있는 바와 같이, 천연 및 접합 2B8 항체 모두 실질적으로 동일한 B1 억제를 나타내었으므로, 2B8-MX-DTPA 접합체는 천연 2B8에 비해 면역반응성에서 명백하게 손실되지 않았다; 2B8 및 2B8-MX-DTPA에 대한 IC50값은 각각 약 3 및  $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 였다. 이 결과는 SB세포를 사용하여 행해진 전세포 방사선편역분석에서  $^{125}\text{I}$ -표지 B1 항체를 사용하

여 얻었다.  $^{125}\text{I}$ -표지 2B8이 SB세포에 결합하는 것을 억제하는 억제제로서 2B8 또는 2B8-MX-DTPA를 사용하여 유사한 결과를 얻었다; 2B8과 이의 MX-DTPA 접합체 모두 약 3 내지 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서  $^{125}\text{I}$ -2B8이 SB세포에 결합하는 것을 억제하였다(데이터는 나타내지 않음).

천연 2B8 항체 및 2B8-MX-DTPA 접합체의 시험판 내 안정성을 평가하기 위하여, 시료를 4°C 및 30°C에서 일반 식염수 또는 10mM 글리신-HCl을 함유하는 pH 6.8의 식염수 속에서 12주 동안 배양하고, 하기 분석법을 사용하여 분취량을 매주 분석하였다: 전세포 효소 면역분석에 의한 면역반응성, 환원성 및 비환원성 조건 하에서의 SDS-PAGE, 및 등전집중 젤 전기영동. 면역반응성분석이 어느 온도에서 배양된 항체 시료들이 항원인식이 순실되었는지를 검출하지 못한 반면(도 5), 4°C에서 안정한, 항체에 대한 등전집중범위(0주에서 pH 7.30~8.40)는 제6주 후 30°C에서 0.2 pH 단위가 감소한 것으로 나타났다(표 22). 그러나 이 결과는 분석에 대한 실험오차의 한계에 있기 때문에 확실하지 않을 수 있다.

[표 22]

2B8/2B8-MX-DTPA pI 요약

주	2B8 4 SAL	2B8 30 SAL	2B8 4 GLY	2B8 30 GLY	2B8-MX 4 SAL	2B8-MX 30 SAL	2B8-MX 4 GLY	2B8-MX 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	5.93-8.13	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	5.90-8.18	5.90-8.18

천연 2B8 및 2B8-MX-DTPA의 시료를 상이한 완충액에서 제제화하고, 40 또는 30°C에서 12주 동안 배양하였다. 이 기간 동안 등전점 측정을 포함하여 다양한 분석을 수행하였다. 상기 나타낸 값으로부터 안정성 연구 동안 각 운도, 각 제제, 및 각 12주 동안 배양된 천연 및 접합된 항체에 대한 등전점 범위를 알 수 있다. 두문자는 다음을 나타낸다: 2B8 4 SAL, 4°C 식염수에서 배양된 2B8; 2B8 30 SAL, 30°C 식염수에서 배양된 2B8; 2B8 4 GLY, 4°C에서 10mM 글리신을 함유하는 정상 식염수에서 배양된 2B8; 2B8-MX 4 SAL, 4°C에서 배양된 2B8-MX-DTPA (접합체); 2B8-MX 30 SAL, 30°C 식염수에서 배양된 접합체; 2B8-MX 4' GLY, 4°C에서 10mM 글리신을 함유하는 정상 식염수에서 배양된 접합체; 및 2B8-MX 30 GLY, 30°C에서 10mM 글리신을 함유하는 정상 식염수에서 배양된 접합체.

마지막으로, 비환원성 SDS-PAGE를 사용하면, 30°C 항체 시료는 제1주 후에 고분자량 응집체를 나타내었다(표 23). 겔의 농도계 분석결과, 응집체들이 시료의 8 내지 17%라는 것을 알 수 있다(표 23). 그러나, 이들 시료를 환원성 SDS-PAGE로 분석하였을 때, 고분자량종의 증거는 전혀 발견되지 않아서, 30°C에서 공유항체응집체가 형성된다는 것을 암시한다. 또한 면역반응성에서의 손실도 관찰되지 않았다.

### [표 23]

#### 2B8의 시험판내 안정성

##### A. 비-환원 SDS 겔의 탈감도 스캔

시료	% 고분자량 모노머 저분자량		
	고분자량	모노머	저분자량
비교구	0	100.00	0
12wk/4°C/식염수	0	95.42	4.58
12wk/4°C/글리신	0	100.00	0
12wk/30°C/식염수	7.63	83.34	9.03
12wk/30°C/글리신	16.70	72.11	11.18

##### B. 환원 SDS 겔의 탈감도 스캔

시료	% 고분자량 모노머 저분자량		
	고분자량	모노머	저분자량
비교구	0	100.00	0
12wk/4°C/식염수	0	100.00	0
12wk/4°C/글리신	0	10.00	0

이러한 안정성연구과정에서, 4°C와 30°C 모두에서 배양된 2B8-MX-DTPA의 시료를  $^{90}\text{Y}$ 를 사용한 방사선금속 결합에 대해서도 시험하였다. 제4주, 제8주 및 제12주에 분석한 시료들은 배양온도에 관계없이 >90%의  $^{90}\text{Y}$ 와 결합하였다.

마지막으로 독립된 연구에서, 4°C 및 30°C에서 10주 동안 배양한 2B8-MX-DTPA 분취량을  $^{111}\text{In}$ 으로 방사선표지하고, 그들의 조직 생체분포를 BALB/c 마우스에서 평가하였다. 양 배양 온도에서의 접합체는 유사한 생체분포를 이루었다(데이터는 나타내지 않음). 또한 얻어진 결과는 4°C에서 저장된  $^{111}\text{In}$ -표지 접합체를 사용하여 BALB/c 마우스에서 얻어진 생체분포결과와 유사하였다(하기 참조).

$^{111}\text{In}$ 과  $^{90}\text{Y}$  모두에 대한 방사선표지 프로토콜은 재생가능한 것으로 밝혀졌다. 일반적으로  $^{111}\text{In}$ 에 대하여 >95% 및  $^{90}\text{Y}$ 에 대하여 >90%의 방사선결합이 얻어졌다.  $^{111}\text{In}$  및  $^{90}\text{Y}$ -표지 접합체에 대한 고유방사능은 일상적으로 각각 2-3 및 10-15mCi/mg 항체의 범위 내에 있었다.  $^{111}\text{In}$ 과  $^{90}\text{Y}$  방사선표지 프로토콜의 초기개발에서, 비복합 방사성 동위원소를 HPLC 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 방사선표지 2B8-MX-DTPA로부터 제거하였다. 이후 실험에서, 이 동위원소를 사용하면 높은 방사선결합(>95%)이 얻어지기 때문에 인듐-표지 접합체의 HPLC 정제는 삭제하였다.

2B8-MX-DTPA의  $^{111}\text{In}$ 과  $^{90}\text{Y}$ -표지 제제의 면역반응성은 린드모의 방법(3)으로 분석하였다.  $^{111}\text{In}$  표지 2B8-MX-DTPA는 면역반응성이 100%인 것으로 밝혀졌고(도 6),  $^{90}\text{Y}$ -표지 접합체는 면역반응성이 60%인 것으로 확인되었다(데이터는 나타내지 않음).

### 3. $^{111}\text{In}$ 및 $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA의 특성화

<sup>90</sup>Y-표지 접합체를 사용한 예비실험은 >10mCi/mg 항체의 고유방사능에서 상당한 항체분해 및 면역반응성의 손실이 발생했다는 것을 보여주었다. 따라서, 방사선분해의 효과를 최소화하기 위한 제제화를 개발하였다. 많은 저분자량 자유라디칼 스캐빈저를 평가하여 효과적이라는 것을 알아냈지만, 고농도의 인간 혈청알부민(HSA)이 항체 본래의 모습 및 면역반응성을 보존하는데 가장 효과적이었다(도 7 내지 9).

<sup>90</sup>Y-표지 항체는 75mg/mL HSA를 함유하는 pH 7.4인 1X PBS로 제제화하였다: 또한 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DPTA)을 최종농도 1mM로 첨가하여 항체로부터 손실될 수 있는 어떤 <sup>90</sup>Y도 칠레이트화될 수 있도록 하였다. 14.6 mCi/mg의 고유방사능까지 방사선표지된 2B8-MX-DTPA의 분해를 SDS-PAGE 및 방사선사진을 사용하여 0시간 및 48시간에서 평가하였다. 도 8과 9는 방사선표지 항체가 4°C에서 배양되었을 때 48시간 이상동안 상당히 분해되지 않았음을 보여준다. 즉시 박막 크로마토그래피를 사용하여 분석한 결과 48시간 배양하는 동안 <sup>90</sup>Y의 손실은 2% 미만으로 나타났다(표 24). 면역반응성은 또한 60%로 비교적 일정했다(표 24).

#### [표 24]

임상적으로 제제화된 <sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTPA의 안정성

시간(4°C에서 시)	접합체-관련 방사능 %	면역반응성 %
0	97.2	62
24	96.2	60
48	96.2	60

방사선표지 접합체(14.6 mCi/mg 고유방사능)를 75 mg/mL 인간 혈청 알부민 및 1 mM DTPA를 함유하는 pH 7.4인 PBS에서 제제화하고, 분취량을 4°C에서 배양하였다. 접합체 안정성은 나타낸 시점에서 SDS-PAGE 및 방사선사진, 즉시 박막 크로마토그래피 및 전세포 결합분석으로 분석하였다. 이 결과로부터 약 96%의 방사선 금속이 4°C에서 48시간 후 접합체와 관련되어 잔존하고, 항체 면역반응성이 약 60%로 일정하게 잔존한다는 것을 알았다.

제제화연구는 <sup>111</sup>In-표지 접합체를 사용하여 행하였다; 고유방사능은 2.2mCi/mg이었다. 방사선표지 항체는 50mg/mL HSA를 함유하는 pH 7.4인 1X PBS에서 평가하였다. 도 10은 0시간 및 48시간 배양시료에 대한 방사선사진을 나타낸다; 방사선사진의 농도계분석 결과는 연구과정동안 방사선표지 항체의 분해가 없었다는 것을 나타낸다(도 11, 12). 시료의 즉시 박막 크로마토그래피분석은 <sup>111</sup>In이 손실되지 않았음을 나타내고(표 25); 또한 면역반응성도 약 100%에서 유지되었다(표 25).

**[표 25]**

임상적으로 제제화된  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-DTPA의 안정성

시간(4°C에서 시)	접합체-관련 방사능 %	면역반응성 %
0	94.0	105
24	96.5	104
48	96.0	100

방사선표지 접합체(2.2 mCi/mg 고유방사능)를 50 mg/mL 인간 혈청 알부민을 함유하는 pH 7.4인 PBS에서 제제화하고, 분취량을 4°C에서 배양하였다. 접합체 안정성은 SDS-PAGE 및 방사선사진, 즉시 박막 크로마토그래피 및 전 세포 결합분석으로 분석하였다. 이 결과로부터 약 96%의 방사선표지가 4°C에서 48시간 후 접합체와 함께 잔존하고, 항체 면역반응성이 약 100%로 일정하게 잔존 한다는 것을 알았다.

고유방사능 14.6mCi/mg까지  $^{90}\text{Y}$ 로 방사선표지된, 임상적으로 제제화된 2B8-MX-DTPA의 제제를 인간 혈청 속에서 37°C에서 96시간 동안 배양하고 비활원성 SDS-PAGE 및 방사선사진으로 분석하였을 때, 4% 미만의 방사성 동위원소가 배양기간 중에 손실되었다. 0시간 및 96시간에서의 방사선사진의 농도계 스캔은 방사선표지 접합체가 그다지 분해되지 않았다는 것을 나타낸다(도 13 내지 15). 이 결과는 0시간 및 96시간 시료의 분석 박막 크로마토그래피분석에 의해 확인되었다(표 26). 이 결과들은 함께 이트륨표지 접합체가 본 연구에서 사용된 조건하에서 안정하다는 것을 나타낸다.  $^{111}\text{In}$  표지 2B8-MX-DTPA 접합체를 사용하여 유사한 결과를 얻었다(도 16 내지 18).

### [표 26]

37°C에서 96시간동안 인간 혈청 중에 배양된

<sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTPA 접합체의

분석 박막 크로마토그래피 분석

시간(37°C에서 시)	접합-관련 방사능 %
0	95.1
24	95.2
48	93.2
72	92.0
96	91.4

<sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTPA(고유방사능 14.6 mCi/mg)를 함유하는 인간 혈청 시료를 나타

낸 시점에서 즉시 박막 크로마토그래피 스트립 상의 시료의 1:20 희석액 1 $\mu$ l을 접  
적하여 분석하고; 시료를 삼중으로 분석하였다. 크로마토그래피 스트립을 메탄올:  
물(1:1;v/v) 중의 10% 암모늄 아세테이트 중에서 크로마토그래피를 올려 전개시키  
고, 건조시키고, 옆으로 반을 나누었다. 그리고 나서, 각 스트립의 하부 및 상부  
반과 관련된 방사능을 측정하고, 접합-관련 방사능 %를 계산하였다. (유리 방사선  
금속은 용매 전면과 함께 이동한 반면, 단백질-관련 방사능은 원점에 잔존하였다.)  
접합-관련 방사능의 각 측정 수단을 나타내었다.

## B. 동물연구

### 1. 2B8 및 2B8-MX-DTPA를 사용한 고투여량 약리학/독성학 연구

화이트 샌드 리서치 센터(White Sands Research Center)에서 행해진 GLP연구(연구번호 920111)에서, 다양한 투여량의 2B8를 게잡이원숭이에게 정맥주입하였다. 각각 새로 주입하기 전에 혈액시료를 채취하고, 혈액에 대해 림프구수의 유세  
포분석기 평가를 하였다(표 27).

## [표 27a]

항-CD20 주의 모노클로날 항체 2B8을 주입한 후, 유세포분석으로 측정한  
유인원 B 세포수

동물 #	투여량	일수	B 세포 <sup>a,b</sup>	% 고갈
<b>그룹 I</b>				
452	식염수	0	20.1	0
		1	18.3	9
		7	21.6	0
		13	14.6	27
		38	15.5	23
		52	18.6	7
<hr/>				
424	식염수	0	12.4	0
		1	11.6	6
		7	11.2	10
		13	8.4	32
		38	7.7	38
		52	13.1	0
<hr/>				
<b>그룹 II</b>				
540	0.6 mg/kg	0	16.1	0
		1	7.1	54
		7	6.0	63
		13	5.7	65
		38	10.8	33
		52	14.4	11
<hr/>				
804	0.6 mg/kg	0	17.6	0
		1	8.3	53
<hr/>				

[표 27b]

동물 #	투여량	일수	B 세포 <sup>a,b</sup>	% 고갈
		7	6.1	65
		13	6.6	62
		38	5.1	71
		52	5.2	68
<hr/>				
그룹 III				
701	2.5 mg/kg	0	21.6	0
		1	10.7	50
		7	3.0	86
		13	10.7	50
<hr/>				
754	2.5 mg/kg	0	19.9	0
		1	11.2	44
		7	10.5	47
		13	9.0	55
<hr/>				
그룹 IV				
782	10 mg/kg	0	15.9	0
		1	3.0	81
		7	3.5	78
		13	6.5	59
<hr/>				
164	10 mg/kg	0	17.7	0
		1	8.4	47
		7	7.9	50
		13	7.7	42
<hr/>				
그룹 V				
705	10 mg/kg	0	17.2	0
		1	5.2	70
		7	1.3	69

[표 27c]

동물 #	투여량	일수	B 세포 <sup>a,b</sup>	% 고갈
		13	8.2	52
		38	17.1	1
		52	13.3	22
716	10 mg/kg	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>총 림프구 %<sup>b</sup>이중 염색 마커 시약 항 마우스 IgG-RPE + 항 인간 IgG FITC에 의해 정량화된 B 세

포수(항 마우스 IgG RPE는 2B8 차단된 CD20을 검출하고, 항 인간 IgG FITC는 원숭  
이 B 세포 표면 Ig를 검출함)

그룹 I 내지 IV의 동물들에게 48시간마다 총 7회 주입하고; 그룹 V의 동물  
에는 0일에 한번 주입하였다. 그룹 III 및 IV의 동물들은 14일째에 치사시켰다.

연구하는 동안 또는 후에 평가된 어떤 임상적 파라미터에서 항-CD20 항체 2B8의 투여와 관련한 상당한 약리독성효과는 없었다. 이와 유사하게, 그룹 III과 IV의 동물에서 얻은 다양한 조직병리학 견본을 분석하는 동안 비정상은 없었다.

연구기간은 14일이었고, 연구하는 동안 다음의 카테고리에서 동물을 평가하였다: 임상적 관찰, 체중, 체온, 음식 및 물섭취, 대변 배설물, 혈청화학, 혈액학, 소변검사, 및 신체검사. 추가적으로, 각 그룹의 동물들을 0, 1, 7 및 13일째 채혈하여 혈청항체(2B8) 수준 및 T- 및 B-세포수준을 분석하였다. 13일째, 그룹 III과 IV의 동물들을 치사시켜, 표본을 만든 후 선택된 조직을 광학현미경으로 조사하였다.

평가된 조직은 심장, 비장, 간, 신장, 폐, 대뇌피질, 척수, 림프절, 위, 회장, 결장, 골격근, 정소/난소, 췌장, 및 끝수였다.

처리된 동물의 혈액을 순환 T- 및 B-세포 수준에 대해 분석하였을 때, 그룹 II 내지 V의 동물은 13일 동안 순환 B-세포의 >50%이 손실되었다(도 19); 항체의 투여는 T-세포수준에는 영향이 없었다(데이터는 나타내지 않음). 2B8을 받은 모든 그룹은 B-세포 포화와 혈장에서의 과량의 항체를 나타내었다(데이터는 나타내지 않음). 10.0 mg/kg 의 2B8를 1회 투여 받은 그룹 V의 동물도 다른 그룹의 동물에서 관찰된 것과 동등하게 순환 B-세포수준에서의 감소를 나타내었다.

그룹 I, II, 및 V의 동물은 52일동안 조사하였다(도 20). 그룹 II의 동물 한마리(PRO804)와 그룹 V의 동물 한마리 (PRO716)를 제외하고는, B-세포의 수준이 38일까지는 정상의 >70%로 돌아갔다. 이들 동물에서 순환 B-세포의 수준은 52일 후에 정상수준의 약 40%로 남아있었다.

이 연구외에도, 화이트 샌드 리서치 센터에서 행해진 GLP연구(연구번호 920611)의 계집이 원숭이에서 <sup>89</sup>Y-2B8-MX-DTPA의 약리독성효과를 평가하였다. 임상등급 접합체에는 비방사능 <sup>89</sup>Y를 가하였다. 이트륨함유 접합체를 75mg/mL 인간 혈청알부민과 1mM DTPA(임상적 제제화)를 함유한 pH 6.8인 PBS 중에 제제화하고 방법부분에서 설명한 바와 같이 정맥투여하였다.

도 21의 결과에서 알 수 있는 바와 같이,  $^{89}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA는 투여되는 양에 관계없이, 있더라도 이들 동물의 순환 B-세포에 거의 영향을 미치지 않았다. 또한, 림프구의 일반적인 고갈(20~43%)외의, 혈청화학, 소변검사, 체중 및 체온을 포함하여 평가된 어떠한 임상적 파라미터에서 명백한 비정상은 발견되지 않았다.

## 2. 2B8 및 2B8-MX-DTPA를 사용한 약물동태학적 연구

상기 설명한 바와 같이, GLP연구의 그룹 V의 동물에 10.0mg/kg의 2B8을 단일투여하였다. 데이터의 선형 후퇴분석은, 천연항체가 이들 원숭이의 순환으로부터 약 4.5일의  $t_{1/2}$ 의 값으로 제거된다는 것을 보여준다. BALB/c 마우스를 사용한 유사한 연구에서, 천연 및 접합된 2B8에 대한  $\beta t_{1/2}$  값은 선형 회귀분석(도시하지 않음)에 의하여 8.75일이라는 것을 확인하였다(도 22). 이러한 결과는 2B8의 접합이 BALB/c 마우스로부터 제거되는데 아무런 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다.

## 3. 방사선표지 2B8-MX-DTPA를 사용한 생체분포 및 종양위치연구

상기에서 설명한 예비 생체분포실험(섹션 2d)에 의거하여, 접합된 2B8을  $^{111}\text{In}$ 으로 2.3mCi/mg의 고유방사능까지 방사선표지하고 대략 1.1 $\mu\text{Ci}$ 를 20마리의 BALB/c 마우스에 각각 주입하여 방사선표지 물질의 생체분포를 측정하였다. 이어서, 각각 5마리 마우스의 그룹을 1시간, 24시간, 48시간 및 72시간에 치사시켜서 그들의 기관과 피부, 근육 및 뼈부분을 꺼내 분석을 진행하였다. 또한, 소변과 대변을 모아서 24~72시점 동안 분석하였다. 혈액과 방사능 수준은 1시간째 1g당 주입투여량의 40.3%로부터 72시간째 18.9%로 떨어졌다(표 1 내지 4; 도 23). 심장, 신장, 근육 및 비장에 대한 값은 실험 전기간동안 0.7 내지 9.8%의 범위로 유지되었다. 폐에서 발견된 방사능수준은 1시간째 14.2%에서 72시간째 7.6%로 감소하였고; 이와 유사하게 각 g당 간주입 투여량의 값은 10.3%와 9.9%였다. 이러한 데이터는 방사선흡수된 투여량 평가  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-DTPA를 확인하는데 사용되었다(표 19).

12.2mCi/mg 항체의 고유방사능을 가지는  $^{90}\text{Y}$ -표지 접합체의 생체분포를 BALB/c 마우스에서 평가하였다. >90%의 방사선결합이 얻어졌고, 방사선표지 항체는 HPLC로 정제하였다. 방사능의 조직침착을 주요기관, 및 피부, 근육, 뼈, 및 소변과 대변에서 72시간 이상 평가하였고 조직 1g당 %주입투여량으로 나타내었다. 표 5 내지 8 및 도 24에 나타낸 결과는 혈액과 관련된 방사능수준이 1시간째 g당 약 39.2% 주입투여량에서 72시간째 대략 15.4%로 떨어진 반면; 꼬리, 심장, 신장, 근육 및 비장과 관련된 방사능수준은 실험전과정에 걸쳐 10.2% 이하로 상당히 일정하게 유지되었다는 것을 나타낸다. 중요한 것은, 뼈와 관련된 방사능은 뼈 1g당 주입투여량이 1시간째 4.4%에서 72시간째 3.2%까지의 범위였다. 이 결과는 함께, 접합체와 관련된 유리이트륨이 거의 없고 본 연구 과정중에 유리 방사선금속이 거의 방출되지 않았다는 것을 제시한다. 이들 데이터는  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA에 대한 방사선흡수투여량평가를 확인하는데 사용되었다(표 20).

종양위치연구를 위하여, 2B8-MX-DTPA를 제조하여  $^{111}\text{In}$ 을 사용하여 2.7mCi/mg의 고유방사능으로 방사선표지하였다. 표지된 접합체 100 $\mu\text{l}$ (약 24 $\mu\text{Ci}$ )를 라모스(Ramos) B-세포종양을 가진 12마리의 무흉선증 마우스 각각에 연속적으로 주입하였다. 종양의 무게는 0.1 내지 1.0g였다. 주입 후 0, 24, 48, 및 72시간의 시점에서, 50 $\mu\text{l}$ 의 혈액을 레트로-오비탈 천자로 채취하고, 마우스를 경부탈구에 의해 치사시키고, 꼬리, 심장, 폐, 간, 신장, 비장, 근육, 대퇴골, 및 종양을 꺼냈다. 조직을 처리하고 무게를 측정한 후, 각 조직표본과 관련된 방사능을 감마계수기를 사용하여 측정하고 그 값을 g당 %주입 투여량으로 나타내었다.

그 결과(도 25)는 실험 전과정에 걸쳐  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-DTPA의 종양농도가 꾸준히 증가하였음을 나타낸다. 주입투여량의 13%가 72시간 후 종양에 축적되었다. 이와 반대로, 혈액수준은 실험하는 동안 0시간째 30% 이상에서 72시간째 13%로 떨어졌다. 모든 다른 조직(근육제외)은 실험이 끝날때 조직 1g당 1.3 및 6.0%의 주입투여량을 함유하였고; 근육조직은 1g당 약 13%의 주입투여량을 함유하였다.

## C. 방사선량

정상적인 BALB/c 마우스에서의 생체분포연구에서 유래하였으며 각각 표 19와 20에 나타낸, 인듐표지 및 이트륨표지 접합체에 대한 요약 방사선량 데이터는 주입투여량(5)의 mC당 비교했을 때 문헌에 제시된 데이터와 일치하여, 2B8의 이트륨표지 및 인듐표지 접합체가 림프종 환자에서의 임상효능에 대하여 안전하게 평가될 수 있음을 나타낸다.

## D. 독성학

### 1. 2B8 : 단일 투여량 일반 안정성 테스트

마우스와 기니안 피그에 단일 복막내 투여량(각각 0.5mL 또는 5.0mL)를 투여하고 7일동안 관찰하였다. 독성의 명백한 증거는 검출되지 않았다.

### 2. 2B8 및 2B8-MX-DTPA : 인간 조직을 사용한 면역조직학 연구

아세톤으로 고정된 32개의 다른 인간 조직의 패널을 사용하여 쥐의 모노클로날 항체 2B8의 조직반응성을 평가하였다. 항체 2B8은 매우 제한된 패턴의 조직분포를 가지는 항-CD20 항원과 반응하여, 조혈원의 것을 포함하는 림프조직에서의 세포집합에서만 관찰되었다.

림프절에서, 면역반응성은 배중심의 증식세포뿐 아니라 성숙한 피질 B-림프구집단에서 관찰되었다. 양성반응성은 또한 말초혈액, 편도선의 B-세포부위, 비장의 백색비수에서, 및 흉선에서 발견되는 골수 림프구의 40-70%에서 관찰되었다. 양성반응성은 또한 대장의 고유관(Peyer's Patches)의 소포에서도 발견되었다. 마지막으로, 방광, 가슴, 경부, 식도, 폐, 이하선, 전립선, 소장, 및 위를 포함한 다양한 기관의 스트로마에서의 응집체 또는 산재한 림프세포도 항체 2B8에 양성이었다.

다른 기관의 층화상피 및 편평상피뿐 아니라 모든 단순한 상피세포는 반응하지 않는 것으로 밝혀졌다. 이와 유사하게, 뇌, 척수 및 말초신경의 것을 포함하는 신경외배엽세포와는 반응성이 없는 것으로 나타났다. 골격 및 평활근세포와 같은 간엽의 구성요소, 섬유아세포, 내피세포, 및 다형핵 염증세포도 음성인 것으로 밝혀졌다.

아세톤으로 고정된 16개의 인간조직의 패널을 사용하여 2B8-MX-DTPA 접합체의 조직반응성을 평가하였다. 천연 항체를 사용하여 이전에 설명한 바와 같이, 2B8-MX-DTPA 접합체는 매우 제한된 패턴의 분포를 나타내는 CD-20 항원을 인식하고, 림프기관의 세포집단에서만 발견되었다. 림프절에서, 면역반응성은 B-세포 집단에서 관찰되었다. 강한 반응성은 비장의 백색비수와 흉선의 수질 림프구에서 나타났다. 또한 면역반응성은 방광, 심장, 대장, 간, 폐, 및 자궁의 산재된 림프구에서도 관찰되었고, 이들 조직 내에 존재하는 염증성 세포의 존재에 기여하였다. 천연항체에 대해 설명한 바와 같이(상기), 신경외배엽세포 또는 간엽의 구성요소에 대해서는 반응성이 관찰되지 않았다.

## III. 토의

동일한 명칭을 가진 클론에 의해 생산된 쥐의 모노클로날 항-CD20 항체 2B8은 CD20 항원에 대한 공지된 특이성의 항체를 사용한 경쟁 및 스캐차드분석(Scatchard analysis)에 의해 확인된 바와 같이, B1항체에 대해 관찰된 것보다 더 높을 수 있는 B-세포 CD20항원에 대한 친화력을 나타낸다. 또한, 면역침전데이터는 양 항체가 33 및 35KD의 상대분자량을 가진 한쌍으로 침전되기 때문에, 2B8에 의해 침전된 항원이 B1에 의해 침전된 것과 동일한 항원인 것으로 보인다는 것을 제시한다. 말초혈액림프구에 대한 2B8 항체의 특이성의 세포형광그래프분석은 항체가 B-세포와 특이적으로 반응하고 T-세포 또는 다른 형태의 림프구와 확인된 반응성을 가지지 않는다는 것을 나타낸다. 마지막으로, 예비 안정성 데이터는 항체가 30°C에서 12주 동안 면역반응성의 손실없이 안정하다는 것을 나타낸다.

2B8항체가 메틸벤질 디에틸렌트리아민펜타아세트산(MA-DTPA)에 접합되었을 때, 실질적으로 천연항체에 비해 면역반응성에서의 감소는 관찰되지 않았다. 또한,  $^{111}\text{In}$  또는  $^{90}\text{Y}$ 를 사용하여 접합체를 방사선표지하면 각각 100% 및 60%의 면역반응성을 가진 표지된 접합체가 생산되었다. 37°C에서 96시간 동안 인간 혈청에서 배양된  $^{111}\text{In}$  또는  $^{90}\text{Y}$ -표지 접합체의 안정성연구는 본 연구과정동안 방사선금속의 손실을 무시할 수 있다는 것을 나타내어, 접합체가 임상적으로 사용할 때 안정할 것이라는 것을 암시한다.

2B8-MX-DTPA의 인듐표지 제제를 사용한 무흉선마우스 종양위치연구는 실험과정동안 다른 조직에서 비정상적으로 축적되지 않으면서 증가된 양의 접합체가 종양세포에 결합한다는 것을 확인하였다. 또한, 방사선양 평가는 생체분포로부터 유래하였다. 또한, 생체분포연구로부터 유래된 방사선량 평가는 문헌에서 공표된 데이터와 일치한다. 마지막으로, 천연 및 접합된 항체를 사용한 인간 조직 교차반응성 연구는 양 항체 모두 매우 제한된 조직분포를 가진 항원을 인식하고, 조혈원

의 것을 포함하는 림프조직의 세포집단과만 반응한다는 것을 나타낸다. 이들 결과는 함께, 접합이 항체의 조직특이성을 변화시키지 않았고, 방사선표지 접합체가 생체내에서 안정하고, 무흉선 마우스에서 실험적으로 생산된 종양의 표면에 존재하는 CD20 항원을 인식한다는 것을 제시한다.

2B8이 고투여량 야리학/독성학 연구에서 사용되는 경우, 항체는 연구를 하는 동안 또는 연구 후에도, 평가된 어떤 파라미터에서도 상당한 야리독성효과를 나타내지 않았다. 이와 유사하게, 광학현미경에 의해 조사된 다양한 조직병리학 표본을 분석하는 동안 비정상은 나타나지 않았다. 놀랍게도 사용된 항체의 모든 투여량은 순환 B-세포의 혼자한 고갈을 나타내었다. 그러나 순환 B-세포수준은 항체의 투여가 일단 정지되면 대략 정상수준으로 되돌아갔다. 단일투여량그룹의 원숭이(그룹 V)에서, 천연항체는 약 4.5일의 걸보기  $\beta t_{1/2}$  값으로 순환으로부터 제거되었다. 예견할 수 있는 바와 같이, 이러한 약물 동태학연구가 BALB/c 마우스에서 행해지는 경우, 2B8 항체는 8.75일의  $\beta t_{1/2}$  값으로 제거되었다. 또한, 이들 데이터는 함께, 천연항체가 방사선표지 접합체에 부가물로서 투여되는 경우 일부 임상효과를 제공할 수 있다는 것을 제시한다.

전체적인 우리의 데이터는 고친화력 2B8 항체와 이의 MX-DTPA 접합체가 제한된 패턴의 인간 조직 반응성을 나타낸다는 것을 나타낸다. 또한 영장류에서, 천연항체는 비독성이고 B-세포의 일시적인 클리어런스를 만든다; 그러나, 일단 항체가 순환으로부터 제거되면, B-세포수준은 상당히 빨리 회복한다. 또한, 인듐- 및 이트륨-표지 2B8-MX-DTPA 접합체는 시험관 내에서 안정한 것으로 나타나서, 인간 혈청에서 오래 배양하는 동안 방사선금속의 손실이 없었다. 마지막으로, BALB/c 마우스에서의  $^{90}\text{Y}$ - 또는  $^{111}\text{In}$ -표지 2B8-MX-DTPA의 생체분포로부터 유래된 방사선 투여량 평가는 이들 방사성 동위원소로 방사선표지 접합된 항공유 이디오타입 항체를 사용한 인간 임상연구로부터 유래된 투여량평가와 주입투여량의 mCi 당 일치한다.

#### IV. $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA의 제조를 위한 "믹스 & 슈트" 방사선표지 프로토콜의 임상전 개발의 요약

##### A. 도입

$^{90}\text{Y}$ -표지 쥐의 모노클로날 항-CD20 항체(2B8)를 재발된 B-세포 림프종의 치료를 위한 제1기 임상실험에서 평가하였다. 이트륨표지 항체를 제조하기 위하여 사용되는 원래의 프로토콜은 제제화하여 환자에게 투여하기 전에 비단백질 결합 방사성 동위원소를 제거하기 위하여 HPLC(high performance liquid chromatography) 단계를 사용하였다. 불행히도, 이 방법은 특히 시간이 많이 소모되고, 보호되지 않은 상태에서 항체가 방사성 동위원소에 더 길게 노출되는 결과를 가져온다. 이것은 면역반응성을 감소시키는 것과 동시에 항체의 방사선분해를 증가시킨다. 또한, 상기 방법의 어려운 면은 방사선약학에서 하루에 1회 투여량 이상을 제조하는 것을 어렵게 한다. 방법을 단순화시키면 방사선약학으로서 NIPI 약학 서비스를 사용하는데 대한 대안으로서 임상 장소에서의 수행을 촉진시킬 것이다.

따라서, 면역반응성의 개선된 보유력과 높은 방사선결합을 유지하면서 HPLC 정제가 필요하지 않은, "믹스-&-슈트"법이라고 하는 수정된 방사선표지방법이 개발되었다. 마우스에서의 생체분포연구뿐 아니라 시험관 내 안정성연구도 "믹스-&-슈트"법을 사용하여 제조된 방사선표지 항체가 현재 HPLC 방법을 사용하여 생산된 물질과 동등하다는 것을 나타내었다. 이들 임상전 연구의 결과는 이러한 신규한 "믹스-&-슈트"프로토콜이 임상실험에서 사용하기에 적합한  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA를 제조하는데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

##### B. 재료와 방법

###### 재료

###### 1. 세포

ATCC로부터 인간의 림프아세포주 SB(CD20 양성) 및 HSB(CD20 음성)를 입수하여 10% 우테아혈청을 함유하고 글루타민으로 보충된 RPMI-1640에 유지하였다.

###### 2. 항체

2B8 항체는 제조부에서 IND(BB-IND 4850/4851)에서 이미 설명한 프로토콜을 사용하여 중공섬유 생물반응기 상등액으로부터 정제하였다.

### 3. 추가시약

이트륨-[90] 클로라이드를 아머샴(Amersham)에서 입수하였다. 다른 모든 시약들은 하기 인용된 첨부보고서에서 설명된 공급원으로부터 입수하였다. 방사선표지 프로토콜을 위해 사용되는 시약은 방사선표지단계동안 처리하여 방사성 동위원소와 경쟁할 수 있는 오염성 중금속이온을 제거하였다(방법부분 참조). 시약은 설정된 배치생산기록 후 IDEC의 제조부에 의해 GMP 조건하에서 만들어졌다.

## 방법

### 1. 2B8-MX-DTPA의 제조

임상등급 MX-DTPA를 이나트륨염 수용액으로서 코울터 이뮤놀로지(Coulter Immunology)에서 입수하여 -70°C에서 저장하였다. 접합체 (2B8-MX-DTPA)는 제조부에서 제조하였다. 이 연구에 2개의 다른 로트의 접합체를 사용하였고; 양자는 10mg/mL로 일반 식염수에 제공하였다. 접합체를 멸균 2mL 폴리프로필렌 주사기에 채우고 2 내지 8°C에서 저장하였다.

### 2. 무금속조건의 유지

시약의 모든 조작은 금속 오염의 가능성을 최소화하도록 행해졌다. 플라스크, 비이커 및 눈금실린더와 같은 폴리프로필렌 또는 폴리스티렌 플라스틱 용기를 사용하였다. 이들을 사용하기 전에 알코녹스(Alconox)로 세척하고 Milli-Q 워터 또는 판주수(Water for Irrigation, WFIr)으로 완전히 행궜다. 적은 부피를 정확하게 조작하기 위하여 무금속 피펫 팁(BioRad)을 사용하였다. 더 큰 부피의 시약은 멸균, 플라스틱 혈청학 피펫을 사용하여 조작하였다. 반응은 편리하게 폴리프로필렌으로 만들어진 1.8mL 나사마개 마이크로퓨즈 튜브에서 행하였다.

### 3. 방사선풀합의 측정

방사선풀합은 SOP SP-13-008에 따라 3중으로 즉시 박막크로마토그래피(ITLC)를 사용하여 측정하였다. 일반적으로, 프로토콜을 다음과 같았다: 방사선표지 접합체는 1mM DTPA 또는 5mM EDTA를 함유한 1X PBS에서 1:20으로 희석한 후, ITLC SG 페이퍼(Gelman Sciences)의 1x5 cm 스트립의 한쪽 끝에서 1.5 cm에 1 $\mu$ l를 접적하였다. 페이퍼를 메탄올:물 (1:1; v/v) 중의 10% 암모늄 아세테이트를 사용하여 전개시켰다. 스트립을 건조시키고, 옆으로 반으로 절단하고, 섬광계수기를 사용하여 각 부분과 관련된 방사능을 측정하였다. 스트립의 아래쪽 반과 관련된 방사능(단백질관련 방사능)을 위쪽 및 아래쪽 반 모두에 대한 값을 합함으로써 확인된 총 방사능의 %로서 나타내었다.

### 4. 이트륨-[90]-표지 2B8-MX-DTPA에 대한 "믹스 & 슈트" 프로토콜

0.04 M HCl 중에서 아머샴사의 무담체  $^{90}\text{Y}$  클로라이드로 항체를 방사선표지하였다. 한 분취량의 방사성 동위원소(10-20 mCi/mg 항체)를 폴리프로필렌 튜브로 옮기고 0.02X 부피의 무금속 2M 소디움 아세테이트를 첨가하여 용액의 pH를 3.6으로 조절하였다. 2B8-NaDTPA (0.3mg; 일반 식염수 중의 10.0mg/mL)를 즉시 첨가하고 용액을 부드럽게 혼합하였다. 용액을 pH 페이퍼로 체크하여 pH가 3.8 내지 4.1라는 것을 확인하고 5분간 배양하였다. 75mg/mL 인간 혈청 알부민(HSA)과 1mM 디에틸렌트리아민펜타이세트산(DTPA)와 함께 1X PBS를 함유하는 별도의 폴리프로필렌 튜브에 반응혼합물을 옮김으로써 반응을 멈추게 하였다. 방사선표지 항체는 2 내지 8°C에서 저장하였다.

고유방사능은 방사선표지 접합체의 적절한 분취량의 방사능을 측정함으로써 확인하였다. 이 값은 280nm에서의 흡수도로 측정된, 접합체의 단백질 농도와 관련된 계수기 효율에 대하여 보정하고, mCi/mg 단백질로서 나타내었다.

### 5. 이트륨-[90]-2B8-MX-DTPA의 시험관 내 면역반응성

$^{90}\text{Y}$ -표지 접합체의 면역반응성은 린드모가 설명한 전세포 결합분석의 변형판에 근거하여 SOP #SP13-009를 사용하여 측정하였다. 로그상의 농도가 증가함에 따라, CD20-양성 SB 세포 또는 CD20-음성 HSB세포를 2중세트의 1.5mL 폴리프로필렌 튜브에 가하고; 세포의 최종부피를 0.40mL로 하였다. 방사선표지 접합체를 최종 항체 농도가 1 내지 2.5ng/mL가

되도록 희석하고, 0.35mL를 각 튜브에 첨가하였다. 90분 배양한 후, 세포를 원심분리에 의해 펠렛화하고, 상등액을 모았다. 상등액부분에 남은 방사능을 섬광계수기로 측정하였다. 데이터는 세포관련 방사능으로 나눈 첨가된 총 방사능의 양 대 튜브당 세포수의 역으로서 도표화하였다. y축 절편은 면역반응성 분획을 나타낸다.

## 6. 임상적으로 제제화된 이트륨-[90]-2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성

2B8-MX-DTPA 접합체를  $^{90}\text{Y}$ 로 방사선표지하고, 상기 제공된 "믹스 & 슈트" 프로토콜에서 설명된 바와 같이 제제화하였다. 2개 로트의 방사선표지 접합체를 제조하였다: 하나의 로트는 방사선결합 안정성을 평가하기 위하여 사용하였고, 다른 로트는 면역반응성의 보유력을 평가하는데 사용하였다. 제제화된 접합체는 4°C에서 48시간 동안 배양하고, 분취량을 비활원성 SDS-PAGE와 방사선사진을 사용하여 0, 24시간 및 48시간에서 분석하였다. 각 시점에서 면역반응성을 상기 설명한 분석법을 사용하여 평가하였다.

## 7. 인간 혈청의 이트륨-[90]-2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성

$^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA의 안정성을 37°C에서 72시간 이하동안 인간 혈청에서 배양함으로써 평가하였다. 접합된 항체는 이트륨-[90]을 사용하여 방사선표지하고 상기에서 설명한 바와 같이 제제화하였다. 방사선표지 접합체는 정상 인간혈청(열불활성화되지 않은 것)을 사용하여 1:10으로 희석하고, 분취량을 37°C에서 플라스틱 튜브에서 배양하였다. 선택된 시간에, 시료들을 꺼내고 비활원성 SDS-PAGE와 방사선사진에 의해 분석하였다.

## 8. 이트륨-[90]-2B8-MX-DTPA의 생체분포

이트륨-[90]-표지 2B8-MX-DTPA를 8 내지 10주령 BALB/c 마우스에서의 조직 생체분포에 대하여 평가하였다. 방사선표지 접합체를 제조하고 상기 설명한 바와 같이 제제화하였다. 마우스에  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA 5 $\mu\text{Ci}$ 를 정맥주입하고 5마리 마우스의 그룹을 1, 24, 48, 및 72시간에 치사시켰다. 치사시킨 후, 꼬리, 심장, 폐, 간, 신장, 비장, 근육, 대퇴골을 꺼내고, 세척하고, 중량을 측정하였다; 혈액과 피부의 시료도 분석을 위해 꺼냈다. 각 조직시료와 관련된 방사능을 감마계수기를 사용하여 제동복사 방사선을 측정함으로써 확인하고 조직 1g당 %주입투여량과 기관 당 %주입투여량을 확인하였다.

## 9. 방사선량

$^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA를 주입한 마우스를 사용하여 얻어진 생체분포 데이터는 70kg 환자에게 투여된 1.0mCi 투여량으로부터 흡수된 방사선 투여량의 평가를 계산하는데 사용하였다. 핵의학회의 MIRD(Medical Internal Radiation Dose) 위원회에 의해 채택된 방법에 따라 평가하였다. 이 계산은 필립 하간(Phillip Hagan, 캐나다 92161 라 졸라 VA 메티컬 센터 핵의학회)이 하였다.

## 10. 이트륨-[90]-2B8-MX-DTPA의 임상 투여량의 제조를 위한 프로토콜의 검증

("Validation of "Mix-and Shoot" Radiolabelling Protocol for the Preparation of Clinical Doses of  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA"라는 제목의 R&D 보고서 참조; 작자, P. Chinn; 1994. 4. 22)

## C. 결과

### 1. "믹스-&-슈트" 프로토콜을 사용한 이트륨-[90]-2B8-MX-DTPA의 제조

2B8-MX-DTPA와  $^{90}\text{Y}$ 와의 방사선표지반응의 동태학을 평가하는 예비실험은 pH 3.6-4.0에서, 95%의 방사성 동위원소가 5 내지 10분의 반응시간동안 결합된다는 것을 보여주었다. 이어서 이러한 방사선결합의 재생가능성( $95.7\%\pm 1.7\%$ )은 일정비율증가 프로토콜을 위한 검증연구에서 확인하였다("Validation of "Mix-and Shoot" Radiolabelling Protocol for the Preparation of Clinical Doses of  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA"라는 제목의 R&D 보고서 참조; 작자, P. Chinn; 1994. 4.

22). 이 "믹스-&-슈트" 프로토콜을 사용하여  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA를 제조하면 HPLC법으로 제조된 것(BB-IND 4850/4851)과 동등한 생산물이 얻어졌다. 방사선표지 프로토콜은 일반적으로 항체 1mg당 10 내지 15 mCi의 고유방사능으로 재상가능한 것으로 밝혀졌다.

HPLC 프로토콜에 대한 검증작업에 대해 관찰된 55 내지 60%에 비해, 이 프로토콜을 사용하여 제조된  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA의 면역반응성은 일반적으로 70% 이상이었다(도 26). 이 차이는 아마 "믹스-&-슈트"프로토콜을 사용하여 감소된 배양시간때문에 방사선분해의 효과가 감소하기 때문인 것 같다. 이 결과는 일반적이고, 하기에서 논의되는 바와 같이, 방사선표지 접합체의 임상 투여량을 제조하기 위한 일정비율증가 프로토콜에 대한 검증작업을 대표하였다.

## 2. $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성

HPLC법을 사용하여 제조된 비보호  $^{90}\text{Y}$ -표지 항체 접합체를 사용한 예비실험은 방사선분해가 상당한 항체분해와 면역반응성의 손실을 일으킨다는 것을 나타내었다. 따라서, 제제화 완충액은 방사선분해의 효과를 최소화하도록 개발되었다. 인간 혈청 알부민(HSA)은 방사선분해에 기인한 항체분해를 최소화하는데 효과적인 것으로 나타났다. "믹스-&-슈트"법으로 제조된 방사선표지 접합체를 사용하여 평가하여 방사선분해를 최소화함에 있어서 제제화의 효능을 확인하였다. 항체 1mg 당 14.5 mCi의 고유방사능으로 방사선표지  $^{90}\text{Y}$ -표지 항체를 75mg/mL HSA와 1mM DTPA를 함유하는 pH 7.4인 1X PBS에서 제제화하였다. 접합체 2B8-MX-DTPA의 분해를 SDS-PAGE와 방사선사진을 이용하여 0, 24, 및 48시간에서 평가하였다. 도 2, 3, 및 4는 방사선표지 접합체가 4°C에서 배양되었을 때 48시간이상 상당한 분해를 나타내지 않았음을 보여준다. 즉시 박막 크로마토크래피분석은 48시간 배양하는 동안  $^{90}\text{Y}$ 가 손실되지 않았음을 보여주었고; 이 결과는 SDS-PAGE/방사선사진분석에 의해 확인되었다(표 28). 면역반응성은 또한 >88%에서 비교적 일정하였다(표 29).

### [표 28]

인간 혈청 알부민 및 DTPA를 함유하는 PBS에서

"믹스-&-슈트"  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA의 안정성

<u>접합체-관련 방사능 %</u>		
<u>시간(h)</u>	<u>ITLC</u>	<u>SDS/PAGE</u>
0	92.9	96.0
24	95.5	95.4
48	91.3	94.6

### [표 29]

인간 혈청 알부민 및 DTPA를 함유하는 PBS에서

"믹스-&-슈트"  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA의 면역반응성

<u>시간(4°C에서 시)</u>	<u>면역반응성 %</u>
0	87.9
24	88.5
48	90.4

고유방사능 15.7 mCi/mg에서 임상적으로 제제화된  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA는 37°C에서 72시간동안 인간혈청 중에서 배양하였다. 비활원성 SDS-PAGE와 방사선사진에 의해 분석된 시료(도 30)는 배양기간동안 방사성 동위원소의 손실이 없다는 것을 보여주었다(표 30). 시간 0과 72시간에서의 방사선사진의 농도계 스캔은 방사선표지 접합체의 상당한 분해가 없다는 것을 나타내었다(도 31과 32). 이 결과들은 박막 크로마토그래피분석에 의해 확인되었다(표 30). 본 연구에서 사용된 항체의 방사선결합은 표지 프로토콜의 검증연구에서 얻어진 것보다 낫았다. 이 낫은 방사선결합은 방사선표지 항체의 이러한 특별한 제조에 사용되는  $^{90}\text{Y}$  클로라이드의 배치의 저하된 품질때문이었다. 더 낫은 방사선결합은 "믹스-&-슈트" 법으로 제조된 이트륨표지 접합체가 이러한 배양조건 하에서 안정하다는 결론을 바꾸지 못했다.

### [표 30]

인간 혈청에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA 접합체의 안정성

시간(37°C에서 시)	접합체-관련 방사능 %	
	ITLC	SDS-PAGE/방사선사진
0	85.7	88.8
24	76.4	90.0
72	87.6	88.7

$^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA(고유방사능 15.7 mCi/mg)를 함유하는 인간 혈청 시료는 나타

낸 시점에서 즉시 박막 크로마토그래피 스트립 및 SDS-PAGE/방사선사진을 사용하여  
비-단백질 결합  $^{90}\text{Y}$ 에 대해 분석하였다.

### 3. 이트륨-[90]-2B8-MX-DTPA를 사용한 생체분포연구

11.5mCi/mg 항체의 고유방사능과 >95% 이상의 방사선결합을 가진  $^{90}\text{Y}$ -표지 접합체의 생체분포를 BALB/c 마우스에서 평가하였다. 조직내 방사능의 침착을 주요기관, 피부, 근육, 뼈, 소변 및 대변에 대해 72시간 이상 평가하고, 조직 1g당 % 주입투여량 및 기관당 % 주입투여량으로 나타내었다. 표 31 내지 34와 도 33에 나타낸 결과는, 혈액과 관련된 방사능수준이 1시간째 1g당 약 43% 주입투여량(%ID/g)에서 72시간 후 약 16%로 감소하였고; 24시간 또는 그 이후에, 심장, 신장, 및 비장과 관련된 방사능수준은 4 내지 8%로 상당히 일정하게 유지되었음을 보여준다. 폐와 간에 대해, 방사능은 1시간째 10 내지 12%에서 72시간째 8 내지 10%로 감소했다. 피부에 대해서, 방사능은 24시간에서 72시간까지 약 3%로 비교적 일정하였다. 위장관에서의 방사능은 24시간부터 72시간까지 0.5 내지 1%로 일정하였다. 근육에 대한 방사능은 연구과정 전체에서 약 0.6%로 유지되었다. 대퇴골(뼈)에 의한 방사능 흡수는 모든 시점에서 4% 이하로 유지되어, 접합체 제제 내의 유리 이트륨양을 무시할 수 있고 본 연구과정동안 유리 방사선금속이 거의 방출되지 않는다는 것을 나타낸다.

## [표 31]

<sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

1.0시간 후 방사능 분포

평균치 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	1.37 ± 0.053	42.74 ± 0.78	58.52 ± 1.74
심장	0.101 ± 0.01	8.03 ± 3.33	0.82 ± 0.37
폐(2)	0.126 ± 0.01	12.44 ± 0.94	1.56 ± 0.05
신장(1)	0.129 ± 0.01	7.81 ± 1.24	0.997 ± 0.10
간	0.899 ± 0.07	10.08 ± 1.28	9.01 ± 0.52
비장	0.077 ± 0.004	10.74 ± 0.96	0.823 ± 0.04
근육	7.83 ± 0.28	0.44 ± 0.08	3.43 ± 0.51
뼈	2.94 ± 0.11	3.44 ± 0.57	10.11 ± 1.80
피부	2.94 ± 0.11	1.46 ± 0.58	4.24 ± 1.57
G관	2.33 ± 0.08	1.02 ± 0.19	2.36 ± 0.35
소변	--	--	--
대변	--	--	--
총			<b>94.66 ± 3.47</b>

마우스 수 = 3

평균 중량 = 19.58 그램 ± 0.71 그램

## [표 32]

<sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

24시간 후 방사능 분포

평균치 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	<b>1.55 ± 0.12</b>	<b>19.77 ± 2.42</b>	<b>30.77 ± 6.04</b>
심장	<b>0.105 ± 0.01</b>	<b>4.44 ± 0.55</b>	<b>0.47 ± 0.08</b>
폐(2)	<b>0.127 ± 0.02</b>	<b>8.78 ± 1.61</b>	<b>1.11 ± 0.21</b>
신장(1)	<b>0.139 ± 0.01</b>	<b>5.02 ± 0.52</b>	<b>0.69 ± 0.05</b>
간	<b>0.966 ± 0.09</b>	<b>8.62 ± 2.73</b>	<b>8.20 ± 1.97</b>
비장	<b>0.083 ± 0.01</b>	<b>6.75 ± 1.27</b>	<b>0.55 ± 0.064</b>
근육	<b>8.83 ± 0.69</b>	<b>0.692 ± 0.01</b>	<b>6.12 ± 0.52</b>
뼈	<b>3.31 ± 0.26</b>	<b>2.24 ± 0.31</b>	<b>7.47 ± 1.53</b>
피부	<b>3.31 ± 0.26</b>	<b>3.33 ± 0.76</b>	<b>10.88 ± 1.76</b>
GI관	<b>2.89 ± 0.43</b>	<b>0.73 ± 0.09</b>	<b>1.02 ± 0.05</b>
소변			<b>2.31</b>
대변			<b>1.23</b>
		총:	<b>73.52 ± 6.18%</b>

마우스 수 = 3

평균 중량 = 22.09 ± 1.73 그램

## [표 33]

<sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

48시간 후 방사능 분포

중량 평균 ± SD

시료	기관 중량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	1.50 ± 0.14	14.97 ± 5.77	22.53 ± 8.48
심장	0.104 ± 0.01	3.99 ± 1.43	0.415 ± 0.16
폐(2)	0.122 ± 0.02	8.41 ± 1.57	1.04 ± 0.31
신장(1)	0.124 ± 0.01	3.99 ± 1.62	0.49 ± 0.19
간	0.966 ± 0.13	6.12 ± 3.21	5.69 ± 2.25
비장	0.079 ± 0.01	6.05 ± 2.38	0.46 ± 0.16
근육	8.59 ± 0.82	0.54 ± 0.19	4.67 ± 1.67
뼈	3.22 ± 0.31	2.07 ± 0.84	6.65 ± 2.56
피부	3.22 ± 0.31	2.30 ± 0.70	7.34 ± 1.95
GI관	2.63 ± 0.40	0.652 ± 0.30	1.67 ± 0.64
소변	—	—	2.83
대변	—	—	2.06
		총	57.28 ± 17.60

마우스 수 = 3

평균 중량 = 21.48 ± 2.05 그램

## [표 34]

<sup>90</sup>Y-2B8-MX-DTPA를 정상 BALB/c 마우스에 정맥주사하고

72시간 후 방사능 분포

종량 평균 ± SD

시료	기관 종량	% ID/	기관당
	그램	그램	%ID
혈액	1.45 ± 0.07	15.87 ± 4.81	23.14 ± 7.26
심장	0.093 ± 0.01	4.16 ± 1.27	0.392 ± 0.13
폐(2)	0.123 ± 0.02	10.67 ± 3.79	1.30 ± 0.45
신장(1)	0.123 ± 0.01	4.79 ± 1.03	0.596 ± 0.16
간	0.876 ± 0.07	7.26 ± 1.79	6.39 ± 1.76
비장	0.081 ± 0.01	7.37 ± 2.34	0.584 ± 0.16
근육	8.30 ± 0.39	0.67 ± 0.13	5.58 ± 1.22
뼈	3.11 ± 0.15	2.58 ± 0.51	8.05 ± 1.76
피부	3.11 ± 0.15	3.09 ± 0.82	9.66 ± 2.68
GI관	2.59 ± 0.20	0.79 ± 0.18	2.05 ± 0.53
소변	--	--	3.56
대변	--	--	2.82
		총	65.47 ± 14.0

마우스 수 = 3

평균 종량 = 20.76 ± 0.97 그램

#### 4. 방사선량

마우스 생체분포 데이터(표 31 내지 34에서의 %ID/기관값)을 사용하여 <sup>90</sup>Y-표지 접합체에 대해 계산한 "표준" 70kg 인간에 대한 방사선흡수 투여량을 표 35에 나타낸다. 이 결과는 HPLC 방사선표지법을 사용하여 제조된 <sup>90</sup>Y-표지 2B8-MX-DTPA를 사용하여 얻어진 결과와 동등하다.

### [표 35]

주입 후 72시간에 걸친 동물 분포 데이터를 기준으로 한

표준 인간(70Kg)에 균일하게 분포된

이트륨-[90] 표지된 2B-MX의 투여로부터의 방사 선량 평가

방사능의 양 =		1000 마이크로퀴리/환자 투여량	
부신	RADS 0.534	난소 0.534	RADS
방광벽	0.534	췌장 0.534	
위벽	0.534	골격	
소장	1.158	피질골 1.466	
UL 장벽	1.657	소주골 1.466	
LL 장벽	2.380	골수(레드) 4.452	
신장	7.015	골수(옐로우) 2.096	
간	7.149	연골 1.466	
폐	2.157	다른 성분 1.466	
다른 조직		폐부 6.603	
근육	2.646	비장 4.973	
지방	2.646	정소 0.534	
혈액	2.646	갑상선 0.534	
뇌	2.112	자궁(NONGRVD) 0.767	
심장	2.646	전신 1.755	

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

필립 엘 하간(Phillip L. Hagan, MS Nuclear Medicine Service VA Hospital  
San Diego, CA 92161)에 의해 제작된 심포니(Lotus Development Corporation)의 스  
프레드시트 주형을 사용하여 계산함.

#### 5. 이트륨-[90]-2B8-MX-DTPA의 임상 투여량의 제조를 위한 프로토콜의 검증

MPI 파머시 서비스사(MPI Pharmacy Services, Inc)에서 총 10개의 검증 로트를 제조하였다. 각 로트에 대한 테스트 결과를 표 36에 요약한다. 각 테스트 결과에 대한 평균값을 계산하고, 표준편차는 적합한 곳에 기재하였다. 다른 표지시간에 따른 방법의 변수를 평가하기 위하여, 로트 #1에서 #8을 10분 표지시간을 사용하여 제조하고; 로트 #9와 #10을 5분의 반응 시간을 사용하여 제조하였다. 10개의 검증 로트에 대한 시험결과에 근거하여, 방출내역을 설정하였다. 방출내역은 표 37에 요약되어 있다.

[표 36]

“미스-&-슈트”를 사용하여 제조된 다양한  $^{99}\text{Y}$ -표지된 2B8-MK-DTPA의 10개 검증 로트 분석 결과

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	평균
%면역반응률	72.8	93.3	71.7	70.2	60.6	68.2	79.5	72.4	88.2	68.5	74.5± 9.8
내독소( $\text{EU}/\text{mL}$ )	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.162± 0.06
%방사선결합	97.5	97.0	93.5	96.0	94.7	94.9	95.9	96.5	97.5	93.5	95.7± 1.4
혈체농도( $\text{mg/mL}$ )	0.122	0.102	0.088	0.128	0.134	0.119	0.093	0.088	0.111	0.096	0.108± 0.017
방사능( $\text{mCi/mL}$ )	1.22	1.22	0.98	1.26	1.51	1.55	1.06	0.98	1.28	1.02	1.21± 0.21
고유방사능( $\text{mCi/mg}$ )	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											

### [표 37]

"믹스-&-슈트" 프로토콜을 사용하여 제조된

<sup>90</sup>Y-표지된 2B8-MX-DTPA에 대한 방출 내역

시험	내역	방법
면역반응성	$\geq 60\%$	RIA
내독소	$<5\text{EU}/\text{ml}$	LAL
방사선표지 결합	$\geq 90\%$	ITLC
항체 농도	$0.075\text{-}0.150\text{mg/ml}$	$A_{280}$
방사능 농도 <sup>1</sup>	$\geq 6.0 \text{ mCi/ml}$	투여량 눈금측정
고유방사능 <sup>1</sup>	$\geq 9.0 \text{ mCi/ml}$ 항체	$A_{280}/$ 투여량 눈금측정
총 바이알 방사능 <sup>1</sup>	$\geq 6.0 \text{ mCi}$	투여량 눈금측정
pH	6.0-8.0	pH 페이퍼
총 단백질 농도	$65\text{-}85 \text{ mg/ml}$	$A_{280}$
멸균 시험	통과	CFR 610.12

<sup>1</sup>(0시간 눈금측정)

#### D. 토의

<sup>90</sup>Y-표지 2B8-MX-DTPA를 제조하기 위한 원래의 방사선표지 프로토콜은 제제로부터 비단백질 결합 <sup>90</sup>Y를 제거하기 위하여 특히 힘들고 시간이 걸리는 HPLC 정제를 이용하였다. 이 방법을 간단하게 하고 임상 장소에서 사용하기에 더 편하도록 하기 위하여, "믹스-&-슈트"프로토콜이라 명명된 것을 지지하여 HPLC 단계를 제거하기 위해 노력했다. 목표는 접합체 속으로의 방사성 동위원소의 매우 높은 방사선풀합을 일으킬 수 있는 방사선풀합 조건을 확인하여, 정제단계에 대한 필요성을 없애는 것이었다. pH 3.6에서 5 내지 10분 배양으로 >95% 방사선풀합이 얻어질 수 있다는 것을 발견하였다. 이 프로토콜의 추가적인 장점은 면역반응성의 보유력(>70%)이 증가하였다는 것으로, 이것은 아마, 방사선분해에 대해 보호하는 인간 혈청 알부민을 추가하기 전에 고에너지 방사성 동위원소에 항체를 노출하는 시간이 더 짧기 때문인 것 같다. 이러한 면역반응성의 보유력을 HPLC법을 사용하여 관찰된 것보다 우수하다.

4 °C에서 48시간 동안 제제화 완충액(75mg/mL 인간 혈청 알부민과 1mM DTPA를 함유한 1X PBS)에서 배양된 "믹스-&-슈트" 프로토콜을 사용하여 제조된 <sup>90</sup>Y-표지 접합체를 사용한 안정성 연구는 방사성 동위원소의 손실이 없고 면역반응성이 완전히 보유된다는 것을 보여주었다. 37°C에서 72시간동안 인간 혈청을 사용하여 행해진 안정성 연구는 또한 최소한의 방사성 동위원소 손실을 나타내었다. 이를 안정성 결과는 HPLC 프로토콜을 사용하여 방사선표지 접합체에 대해 나타난 것과 동등하다.

"믹스-&-슈트"법으로 제조된 <sup>90</sup>Y-표지 접합체를 사용한 BALB/c 마우스에서의 생체분포는 비정상적 조직 침착이 없다는 것을 나타내었다. 이 결과는 방사선표지 항체가 항체의 생체 내 특성에 극적으로 영향을 미치도록 상당히 변화되지 않

는다는 것을 제시하였다. 또한 이 결과는 방사선표지의 HPLC 법을 사용하여 제조된 방사선표지 접합체를 사용하여 이전에 얻어진 결과와 동등하다(BB-IND 4850/4851 참조). 마우스에 대한 생체분포 데이터로부터 계산된 "표준" 70kg 인간에 대한 방사선량 평가는 HPLC 절차를 사용하여 방사선표지 접합체를 사용하여 얻어진 것과 일치한다(BB-IND 4850/4851 참고). 또한, 방사선량 결과는 주입 투여량 mCi 당 비교했을 때, 진행중인 임상실험(IDEA 연구 #1315)에 기록된 환자에 대해 얻어진 결과와 동등하다. 본 연구에서 6명의 환자에 대해, 전신, 심장, 간, 및 비장에 대한 평균값(rads  $\pm$  SD)은 각각 1.40 $\pm$ 0.57, 10.50 $\pm$ 4.68, 9.89 $\pm$ 8.91, 및 9.75 $\pm$ 6.00이었다.

임상등급  $^{90}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA를 제조하기 위한 "믹스-&-슈트" 표지 프로토콜을 실행하기 전에, 프로토콜의 재생가능성을 평가할 필요가 있었다. 따라서, 10개의 검증 로트를 다른 로트의  $^{90}\text{Y}$  클로라이드를 사용하여 제조하였다. 제조된 10개의 로트에 대해, "믹스-&-슈트"법을 사용하여 얻어진 면역반응성 값은 60.6% 내지 93.3%의 범위이고, 평균은 74.5%이고 중앙값은 72.1%였다. 면역반응성의 이러한 보유력은 현재 사용되는 HPLC 방법을 사용하여 이전에 얻어진 약 60% (54.9% 내지 65.1%의 범위; 60.2%의 평균)보다 상당히 우수하다. 10개의 로트에 대한 평균 방사선결합은 95.7%(93.5% 내지 97.5%의 범위)였다. 이 값은 HPLC법을 사용하여 이전에 나타난 값(91.7% 내지 93.7%의 범위 및 93.1%의 평균)과 동등하다. 또한, 내독소, 항체농도, 방사능 농도, 고유방사능, 총 바이알 방사능, 총 단백질 농도, pH, 및 무균성에 대한 결과는 10개의 로트에 대해 동등하였다. 또한, 이 결과는 "믹스-&-슈트"법의 재생가능성을 확인하였다. 또한, 우리는 5 내지 10분 동안 반응을 행하면서 다른 표지시간에 기인한 반응의 변이를 평가하였다. 2 반응시간에 대한 명백한 차이가 없었기 때문에, 더 짧은 배양시간이 최종 프로토콜에 사용될 수 있다고 판단하였다.

## E. 요약

우리는 비단백질 결합 방사성 동위원소를 제거하기 위하여 현재 사용되는 HPLC 단계에 대한 필요성을 없애는 임상 투여량의  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA를 제조하기 위하여, "믹스-&-슈트"법이라 불리는 표지절차를 개발하였다. 단순화된 프로토콜은 고수준의 방사성 동위원소 결합(>95%) 및 개선된 면역반응성의 보유력(>70%)을 유지하면서 이 어려운 정제단계를 없앤다. 임상적으로 제제화된 방사선표지 접합체는 방사성 동위원소와 면역반응성의 보유력에 근거하여 4°C에서 48시간 동안 배양했을 때 시험관 내에서 안정한 것으로 밝혀졌다. 또한 방사선표지 접합체는 37°C에서 72시간동안 인간혈청 중에서 배양했을 때 안정하였다. BALB/c 마우스에서의 생체분포연구는 뼈를 포함하여, 비정상적 조직 침착을 나타내지 않았다. "표준" 70kg 인간에 대한 방사선 흡수 투여량의 평가는  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA를 사용하여 진행중인 임상실험에서 얻어진 것과 동등하였다. 이 연구의 결과는 "믹스-&-슈트"프로토콜을 사용하여 생산된  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA가 종래의 HPLC방법을 사용하여 제조된 것과 동등하다는 것을 보여주었다. 임상등급 방사선표지 접합체를 제조하기 위한 일정비율증가 프로토콜의 검증은 이 방법이 재생가능하고 그 산물이 현재 사용되는 HPLC법을 사용하여 제조된 것과 동등하다는 것을 보여주었다. 이러한 임상전 연구의 결과는 이 신규한 "믹스-&-슈트"프로토콜이 임상실험에 사용하기에 적합한  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA를 제조하는데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

## 실시예

### 실시예 1. 방사선결합 - 키트와 분석

#### I. 요약

본 발명의 목적은  $^{111}\text{In}$  및  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA(각각 In2B8 및 Y2B8)를 제조하기 위한 방사선표지 키트 프로토콜을 발명하고 임상제품을 위한 방출내역을 설정하는 것이었다. 방사선표지 키트 프로토콜은 항원-양성 SB세포에 대한 결합 및 방사선결합과 관련하여 재생가능하고, 임상실험에 사용하기 위한 방사선표지 키트의 적합성을 나타낸다. 방사선결합 및 결합에 대한 In2B8 및 Y2B8 방출내역은 각각  $\geq$ 95% 및  $\geq$ 70%로 설정되는 것이 바람직하다.

#### II. 도입

현재  $^{90}\text{Y}$ -표지 쥐의 모노클로날 항-CD20 항체(Y2B8)를 재발된 B-세포 림프종의 치료를 위한 임상실험에서 평가하고 있다. 이트륨 동위원소는 시스템을 이미지화하는 것을 부적합하게 만드는 감마성분이 없다. 따라서,  $^{111}\text{In}$ -표지 2B8-MX-DTPA(In2B8)를 이트륨-표지 치료제를 사용한 치료 전 또는 후에 환자에서의 종양 위치와 방사선량을 평가하는데 사용할 것이다. "믹스-&-슈트"법이라 불리는 Y2B8과 In2B8을 제조하기 위하여 현재 사용되는 프로토콜은 임상연구에 적합한 방사선표지 항체를 생산한다. 그러나 표지방법의 단순화는 임상적 세팅에서의 투여량 제조를 촉진할 것이다.

신규한 방사선표지 키트는 1) 2mg/mL의 저금속 일반 식염수 중의 2B8-MX-DTPA, 2) 적합한 표지 pH까지 방사성 동위 원소 용액을 조절하는데 사용되는 5mM 소디움 아세테이트, 3) 제제화 완충액(7.5% 인간 혈청 알부민과 1mM DTPA를 함유한 pH 7.4인 1X PBS), 4) 빈 10mL 유리 바이알(반응바이알)을 포함하는 것이 바람직하다. 모든 성분을 시험하여 무균 및 무발열원임을 확인하였다.

이 보고서는 사용하기에 쉽고 단순하며, ≥95% 방사선풀합 및 항원-양성 세포에 대한 결합의 허용가능한 보유력을 가진 방사선표지 항체를 생산하는 이러한 방사선표지 키트의 검증을 요약한다. 방출시험내역은 임상산물에 대해 바람직하다.

### III. 방사선풀합을 위한 재료 및 방법

#### A. 방사선표지 키트에서의 시약

1. 2B8-MX-DTPA, IDEC; 로트# 082395RM2
2. 50mM 소디움 아세테이트, 저금속, IDEC; 로트# 082395RM3
3. 제제화 완충액(7.5%(w/v) 인간 혈청 알부민과 1mM DTPA를 함유한 pH 7.4인 1X PBS), IDEC, 로트# 082395RM1
4. 반응바이알, 10mL, IDEC

#### B. 재료 및 장치

1. 바이오덱스 텍트-컨트롤 방사선풀합 키트 (Biomedex Tec-Control Radioincorporation Kit), Cat.#151-770
2. 장갑 : 무파우더
3. 멸균 폴리프로필렌 주사기
4. 멸균 주사바늘
5. 마개달린 작은 튜브; 1.5mL

#### C. 방법

##### 1. 방사선표지 키트를 사용한 Y2B8 및 In2B8의 제조

키트시약을 제조하여 유리격벽 바이알 속에 채웠다. 타입 I 보로실리케이트 바이알(2 또는 10mL)을 멸균 주입수(WFI)로 헹구고 충진 전에 오토클레이브하였다. 부틸고무 격벽 멸균 WFI로 세정하고 사용 전에 오토클레이브하였다. 시약은 클레스 100실에서 손으로 채워서 모양을 잡고 USP법을 사용하여 발열원과 무균성에 대해 시험하였다.

##### a. In2B8의 제조

추가시약:

1. 인듐-[111]: 클로라이드염, 무담체, HCl 중

주의사항 :

1. 모든 단계는 무균기술을 사용하여 수행하는 것이 바람직하다.
2. 방사선표지 키트 성분은 사용하기 전에 실온이 되도록 하여야 한다.
3. 최종 산물은 하기 단계 9를 완성하고 8시간 내에 환자에게 투여하여야 한다.

## In2B8 방사선표지 프로토콜

## 절차

1. 반응바이알에 첨가된  $^{111}\text{InCl}_3$ 의 부피는 다음과 같이 계산하였다:

a. 방사선표지 시간에서의 방사능의 농도(mCi/ml)

$$C_0 = \text{눈금의 시간에서의 방사능 농도 (제조자의 분석증명서를 참조)}$$

$\Delta t$  = 시간의 변화 (양수는 눈금 후이고, 음수는 눈금 전이다)

$$\frac{C_o}{e0.0103(\Delta t)}$$

b. 반응 바이알에 첨가하는  $^{111}\text{InCl}_3$ 의 부피

$$\frac{5.5mCi}{표지시간에서의방사능농도} = \text{반응바이알에 첨가하는부피}$$

2. 반응바이알에 첨가하는 50mM 소디움 아세테이트의 부피는 아래와 같이 계산하였다:

$$\text{첨가된 } ^{111}\text{InCl}_3 \text{의 부피(단계 1b)} \times (1.2) = \text{첨가하는 50mM 소디움 아세테이트의 부피}$$

3. 반응바이알의 격벽과 50mM 소디움 아세테이트 바이알을 알콜로 닦았다. 1cc 주사기를 사용하여, 계산된 부피의 50mM 소디움 아세테이트(단계 2)를 반응 바이알로 옮겼다.

4.  $^{111}\text{InCl}_3$  공급원의 격벽을 알콜로 닦았다. 멀균 0.2 $\mu\text{m}$  필터가 장착된 바늘을 사용하여 바이알에 구멍을 뚫었다. 1cc 멀균주사기를 사용하여, 필요한 부피(단계 1b)의  $^{111}\text{InCl}_3$ 를 반응 바이알로 옮겼다. 바이알 수회 뒤집어 혼합하였다.

5. 2B8-MX-DTPA 바이알의 격벽을 알콜로 닦았다. 1cc 주사기를 사용하여, 1.0mL의 2B8-MX-DTPA를 반응바이알로 천천히 옮겼다. 바이알을 수회 뒤집어 혼합하였다.

6. 반응은 주변온도에서 30분±5분동안 진행시켰다.

7. 반응혼합물의 총부피는 첨가된  $^{111}\text{InCl}_3$ 의 부피(단계 4), 첨가된 50mM 소디움 아세테이트의 부피(단계 3) 및 첨가된 2B8-MX-DTPA의 부피(단계 5)를 더하여 계산하였다.

8. 10mL의 최종부피를 얻기 위하여 반응바이알에 첨가된 제제화 완충액의 부피는 10에서 단계 7에서 계산된 총량을 빼서 계산하였다.

9. 제제화 완충액 바이알을 알콜로 씻고, 바이알에 구멍을 뚫었다. 제제화 완충액의 점성때문에, 반응바이알을 0.2 $\mu\text{m}$  주사기 필터가 장착된 바늘을 사용하여 구멍을 뚫었다. 적절한 게이지 바늘이 장착된 10cc 멀균 주사기를 사용하여, 단계 8에서 계산된 제제화 완충액의 부피를 반응 바이알로 옮겼다. 구멍낸 바늘을 반응 바이알에서 제거하고 바이알을 수회 뒤집어 혼합하였다(최종산물). 이 바이알을 "방사선풍선"하기 전에 5분 이상 배양하였다. 용액의 색은 황갈색이었고, 바이알이 가득차서, 제제화 완충액이 첨가된 것을 확인하였다.

10. 최종산물 바이알의 총 방사능을  $^{111}\text{In}$  측정을 위한 적절한 장비세트를 사용하여 측정하였다.

11. "결합분석" 및 "방사선결합분석"을 위해 최종산물을 즉시 2 내지 8°C에서 저장하였다.

b. Y2B8의 제조

추가시약

1. 이트륨-[90]: 클로라이드염, 무담체, HCl 중

주의사항

1. 모든 단계는 무균기술을 사용하여 수행해야 한다.

2. 방사선표지 키트 성분은 사용하기 전에 실온이 되도록 하여야 한다.

3. 최종 산물은 하기 단계 8를 완성하고 8시간 내에 환자에게 투여하여야 한다.

Y2B8 방사선표지 프로토콜

1. 반응바이알에 첨가된  $^{90}\text{YCl}_3$ 의 부피는 다음과 같이 계산하였다:

a. 방사선표지 시간에서의 방사능의 농도

$C_0$ = 눈금의 시간에서의 방사능 농도 (제조자의 분석증명서를 참조)

$\Delta t$  = 시간의 변화 (양수는 눈금 후이고, 음수는 눈금 전이다)

$$\text{표지시간에서의방사능농도} = \frac{C_0}{e0.0108(\Delta t)}$$

b. 반응 바이알에 첨가하는  $^{90}\text{YCl}_3$ 의 부피

$$\frac{45mCi}{\text{표지시간에서의방사능농도}} = \text{반응바이알에 첨가하는부피}$$

2. 반응바이알에 첨가하는 50mM 소디움 아세테이트의 부피는 아래와 같이 계산하였다:

a. 0.040M HCl 중의  $^{90}\text{YCl}_3$  (아미 sham)에 대해 :

$^{90}\text{YCl}_3$  부피(단계 1b)  $\times (0.8) =$  첨가하는 소디움 아세테이트의 부피

b. 0.050M HCl 중의  $^{90}\text{YCl}_3$  (노르디온)에 대해 :

$^{90}\text{YCl}_3$  부피(단계 1b)  $\times (1.0) =$  첨가하는 소디움 아세테이트의 부피

3. 반응바이알의 격벽과 소디움 아세테이트 바이알을 알콜로 닦았다. 1cc 주사기를 사용하여, 계산된 부피(단계 1a 또는 1b)의 50mM 소디움 아세테이트(단계 2)를 반응 바이알로 옮겼다. 바이알을 수회 뒤집어 혼합하였다.

4.  $^{90}\text{YCl}_3$  공급원 바이알의 격벽을 알콜로 닦았다. 바이알을 멸균  $0.2\mu\text{m}$  필터가 장착된 바늘을 사용하여 구멍을 뚫었다. 1cc 멸균주사기를 사용하여, 필요한 부피(단계 1b)의  $^{90}\text{YCl}_3$ 을 반응 바이알로 옮겼다. 바이알 수회 뒤집어 혼합하였다.

5. 2B8-MX-DTPA 바이알의 격벽을 알콜로 닦았다. 3cc 멸균주사기를 사용하여, 1.5mL의 2B8-MX-DTPA를 반응바이알로 옮겼다. 바이알을 수회 뒤집어 혼합하였다.

6. 반응혼합물의 총부피는 첨가된 Y-[90] 클로라이드의 양(단계 4), 첨가된 50mM 소디움 아세테이트의 양(단계 3) 및 첨가된 2B8-MX-DTPA의 양(단계 5)을 더하여 계산하였다.

7. 10mL의 최종부피를 얻기 위하여 반응바이알에 첨가하는 제제화 완충액의 부피를 10에서 단계 6에서 계산된 총반응부피를 빼서 계산하였다.

8. 제제화 완충액 바이알을 알콜로 씻고, 바이알에 구멍을 뚫었다. 제제화 완충액의 점성때문에, 바늘을 사용하여 반응바이알에  $0.2\mu\text{m}$  주사기 필터가 장착되었다. 적절한 게이지 바늘이 장착된 10cc 멸균 주사기를 사용하여, 단계 7에서 계산된 제제화 완충액의 부피를 반응 바이알로 옮겼다. 구멍낸 바늘을 반응 바이알에서 제거하고 바이알을 수회 뒤집어 혼합하였다(최종산물). 이 바이알을 "방사선결합분석"하기 전에 5분 이상 배양하였다. 용액의 색은 황갈색이었고, 반응바이알이 가득차서, 제제화 완충액이 첨가된 것을 확인하였다.

9. 최종산물 바이알의 총 방사능을  $^{90}\text{Y}$  측정을 위한 적절한 장비 세트를 사용하여 측정하였다.

10. 환자투여를 위해 필요할 때까지 최종산물을 즉시 2 내지 8°C에서 저장하였다.

11. 면역반응성 시험 :

1mL 주사기를 사용하여, 0.1mL를 반응바이알에서 무균적으로 꺼내어 별도의 1.5mL 나사마개 튜브에 옮겼다. "결합분석" 및 "방사선결합분석"을 위하여 튜브를 즉시 2 내지 8°C에서 저장하였다.

방사선표지 키트 프로토콜의 검증은 IDEC 파마슈티컬즈(IDECA Pharmaceuticals, 캘리포니아주 샌디에고), MD 앤더슨 헬스 센터(MD Anderson Health Center, 텍사스주 휴스턴), 마요 클리닉(Mayo Clinic, 미네소타주 로체스터) 및 시티 오브 호프(City Of Hope, 캘리포니아주 듀어트)에서 행하였다. 임상등급 2B8-MX-DTPA를 포함하여 모든 키트 성분은 GMP 조건(Good Manufacturing Conditions, 연방규정에 따른 우수제조조건) 하에서 IDEC 파마슈티컬즈에서 제조하였고, 무균 및 무발열원이 되도록 하였다.

방사선표지 항체를 7.5%(w/v) 인간 혈청 알부민(HSA; 임상등급; Baxter-Hyland) 및 1mM DTPA를 함유한 1X PBS로 제제화하였다. 각 검증 로트에 대하여 행한 방출시험의 결과를 아래에서 설명한다.

In2B8과 Y2B8의 각각 6개의 검증 로트를 5명의 조작자가 제조하였다. 로트들은 다음과 같이 지정하고 다음 시설에서 행하였다.

#### In2B8 :

#1 : IDEC 파마슈티컬즈

#2 : IDEC 파마슈티컬즈

#3 : IDEC 파마슈티컬즈

#4 : MD 앤더슨 헬스 센터

#5 : 마요 클리닉 (Mayo Clinic)

#6 : 시티 오브 호프

### Y2B8 :

#1 : IDEC 파마슈티컬즈

#2 : IDEC 파마슈티컬즈

#3 : IDEC 파마슈티컬즈

#4 : MD 앤더슨 헬스 센터

#5 : 마요 클리닉

#6 : 시티 오브 호프

### 2. 동결건조된 SB세포와 HSB 세포의 제조

인간 세포주 SB(CD20-양성) 및 HSB(CD20-음성)를 ATCC에서 입수하여 2% 글루타민이 보충된 10% 우태아혈청을 함유하는 RPMI-1640을 사용하여 T-플라스크에서 배양하였다. 배양액을 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 유지하였다. 세포들을 일반적으로 하루걸러 1:2로 분할하고, 0.5 내지 2.5×10<sup>6</sup> 세포/mL 및 >80% 생존력으로 모았다. 세포농도는 혈구계를 사용하여 측정하고 생존력은 트리판 블루 배제법으로 측정하였다.

세포들을 주변온도에서 원심분리(Sorvall 원심분리기에서 1300rpm)에 의해 0.5 내지 2×10<sup>6</sup> 세포/mL의 세포농도로 모으고, 1X HBSS로 2회 세척하였다. 펠렛화된 세포를 1%(w/v) 소혈청알부민(BSA)과 10%(w/v) 만니톨(동결건조 완충액)을 함유한 1X HBSS에 50×10<sup>6</sup> 세포/mL로 재현탁하고, 0.5mL를 o-링 개스킷을 가진 1.5mL 폴리프로필렌 마이크로퓨즈튜브에 나누어 -70°C에서 저장하고 30 내지 60 밀리토르에서 밤새 동결건조시켰다. 동결건조된 세포의 튜브를 2 내지 8°C에서 건조시켜 저장하였고 분석을 위하여 멸균수에 재구성하였다; 마이크로퓨즈 튜브내에서 동결건조된 세포의 튜브를 건조제와 함께 저장하였다.

### 3. 분석

In2B8과 Y2B8의 검증 로트를 시험하는데 사용되는 분석방법을 아래에서 설명한다. 다음 분석은 각 검증 로트에 대해 행해졌다:

1. 동결건조된 SB세포를 사용한 결합분석

2. 바이오텍스 키트(Biodex Kit)를 사용한 Y2B8/In2B8 방사선결합분석

#### a. 결합분석

In2B8과 Y2B8에 각각에 대하여 하기 프로토콜에 따라 각 조작자가 동결건조된 CD20-양성 SB세포를 사용하여 %결합을 평가하였다. 이 분석은 방사선표지 항체가 여전히 CD20을 항원으로 인식한다는 것을 확인하는 신속하고 효과적인 방법을 제공한다. 임상 장소에서, CD20-음성 HSB세포를 또한 평가하였다. 동결건조된 세포를 상기 방법, "동결건조된 SB 및 HSB 세포의 제조"에 따라 제조하여 저장하였다.

#### i. In2B8 결합분석

추가시약

1. 인듐-[111]-2B8-MX-DTPA
2. 동결건조된 SB세포;  $25 \times 10^6$  세포/튜브를 함유하는 3개의 튜브
3. 동결건조된 HSB세포;  $25 \times 10^6$  세포/튜브를 함유하는 3개의 튜브
4. 관주용 멸균수 또는 주입용 멸균수
5. 희석 완충액(1% 소혈청알부민(BSA)과,  $0.2\mu\text{m}$ 로 여과되어 실온에서 저장된 0.02% 소디움 아자이드를 함유한 pH 7.2 내지 7.4인 1X PBS)
6. 방사능을 측정하기 위한 유리 또는 플라스틱 시험 튜브

절차

#### 분석설정(비방사성부분)

1. 동결건조된 SB 및 HSB세포 3개 튜브를 입수했다.
2. 0.50mL 부피의 SWFI(sterile water for injection)를 각 튜브에 첨가하고, 균일한 혼탁액이 얻어질 때까지 튜브를 흔들었다.
3. 4개의 빈 1.5 mL 마이크로퓨즈 튜브. 튜브 3개에 0.5mL의 희석 완충액을 첨가하고, 세포가 없는 대조구로 하였다.
4. 다른 1.5 mL 마이크로퓨즈 튜브에, 0.99mL의 희석 완충액을 첨가하고; 이 튜브를 1:100으로 표지하였다.
5. 마개달린 50mL 멸균 폴리프로필렌 튜브를 입수하여 그 튜브에 10mL의 희석 완충액을 첨가하였다.

#### 분석설정(방사성부분)

1. 2 내지 8°C에서 저장된 방사선표지 항체를 입수하였다.
2. 0.01mL의 부피를 P20으로 취해 0.99mL의 희석 완충액을 함유하는 1.5mL 마이크로퓨즈 튜브에 첨가하였다(1:100 희석). 팁을 헹구고 튜브를 부드럽게 흔들어 혼합했다.
3. 1:100 희석 튜브로부터 0.20mL 부피를 P200으로 취하고 10mL의 희석 완충액을 함유하는 원뿔형 튜브에 첨가하였다. 튜브를 완전히 혼합하였다.

#### 분석프로토콜

1. 희석된  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-DTPA 0.50mL를 모든 튜브에 첨가하였다.
2. 모든 튜브에서 마개를 완전히 닫고, 튜브를 연속하여 60분간 혼합하였다.
3. 주변온도에서 60분 배양 후, 모든 튜브를 최소 2000g에서 5분간 원심분리하였다.
4. 각 상등액 0.75mL를 계수장치에 적합한 튜브로 옮겼다.
5. 튜브에서의 방사능을 배경을 조절하면서, 감마계수기를 사용하여 측정하였다.

#### ii. Y2B8 결합분석

## 추가시약

1.  $^{90}\text{Y}$ 2B8-MX-DTPA
2. 동결건조된 SB 세포
3. 관주용 멸균수 또는 주입용 멸균수
4. 희석 완충액(1% 소혈청알부민(BSA)과 0.02% 소디움 아자이드를 함유한 pH 7.2 내지 7.4인 1X PBS)

절차:

### 방사선표지 항체 시료제조

1. 2 내지 8°C에서 저장된 방사선표지 항체를 입수하였다.
2.  $10\mu\text{l}$ 의 부피를 P20으로 취해  $990\mu\text{l}$ 의 희석 완충액(1:100 희석)를 함유하는 1.5mL 마이크로튜즈 투브에 첨가하였다. 팁을 헹구고, 투브를 약하게 흔들었다.
3. 마개달린 50mL 멸균 폴리프로필렌 투브를 입수하고, 10mL 혈청학 피펫을 사용하여 투브에 10mL의 희석 완충액을 첨가하였다.
4. 1:100 희석투브에서  $35\mu\text{l}$  부피를 P200을 사용해 취하고 10mL 희석 완충액을 함유하는 원뿔형 투브에 첨가하였다. 완전히 혼합.

### 동결건조세포제조

1. 동결건조된 SB세포 3개 투브를 입수했다.
2. 0.50mL 부피의 SWFI를 각 투브에 첨가하고, 단일 세포 혼탁액이 얻어질 때까지 투브를 흔들었다.
3. 3개의 빈 1.5 mL 마이크로튜즈 투브를 입수하였다; 투브 3개에 0.5mL의 희석 완충액을 첨가하고, 세포가 없는 대조구로 하였다.

### 분석 프로토콜

1. 희석된  $^{90}\text{Y}$ 2B8-MX-DTPA 0.5mL를 각 투브에 첨가하였다.
2. 마개를 완전히 닫은 후, 투브의 끝을 혼합기 위에 45분 동안 놓아두었다.
3. 주변온도에서 45분 배양 후, 5분간 미세원심분리하여 세포를 펠렛화하였다.
4. 상등액 0.8mL를 섬광 바이알에 옮겼다.
5. 섬광 칵테일을 각 바이알에 첨가하였다.
6. 각 바이알에서의 방사능의 양을 배경을 조정하면서 섬광계수기를 사용하여 측정하였다.

#### b. 방사선풀합분석

하기 프로토콜에 따라 바이오텍스 테크-컨트롤 방사선풀합분석 키트를 사용하여 즉시 박막크로마토그래피(ITLC)에 의해 % 방사선풀합을 측정하였다.

## 추가재료 및 장치

1.  $^{111}\text{In}$  또는  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA

2. 방사능 TLC 스트립 계수용 튜브

3. 가위

4. 멀균주사기, 1cc

5. 멀균바늘, 26G

6. 감마계수기 또는 섬광계수기

7. 피페터

절차:

1. 먼저 전체적인 바이오덱스 조작매뉴얼을 읽어야 한다.

2. 키트 지시에 따라 각 방사선표지 시료를 3중으로 시험하였다; 바이알 당 하나의 스트립을 전개시켰다.

3. 크로마토그래피 스트립에 방사선표지 시료를 점적하기 위하여, 피페터로 출발선에  $1\mu\text{l}$ 를 점적하였다. 선택적으로, 멀균 1cc 주사기에 부착된 26G 바늘에서 나온 작은 한방울을 점적할 수 있다.

4. 적합한 계수기, 즉,  $^{111}\text{In}$ 용 감마계수기 및  $^{90}\text{Y}$ 용 섬광계수기를 사용하여 배경을 조절하면서 각 부분의 방사능을 계수하였다.

5. 방사선표지 항체의 %를 계산하기 위한 바이오덱스지시를 따랐다.

## IV. 결과

In2B8 또는 Y2B8의 각 검증 로트에 대한 시험결과가 표 38과 39에 요약되어 있다.

## [표 38]

Y2B8 검증을 위한 방출 분석 결과

Lot 번호	%방사선결합	%결합
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
평균 = 98.8		평균 = 82.3
표준 편차 = 1.24		표준 편차 = 3.4
% CV = 1.25%		CV = 4.2%

## [표 39]

In2B8 검증을 위한 방출 분석 결과

Lot 번호	%방사선결합	%결합
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
평균 = 99.0		평균 = 85.2
표준 편차 = 0.43		표준 편차 = 2.06
% CV = 0.45%		CV = 2.42%

## V. 토의 및 결론

In2B8 및 Y2B8에 대한 현재 사용되는 방사선표지 방법을 단순화하기 위하여, 4성분 키트를 개발하였다. 소디움 아세테이트와 2B8-MX-DTPA의 농도를 각각 50mM과 2mg/mL로 감소시켜, 주사기를 사용해 정확한 부피를 옮길 수 있도록 하였다. 모든 키트성분은 유리격벽 바이알에 채우고 방출 전 IDEC에 의해 무균성과 발열원에 대하여 시험하여, 임상 장소에서 이러한 시험을 할 필요가 없도록 하는 것이 바람직하다. 임상 장소에서, 모든 시약 조작은 멸균 주사기와 바늘을 사용하여 행해진다. 따라서, 방사선험학 환경에서 통상적으로 발견되는 무균기술에 대한 집착은 방사선표지되고 제제화된 항체가 환자투여에 적합하다는 것을 보증한다.

In2B8 및 Y2B8에 대한 방사선표지 프로토콜의 까다로움과 재생가능성을 각 방사성 동위원소의 다른 로트를 사용하여 수회 검증작업을 행함으로써 평가하였다. 제조된 In2B8의 6개 검증 로트에 대하여, 결합은 82.1% 내지 86.8% 범위이고 평균이 85.1%였다; 방사선결합값은 약 99%(98.3% 내지 99.4%)였다. 제조된 Y2B8의 6개 검증 로트에 대하여 얻어진 %결합은 78.6% 내지 87.0%였고 평균은 82.3%였다. Y2B8에 대한 방사선결합값은 평균 98.8%(96.3% 내지 99.5% 범위)였다. 이들 결과는 함께 In2B8 및 Y2B8 모두를 제조하는데 방사선표지 키트 방법의 까다로움과 재생가능성을 확인한다. 이러한 검증 결과에 근거하여, 방사선결합 및 결합에 대한 방출내역은 In2B8 및 Y2B8 모두에 대해 각각 ≥95% 및 ≥70%에서 설정되는 것이 바람직하다.

또한, 사용상 편리성이 증가되고 제조하는 동안 잘못될 가능성이 감소하기 때문에, 동결건조된 CD20-양성 세포와 방사선풀합을 사용한 %결합은 임상 장소에서 In2B8 및 Y2B8의 방출시험에 사용하기에 바람직하다.

요약하면, 이 결과는 함께, 방사선표지 키트를 사용하여 제조된 In2B8 및 Y2B8가 임상 장소에서 사용하기에 적합하다는 것을 나타낸다. 또한, 양 방사선표지 항체에 대하여, 방출내역은 5명의 다른 조작자에 의한 수회의 검증작업의 결과를 반영하여 설정된다.

## 실시예 2. 방사선풀합과 결합 - 키트 및 분석

### I. 요약

2B8로 명명된 쥐의 항-CD20 모노클로날 항체를 CHO세포에 클로닝하여 고발현 세포주를 만들었다. CD20-양성 인간 세포에 대한 CHO-유래 항체의 특이성을 FACS 분석과 경쟁결합에 의해 확인하였다. 인간 T-세포에 대해서는 무시해도 좋을 결합이 관찰되었다. CD20-양성 세포에 대한 항체의 친화력은 경쟁결합분석을 사용하여  $1.3 \times 10^6 M$ 이라는 것을 확인하였다. 항체는 킬레이트제 MX-DTPA와 반응하여 면역반응성의 손실을 무시해도 좋은 접합체인 2B8-MX-DTPA를 형성하였다(친화력값은  $4.4 \times 10^{-10} M$ 이었다).  $^{111}\text{In}$ 의 방사선풀합을 측정함으로써 확인된 바와 같이, 최적 킬레이터 접합은 8시간 반응 후 이루어졌다. 2B8-MX-DTPA용 방사선표지 프로토콜은 pH 및 배양시간과 관련하여  $^{90}\text{Y}$  또는  $^{111}\text{In}$ 에 대해 최적화되어 최대 방사선풀합(≥95%)과 면역반응성의 보유력(≥70%)을 보증하였다. 임상실험에서 CHO-유래 2B8-MX-DTPA를 사용하여 제조된 In2B8 및 Y2B8의 방출내역은 방사선풀합(≥95%)과 동결건조되고 재구성된 CD20-양성 인간 세포에 대한 결합(≥70%)에 대해 바람직하였다. 이 결과를 합하면, 임상실험에서 사용하기 위한 CHO-유래 2B8-MX-DTPA의 적합성을 나타낸다.

### II. 도입

앞에서 사용된 2B8 항체를 중공섬유 생물반응기에서 생산하였다. 이 항체의 제조비용을 낮추기 위하여, CHO 세포에 클로닝하여 발현시켜 고발현 생산 세포주를 얻었다. 이 실시예는 CHO-유래 2B8 항체, 접합된 항체(2B8-MX-DTPA), 및 임상적 방사선표지 키트 프로토콜을 사용하여 제조된  $^{90}\text{Y}$  및  $^{111}\text{In}$ -표지 항체 생산물의 시험관내 특성화의 결과를 설명한다.

### III. 재료 및 방법

#### A. 시약

인간 세포주 SB(CD20-양성) 및 HSB(CD20-음성)를 ATCC로부터 입수하여 2% 글루타민이 보충된 10% 우태아혈청을 함유하는 RPMI-1640을 사용하여 T-플라스크에서 배양하였다. 배양액을 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 유지하였다. 세포들을 일

반적으로 하루걸려 1:2로 분할하고, 0.5 내지  $2.5 \times 10^6$  세포/mL 및 >80%의 생존력으로 모았다. 세포농도는 혈구계를 사용하여 측정하고 생존력은 트리판 블루 배제법으로 측정하였다. 세포 로트에 대한 특별한 정보는 노트북 #1553과 바인더(제목 : "Cell Activity Logbook 1995 & 1996", Ron Morena 저)에 기록한다.

CHO-유래 2B8을 IDEC 제조설비에서 GMP 조건하에서 생산하였다. 항체를 11.5mg/ml의 저금속 일반 식염수에서 제제화하였다. SDS-PAGE에 의해 항체가 균일하다는 것을 확인하였다. 2B8-MX-DTPA를 CHO-유래 2B8로부터 PSBR-043에 따라 GMP 조건 하에서 생산하고, 2mg/mL로 저금속 식염수에서 제제화하였다(로트 # 0165A 및 0165B).

의약등급  $^{111}\text{In}$  클로라이드를 아머샴(U.K.) 또는 사이클로트론 프로덕츠 인코포레이티드(Cyclotron Products Inc.)(플로리다주 코랄 케이블즈)에서 구입하였다. 이트륨[90] 클로라이드는 아머샴(U.K.), 노르디온 인터내셔널(캐나다, 카나타), 또는 퍼시픽 노스웨스트 내셔널 레보레이토리(Pacific Northwest National Laboratory)(워싱턴주 리치랜드)에서 구입하였다. GMP 하에서 제조된 MX-DTPA는 하우저 캐미컬(Hauser Chemical)(콜로라도주 보울더)에서 구입하였다. 임상등급 칼슘 트리나트륨 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA)는 헤일(Heyl)(독일 베를린)에서 입수하였다. TAG-NHS는 아이젠 인코포레이티드(IGEN Inc.)(매릴랜드주 로크빌)에서 입수하였다. 쥐의 항-CD-19 비드는 다이널 인코포레이티드(Dynal Inc.)(뉴욕주 레이크 석세스)에서 구입하였다. 염소의 항-마우스 FITC-표지 F(ab')<sub>2</sub>은 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch)에서 구입하였다.

오염증금속을 제거하는데 필요한 시약은 용액을 칼럼에 통과시킴으로써 Chelex 100(BioRad Industries) 또는 킬레이팅 세파로즈(Pharmacia)로 처리한 배치였다. 저-금속 저장 용액을 관주용 멸균수(SWF1r)로 희석하였다. 용액은 멸균 플라스틱 용기에 저장하였다.

특정방법에 대한 추가시약은 아래에서 설명한다.

## B. 재료 및 장비

1. 오리겐 분석기(Origen Analyzer); IGEN Inc. 모델#1100-1000; IDEC#1492
2. 상부계수 섬광계수기; Packard, 모델# A9912; IDEC#1329
3. 감마계수기; Isodata, 모델#20-10; IDEC#0628
4. 테크-컨트롤 방사선크로마토그래피 키트, Biodesix, 모델#151-770
5. 동결건조기; Virtis, 모델 Freezemobile 12; IDEC#0458

특정방법에 대한 추가재료 및 장비를 설명한다.

## C. 방법

### 1. 동결건조된 SB 및 HSB세포의 제조

세포들을 상기와 같이 배양하고 주변온도에서 원심분리(Sorvall 원심분리기에서 1300rpm)에 의해 0.5 내지  $2 \times 10^6$  세포/mL의 세포농도로 모으고, 1X HBSS로 2회 세척하였다. 펠렛화된 세포를 1%(w/v) 소혈청알부민(BSA)과 10%(w/v) 만니톨(동결건조 완충액)을 함유한 1X HBSS에  $50 \times 10^6$  세포/mL로 재현탁하고, 0.5mL를 o-링 개스킷을 가진 1.5mL 폴리프로필렌 마이크로퓨즈 투브에 나누어 -70°C에서 저장하고, 30 내지 60 militorr에서 밤새 동결건조시켰다. 동결건조된 세포의 투브를 2 내지 8°C에서 건조시켜 저장하였고 분석을 위하여 멸균수에 재구성하였다; 마이크로퓨즈 투브 내에서 동결건조된 세포의 투브를 건조제와 함께 저장하였다.

### 2. FACS 결합 분석

인간 B-세포에 대한 항체의 직접 결합을 유세포분석기로 측정하였다. 항체의 농도를 증가시키면서 1%(w/v) BSA를 함유하는 pH 7.2인 1X PBS(결합 완충액)에서  $5 \times 10^6$  CD20-양성(SB) 또는 CD20-음성(HSB)세포와 함께 얼음위에서 30분

간 배양하였다. 원심분리에 의해 세포를 세척하고, 결합 완충액에 재현탁시키고, FITC-표지 염소 항-마우스 F(ab')<sub>2</sub>와 함께 얼음 위에서 30분동안 배양하였다. 2차시약으로 배양한 후, 세포를 원심분리에 의해 세척하고 1.1%(v/v) 포름알데히드를 함유한 1X PBS에 재현탁하여 세포를 고정시켰다. 평균 형광강도를 유세포분석기를 사용하여 측정하였다.

### 3. 경쟁결합분석

2B8 및 2B8-MX-DTPA의 면역반응성은 ORIGEN 전기화학발광법(Leland and Powell)을 사용하여 CD20-양성 SB세포에 대한 경쟁결합에 의해 측정하였다. 로그상 SB세포를 배양액에서 모아 1X HBSS로 2회 세척하였다. 세포를 1%(w/v) 소혈청알부민을 함유하는 pH 7.2인 1X PBS에 희석하였다. 일부 실험에서, 동결건조된 세포를 멸균수를 사용하여 재구성한 후 사용하였다.

CHO-유래 2B8(로트# 165)를 pH 7.2인 1X PBS에서 루테늄(II) 트리스-비피리딘 킬레이터의 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(TAG-NHS)와 함께 TAG-NHS 대 항체의 몰비 15:1로 배양하여 루테늄-표지 추적자 항체를 제조하였다. 광으로부터 보호하여 주변온도에서 1시간 배양한 후, 글리신을 사용하여 10분 동안 반응을 정지시켰다. 비반응 TAG를 1X PBS로 평형상태로 된 파마시아(Phamacia) PD-10 칼럼을 사용하여 크기배제 크로마토그래피로 제거하였다. 단백질농도는 브래드포드(Bradford) 단백질분석법을 사용하여 측정하였다. TAG 결합은 455nm에서의 흡광도를 측정하여 확인하였다. 단백질에 대한 TAG의 몰비는 3.0으로 계산되었다.

12×75mm 폴리프로필렌튜브에서 분석을 하였다. 다양한 양의 경쟁항체(0.002-17 $\mu$ g/mL)를 1%(w/v) BSA를 함유한 pH 7.2인 1X PBS에서 0.08 $\mu$ g/mL TAG-표지 CHO 2B8, 0.08mg/mL 항-CD19 비드, 및 167,000 세포/mL와 함께 배양하였다. 주변온도에서 3시간동안 헌합하면서 배양한 후, ORIGEN 장비를 사용하여 상대 전기화학발광(ECL)을 측정하였다. 평균 ECL 값은 2중 시료에 대하여 측정하였고, 칼레이디아그래프(Kaleidagraph) 소프트웨어를 사용하여 경쟁항체 농도에 대하여 도표로 나타내었다. 일부 실험에 대해, %억제를 도표로 나타내었다. 경쟁곡선을 맞추고, 하기의 4-파라미터 프로그램을 사용하여 EC50값(50% 최대결합을 나타내는 항체농도)을 확인하였다:

$$y = ((m1 - m4) / (1 + (m0/m3)^{m2})) + m4; m1 = ; m2 = ; m3 = ; m4 =$$

m0 = 독립변수

m1 = 상대 ECL단위에서의 0신호반응

m2 = 곡률파라미터

m3 =  $\mu$ g/mL의 EC50

m4 = 상대 ECL단위에서 최대신호반응

평균친화력값을 뮐러(Muller)의 방법을 사용하여 추적항체의 공지농도와 EC50값으로부터 계산하였다.

### 4. 2B8-MX-DTPA의 제조

킬레이트제인 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)을 건조분말(무산)으로 제공하고, -20°C 또는 -70°C에서 건조저장하였다. 저금속 일반 식염수 중의 CHO 2B8 항체 약 3mg에 pH 8.6인 50mM 소디움보레이트 1/10부피를 첨가하여 pH 8.6으로 조절하였다. 10-11mg/mL의 항체를 pH 8.6인 50mM 소디움보레이트에 용해된 MX-DTPA를 첨가하여 MX-DTPA 대 단백질의 몰비 4:1로 배양하였다. 주변온도(2 내지 24시간)에서 배양한 후, 센트리콘(Centricon) 30 스플린-필터를 사용하여 저금속 일반 식염수 중에서의 반복 투석여과(diafiltration)에 의해 접합체로부터 비반응 킬레이터를 제거하였다.

### 5. In2B8과 Y2B8의 제조

본 명세서에서 설명한 바와 같은 방사선표지 키트 프로토콜을 사용하여 In2B8을 제조하였다. 3mCi/mg의 고유방사능으로 항체를 표지하고 0.2mg/mL로 제제화하였다. 간단히 말하면, 0.5 내지 2mCi의 <sup>111</sup>In 클로라이드를 무금속 마이크로퓨즈튜브로 옮기고 1.2X 부피의 저금속 50mM 소디움아세테이트를 사용하여 약 pH 4.2로 조절하였다. 2mg/mL의 2B8-

MX-DTPA를 아세트산 인듐용액에 첨가하고, 주변온도에서 30분간 배양한 후, 표지 항체를 7.5%(w/v) 인간 혈청 알부민과 1mM DTPA를 함유한 pH 7.2인 1X PBS(HSA의 최종농도 4 내지 6%)에서 0.2mg/mL로 제제화하였다. 모든 시료는 3중으로 방사선결합에 대해 시험하였고; 값은 >95%였다.

실시예 1에서 설명한 방사선표지 키트 프로토콜의 소규모판을 사용하여 Y2B8을 제조하였다. 항체를 15mCi/mg의 고유방사능으로 표지하고 0.3mg/mL로 제제화하였다. 간단히 말하면, 0.5 내지 2mCi의 <sup>90</sup>Y 클로라이드를 무금속 마이크로퓨즈튜브로 옮기고 1.2X 부피의 저금속 50mM 소디움 아세테이트를 사용하여 약 pH 4.2로 조절하였다. 2mg/mL의 2B8-MX-DTPA를 <sup>90</sup>Y 아세테이트용액에 첨가하고, 주변온도에서 5분간 배양한 후, 표지 항체를 7.5%(w/v) 인간 혈청 알부민과 1mM DTPA를 함유한 pH 7.2인 1X PBS(HSA의 최종농도 4 내지 6%)에서 0.3mg/mL로 제제화하였다. 모든 시료는 3중으로 방사선결합에 대해 시험하였고; 값은 >95%였다.

최종 방사선표지산물의 방사능농도는 반응혼합물에 첨가된 방사능의 양에 근거하고 방사성 동위원소에 대한 분석증명서를 참조하여 계산하였다. 정지된 반응혼합물의 항체농도는 첨가된 항체의 공지된 양으로부터 계산하였다.

방사선결합 및 결합에 대한 pH의 효과를 평가하는 방사선표지 동태학연구를 위하여, 반응혼합물의 pH를 다양한 양의 저금속 50mM 소디움 아세테이트(0.8 내지 2.2X 부피의 방사성 동위원소 용액)를 첨가함으로써 조절하였다.

## 6. In2B8과 Y2B8에 대한 방사선결합의 측정

배양시료 또는 최종산물에서 접합체와 관련된 방사능의 양(방사선결합)을 바이오덱스가 제조한 시판 키트(Tec-Control Radiochromatographic Kit; 실시예 1 참조)를 사용하여 측정하였다. 일반적으로 시험시료 1 $\mu$ l를 마이크로피페터를 사용하여 2중 또는 3중으로 적용하고 바이오덱스 지시삽입물에 따라 전개시켰다. 하기 설명하는 바와 같이 이소다타(Isodata)감마계수기 또는 팩커드 상부계수 섬광계수기(Packard Top Count scintillation counter)를 사용하여 스트립 절반에 대한 유리튜브 내에서의 방사능을 계수하였다. 방사선표지결합은 스트립의 상부절반에서의 방사능량을 상부절반 및 하부절반 모두에서 발견되는 총 방사능으로 나누어 계산하였다. 이 값은 측정된 % 및 평균값으로 나타내었다.

## 7. In2B8 및 Y2B8의 면역반응성의 측정

린드모 등의 방법을 사용하여 실시예 1에서 설명한 바와 같이 면역반응성을 평가하였다.

## 8. In2B8 및 Y2B8에 대한 직접결합분석

본 명세서에서 설명한 바와 같은 프로토콜을 사용하여 In2B8과 Y2B8 각각에 대하여 CD20-양성 SB세포에 대한 결합을 측정하였다. In2B8과 Y2B8을 상기에서 설명한 바와 같이 제조하여 제제화하였다. 분석을 위하여, In2B8과 Y2B8시료를 분석회석 완충액(1%(w/v) 소혈청알부민(BSA)을 함유하는 pH 7.2인 1X PBS)에 각각 40ng/mL과 11ng/mL로 희석하였다.

항원양성(SB) 및 항원음성(HSB)세포를 10% 우태아혈청을 보충한 RPMI 1640 중에서 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 유지하였다. 세포(트리판블루배제법으로 측정했을 때 생존률 >90%)를 모아 주변온도에서 원심분리(Sorvall 원심분리기에서 1300rpm)에 의해 0.5 내지 2×10<sup>6</sup> 세포/mL의 세포농도로 모으고 50mL 1X PBS로 2회 세척하였다. 펠렛화된 세포를 1%(w/v) 소혈청알부민(BSA)과 10%(w/v) 만니톨(동결건조 완충액)을 함유한 예비냉각된 1X HBSS에 50×10<sup>6</sup> 세포/mL로 재현탁하였다. 세포현탁액을 o-링 개스킷을 가진 1.5mL 폴리프로필렌 마이크로퓨즈 튜브에 50×10<sup>6</sup> 세포/mL(튜브당 0.5mL)로 나누어 30 내지 60 밀리토르에서 냉동 동결건조시켰다. 동결건조된 세포를 2 내지 8°C에서 건조 저장하였고 분석을 위하여 멸균수에 재구성하였다.

1.5mL 폴리프로필렌 튜브 속의 동결건조된 SB 및 HSB세포를 멸균수를 사용하여 50×10<sup>6</sup> 세포/mL로 재현탁하였다. 희석된 In2B8과 Y2B8를 3중으로 세포에 첨가하고, 주변온도에서 연속혼합으로 45 내지 60분동안 각각 배양하였다. 배양 후, 세포를 원심분리에 의해 펠렛화하고, 아래에서 설명하는 바와 같은 아소다타 감마계수기 또는 팩커드 상부계수 섬광계수기에서 시료를 계수함으로써 세포결합 방사능을 측정하였다. 세포에 결합된 방사능(B)은 첨가된 총 방사능에서 비결합 방사능(상등액)을 뺏으로써 계산하였다. 총 방사능은 세포없는 튜브에서 계수된 방사능으로부터 측정하였다. %결합은 결합된 수를 총 수의 %로서 나타내어 계산하였다.

## 9. 방사능측정

방사선결합시료를 이소다타 감마계수기를 사용하여 1분동안 계수하였다. 계수기는 100 내지 500 KeV의 에너지창으로 설정하였고  $^{111}\text{In}$ 을 사용하여 시료에 사용하기 직전에 배경을 0으로 조절하였다. 이소다타 감마계수기는 그 위에 점적된  $^{90}\text{Y}$ 를 가지는 ITLC 스트립을 계수하는데도 사용하였다. 제동복사 방사선의 검출을 위한 에너지창은 100 내지 1000KeV 였다.

결합분석을 위하여,  $^{90}\text{Y}$ 시료를 24웰 플레이트 및 마이크로신트(MicroScint) 40 칵테일로 옮기고 최저 및 최대 에너지설정을 사용하여 1분동안 팩커드 탑카운트에서 계수하였다. 인듐-[111] 시료는 이소다타 감마 계수기를 사용하여 1분간 계수하였다. 계수기는 100 내지 500 KeV의 에너지창으로 설정하였고 사용하기 직전에 배경을 0으로 조절하였다.

## 10. In2B8 및 Y2B8의 임상투여량에 대한 방출내역

CD20-양성 세포에 대한 방사선결합 및 결합에 대한 방출내역을 본 빌명에 따라 제조하여 GMP조건 하에서 채워진 2개 로트의 임상등급 2B8-MX-DTPA(로트# 0219 및 0220)를 사용하여 In2B8과 Y2B8 각각 6투여량을 제조함으로써 설정하였다. 방출분석은 상기에서 설명한 바와 같이 행하였다.

## IV. 결과

### A. CHO-유래 2B8의 특성화

유세포분석을 사용하여, CHO 2B8이 CD20-음성 HSB 세포에 결합하지 않고 CD20-양성 SB세포에 직접 결합한다는 것을 확인하였다(도 34). 비관련 아이소타입( $\gamma$ 1k)항체(S004)에 대해서는 SB 또는 HSB세포에 대한 명확한 결합이 확인되지 않았다.

CHO 2B8의 CD20-양성 세포에 대한 결합은 오리겐 화학발광 검출 시스템을 사용한 경쟁분석에서 평가하였다. 동결건조되고 재구성된 항원-양성 SB세포를 루테늄-표지 CHO 2B8 추적자의 존재하에서 항체의 양을 증가시키면서 배양하였다. 그 결과, CHO 2B8가 중공섬유 생물반응기에서 유래한 항체(2B8-49)와 동일한 정도로 CD20-양성 세포에 대한 결합을 억제하는 것으로 나타났다(도 35). EC50값을 도표로 확인하고 월러방법(1980)을 사용하여 평균친화력값을 계산하였다. CHO 2B8에 대한 친화력은  $1.3 \times 10^{-10}\text{M}$ 인 것으로 확인하였다; 중공섬유 생물반응기에서 유래한 2B8 항체는  $2.5 \times 10^{-10}\text{M}$ 의 친화력값을 나타내었다. 비관련 아이소타입항체인 S004와의 경쟁력의 결여에서 확인되는 바와 같이 비특이적 결합은 무시할 수 있었다.

### B. CHO-유래 2B8-MX-DTPA의 특성화

이미 특성화된 2B8-49에 대해 사용된 것과 유사한 프로토콜을 사용하여 2B8 접합체(2B8-MX-DTPA)를 제조하였다. 약 3mg의 항체 및 몰비 4:1의 키레이터와 항체를 사용하여 반응을 행하였다.  $^{111}\text{In}$ 을 사용한 고방사선결합과 CD20 양성 세포에 대한 결합의 허용가능한 보유력을 나타내는 반응시간을 확인하기 위하여 2, 4, 8, 17, 및 24시간의 배양시간을 평가하였다. 8 내지 24시간동안 반응한 CHO 2B8을 CHO 2B8-MX-DTPA 접합체와 비교한 경쟁 결합 곡선은 유사하여, 접합과정이 항체의 CD20항원에 대한 결합을 크게 변화시키지 않았음을 나타낸다(도 36). 도표에서 확인된 EC50값을 사용하면, 비접합 및 접합 항체에 대한 친화력상수는  $2.3 \times 10^{-10}\text{M}$  내지  $5.9 \times 10^{-10}\text{M}$ 의 범위였다(표 40). 방사선결합은 8 내지 24시간의 접합시간동안 >95%였다(표 30).

[표 40]

CHO 2B8-MX-DTPA의 방사선결합 및 면역반응성에 대한 접합 반응 시간의 영향

<u>배양시간(h)</u>	<u>방사선결합(%)</u>	<u>친화력(M)</u>
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	$4.4 \times 10^{-10}$

C. CHO-유래 2B8-MX-DTPA로부터 제조된 In2B8과 Y2B8의 특성화

인듐-[111]-표지 CHO 2B8-MX-DTPA(In2B8)를 중공섬유 생물반응기-유래 항체에 대해 이미 설명한 소규모 방사선 표지 키트 프로토콜(실시예 1)을 사용하여 제조하였다. 간단히 말하면, 접합된 항체(CHO-유래 2B8-MX-DTPA; 로트# 0165A)를 주변온도에서 30분동안 표시된 pH에서  $^{111}\text{In}$  아세테이트와 함께 배양하였다. 반응혼합물을 7.5%(w/v) 인간 혈청알부민 및 1mM DTPA를 함유한 pH 7.2인 PBS를 사용하여 제제화하였다. 제제화된 In2B8의 시료를 즉시 박막 크로마토그래피를 사용하여 방사선결합에 대해 분석하였다. In2B8의 CD20-양성 세포에 대한 결합을 동결건조 및 재구성된 SB세포를 사용하여 측정하였다. 비교를 위하여, 하이브리도마-생산 항체(2B8-49)로부터 제조된 접합체를 pH 4.2(이 항체에 대해 이미 설정된 조건)에서 30분 동안  $^{111}\text{In}$  아세테이트와 함께 배양하였다.

고방사선결합 및 CD20-양성 세포에 대한 결합의 최대보유력을 제공하는 표지조건을 확인하기 위하여 동태학연구를 하였다(표 41 및 42). 접합된 항체(CHO-유래 2B8-MX-DTPA)를 표시된 시간동안 pH 4.2에서  $^{111}\text{In}$  아세테이트를 사용하여 주변온도에서 배양하였다(표 42).

### [표 41]

In2B8 방사선표지 동태학: CD20-양성 세포에 대한 방사선결합

및 결합에 미치는 pH의 영향

<u>반응 pH</u>	<u>방사선결합(%)</u>	<u>결합(%)</u>
3.0	97.7	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
대조구(2B8-49)	99.3	86.5

### [표 42]

In2B8 방사선표지 동태학: CD20-양성 세포에 대한 방사선결합

및 결합에 미치는 배양 시간의 영향

<u>배양 시간 (분)</u>	<u>방사선결합(%)</u>	<u>결합(%)</u>
pH 2.9: 15	97.2	85.3
	99.1	85.2
	97.2	84.8
pH 4.6: 15	99.0	87.2
	97.2	86.8
	99.4	86.3
대조구(2B8-49)	99.4	87.8

그 결과, pH 3.0 내지 4.6 범위와 30분의 배양시간에 대하여, 약 84%의 결합을 유지하면서 >97% 방사성 동위원소의 방사선결합이 얻어졌다. 방사선결합 및 결합값은 pH 2.9 내지 4.6에서 반응을 위한 15 내지 45분의 배양시간에 대하여 불변인 것으로 확인되었다(표 42). 결과는 2B8-49항체를 사용하여 얻어진 것과 동등하였다(표 41 및 42).

주변온도에서 5분간 표시된 pH에서 접합된 항체(CHO-유래 2B8-MX-DTPA)를  $^{90}\text{Y}$  아세테이트와 함께 배양함으로써 이트륨-[90]-표지 항체를 제조하였다. 반응혼합물을 7.5%(w/v) 인간 혈청알부민 및 1mM DTPA를 함유한 pH 7.2인 PBS를 사용하여 제제화하였다. 제제화된 Y2B8의 시료를 즉시 박막 크로마토그래피를 사용하여 방사선결합에 대해 분석하였다. Y2B8의 CD20-양성세포에 대한 결합을 동결건조 및 재구성된 SB세포를 사용하여 측정하였다. 비교를 위하여, 하이브리도마-생산 항체(2B8-49)로부터 제조된 접합체를 pH 4.2(이 항체에 대해 이미 설정된 조건)에서 5분 동안  $^{90}\text{Y}$  아세테이트와 함께 배양하였다.

<sup>90</sup>Y-표지 항체(Y2B8)의 제조를 평가하기 위하여 유사한 동태학연구를 행하였다. 5분의 배양시간에서 pH 3.9 내지 4.7의 방사선표지 반응에 대하여, 방사선결합은 >96%였고, CD20-양성 세포에 대한 결합의 보유력이 >80%였다(표 43). pH 2.9 내지 4.6의 범위에 대해 3, 5 및 10분의 배양시간에 대해 유사한 결과를 얻었다(표 44). 그리고나서, 접합된 항체(CHO-유래 2B8-MX-DTPA)를 표시된 시간동안 pH 4.2에서 <sup>90</sup>Y 아세테이트와 함께 주변온도에서 배양하였다(표 44). 결과는 2B8-49 항체를 사용하여 얻어진 것과 동등하였다(표 43 및 44).

### [표 43]

Y2B8 방사선표지 동태학: CD20-양성 세포에 대한 방사선결합

및 결합에 미치는 pH의 영향

<u>반응 pH</u>	<u>방사선결합(%)</u>	<u>결합(%)</u>
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
대조구(2B8-49)	99.3	82.6

### [표 44]

Y2B8 방사선표지 동태학: CD20-양성 세포에 대한 방사선결합

및 결합에 미치는 배양 시간의 영향

<u>배양 시간 (분)</u>	<u>방사선결합(%)</u>	<u>결합(%)</u>
pH 3.9: 3	97.0	82.0
5	98.9	82.1
10	99.2	82.3
pH 4.7: 3	97.2	82.5
5	96.7	81.8
10	97.6	81.5
대조구(2B8-49)	99.2	84.2

CHO 2B8로부터 제조된 In2B8과 Y2B8에 대한 면역반응성을 런드모 등의 방법을 사용하여 확인하였다. 신선하게 수집된 CD20-양성 SB세포의 양을 증가시키면서 항원과량의 조건 하에서 고정량의 In2B8 또는 Y2B8과 함께 배양하였다. 결합 테이터의 역도표분석결과, In2B8 및 Y2B8에 대해 각각 80.6%와 72.2%의 면역반응성이 확인되었다(도 37 및 38).

#### D. CHO-유래 In2B8 및 Y2B8에 대한 방출내역

2개 로트의 임상등급 In2B8/Y2B8 방사선표지키트를 In2B8 및 Y2B8 각각 6개 로트를 제조하는데 사용하였다. In2B8 및 Y2B8는 임상실험에서 현재 사용되는 방사선표지 프로토콜의 소규모판을 사용하여 제조하였다. 방사선표지 2B-MX-DTPA의 각 로트를 방사선 결합 및 CD20-양성(SB) 및 CD20-음성(HSB) 인간세포에 대한 결합에 대해 시험하였다. 이 결과는 표 45와 46에 요약되어 있다. 제조된 6개 로트의 In2B8에 대하여, 방사선결합은 98.9% 내지 99.3%의 범위이고 평균은 99.1%였다. CD20-양성 세포에 대한 결합은 81.9% 내지 85.1%의 범위이고 평균은 83.6%였고; CD20-음성세포에 대한 결합은 <4%였다. 제조된 6개 로트의 Y2B8에 대하여, 방사선결합은 97.4% 내지 98.7%의 범위이고 평균은 98.2%였다. CD20-양성 세포에 대한 결합은 81.4% 내지 82.7%의 범위이고 평균은 81.9%였고; CD20-음성세포에 대한 결합은 <8%였다.

#### [표 45]

방사선표지 키트 프로토콜을 사용하여

제조된 CHO-유래 In2B8에 대한 방출 분석 결과

#### 결합(%)

실행 #	방사선결합(%)	SB 세포	HSB 세포
#1(Lot #0219)	99.1	81.9	2.8
#2(Lot #0219)	99.3	83.2	2.8
#3(Lot #0219)	99.2	83.6	3.7
#4(Lot #0220)	99.0	83.8	2.6
#5(Lot #0220)	98.9	84.1	2.6
#6(Lot #0220)	98.9	85.1	3.3

평균 = 99.1%      평균 = 83.6%      평균 = 2.9%

SD = 0.2%      SD = 1.1%      SD = 0.4%

## [표 46]

방사선표지 키트 프로토콜을 사용하여

제조된 CHO-유래 Y2B8에 대한 방출 분석 결과

결합(%)

실행 #	방사선풀합(%)	SB 세포	HSB 세포
#1(Lot #0219)	98.7	82.1	7.4
#2(Lot #0219)	98.6	82.7	0.7
#3(Lot #0219)	98.3	82.2	7.2
#4(Lot #0220)	97.4	81.8	1.7
#5(Lot #0220)	97.6	81.4	2.2
#6(Lot #0220)	98.4	81.4	1.1
평균 = 98.2%		평균 = 81.9%	평균 = 3.4%
SD = 0.5%		SD = 0.5%	SD = 3.1%

## V. 토의 및 결론

CHO세포에서 클로닝되고 발현된 항-CD20 쥐의 모노클로날 항체(2B8)(CHO-유래 2B8)는 FACS 및 경쟁결합분석에 의해 나타난 바와 같이, CD20-양성 인간세포에 대해 특이성을 유지한다. 인간 T-세포에 대한 결합은 최소였다. 인간 CD20-양성세포에 대한 항체의 친화력은 경쟁결합분석을 사용하여  $1.3 \times 10^{-10}$ M인 것을 확인하였다. 동일한 분석법을 사용하면, 중공섬유 생물반응기로부터 유래된 2B8항체는  $2.5 \times 10^{-10}$ M의 친화력값을 나타냈다.

CHO 2B8 항체는 MX-DTPA와 반응하여 면역반응성의 적당한 보유력을 유지하면서 접합체인 2B8-MX-DTPA를 형성하였다. 최적 퀄레이터 결합은  $^{111}\text{In}$ 을 사용한 방사선풀합을 측정함으로써 확인하였고 주변온도에서 8시간 배양 후 이루어졌다. 2B8-MX-DTPA 접합체에 대한 방사선풀지 프로토콜은 pH와 배양시간과 관련하여  $^{90}\text{Y}$  또는  $^{111}\text{In}$ 에 대하여 최적화되어 최대 방사선풀합과 면역반응성의 보유를 보증한다.

In2B8 및 Y2B8의 여러가지 제조결과는 임상투여량을 제조하는데 사용되는 방사선풀지 프로토콜의 재생가능성을 확인한다. 이러한 방사선풀지결과에 근거하면, 동결건조된 CD20-양성세포를 사용한, 방사선풀합 및 결합에 대한 방출내역이 각각  $\geq 95\%$  및  $\geq 70\%$ 에서 설정된다는 것을 제시한다. 이 결과는 함께, CHO-유래 2B8과 중공섬유-유래 2B8-49의 동등성을 확인하고, 임상실험에서 사용하는데 있어서 CHO-유래 2B8-MX-DTPA의 적합성을 나타낸다.

마지막으로, 본 발명은 비단백질결합 방사성 동위원소를 제거하기 위하여 현재 사용되는 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)단계에 대한 필요성을 없애는 임상 투여량의 방사선풀지 항체를 제조하기 위한, "믹스-&-슈트"라 불리는 표지절차를 개시하고 있다. 단순화된 프로토콜은 고수준의 방사성 동위원소 결합( $>95\%$ ) 및 면역반응성의 개선된 보유력( $>70\%$ )을 유지하면서, 이러한 어려운 정제단계를 제거한다. 임상적으로 제제화된 방사선풀지 접합체는 면역반응성과 방사성 동위원소의 보유력에 근거하여 4°C에서 48시간 동안 배양했을 때 시험관 내에서 안정한 것으로 밝혀졌다. 또한, 방사선풀지 접합체는 37°C에서 72시간 동안 인간혈청 중에서 배양되었을 때 안정하였다. BALB/c 마우스에서의 생체분포연구는 비정상적 조직침착과 뼈에서의 상당한 축적이 없다는 것을 확인하였다. "표준" 70kg 인간에 대한 방사선풀합의 평가는  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA를 사용하여 진행중인 임상실험에서 얻어진 것과 동등하였다. 이 연구들의 결과는 "믹스-&-슈트" 프로토콜을 사용하여 생산된  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA가 종래의 HPLC방법을 사용하여 제조된 것과 동등하다는 것을 보여주었다. 임상등급 방사선풀지 접합체를 제조하기 위한 일정비율증가 프로토콜의 검증은 이 방법이 재생가능하고

산물이 현행 HPLC방법을 사용하여 생산된 것과 동등하다는 것을 나타내었다. 이 임상전 연구의 결과는 이러한 신규 "믹스-&-슈트"프로토콜이 임상실험에서 사용하기에 적합한  $^{90}\text{Y}$ -표지 2B8-MX-DTPA를 제조하는데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

#### 참조문헌

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(l): 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. Brechbiel, M.W., Gansow, O.A., Atcher, R.W., Sclom, J., Esteban, J., Simpson, D.E. and Colcher, D. (1986) 25, 2772.

#### 도면의 간단한 설명

도 1.  $^{125}\text{I}$ -표지된 B1을 사용한 방사선면역분석에서의 직접 경쟁으로 상업적으로 입수가능한 항-CD20 항체 B1(Coulter) 및 Leu 16(Becton Dickinson)과 천연 2B8의 면역반응성을 비교하였다. 항원-양성 SB 세포(100,000)을 V&P 필터 플레이트의 각 웰에 첨가하고; 방사선표지 B1 10ng을 다양한 농도의 표지되지 않은 경쟁자와 혼합시키고, 이 혼합물을 세포에 첨가하였다. 항체를 세포와 함께 주변 온도에서 한시간 동안 배양하고; 3중 측정하였다. 이어서, 웰들을 세척하고, 건조시키고, 필터-관련 방사능을 측정하였다. 나타난 데이터는 배경 방사능에 대해 보정되었고, 3중 측정의 평균이다.

도 2. 비접합 2B8의 양을 증가시키면서 FACS 분석을 사용하여 인간 B-세포(SB)에 대한 결합에 대해 분석하였다. 상업적으로 입수가능한 항-CD20 모노클로날 항체(B1) 및 두 개의 무관련 아이소타입 항체와 비교하였다. 염소 항-마우스 IgG-FITC(ab)'<sub>2</sub>를 제2시약으로 사용하였다. 이 결과로부터 2B8이 CD20 항원에 대해 특이적이라는 것과 B1보다 더 큰 결합을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

도 3. 인간 B-세포(SB)를 <sup>125</sup>I-표지된 2B8의 양을 증가시키면서 배양하였다. 3중 시료를 한 시간동안 배양하고, 여과하여 세포를 모은 후, 세포-결합 방사능을 측정하였다. 스캐ച드(Scatchard) 분석으로  $4.3 \times 10^{-9}$ M의 결보기 친화력 상수를 계산하였다.

도 4. 천연 2B8, 2B8-MX-DTPA, 및 B1의 면역반응성. B1 항체는 방법 부분에서 기술한 대로 방사선표지되었다. 10 ng의 방사선표지 B1은 경쟁자의 농도를 증가시키면서 혼합하고, 이 혼합물은 각각 100,000 항원-양성 SB 세포를 함유하는 V&P 필터 플레이트의 웰에 첨가하고; 모두 3중 측정하였다. 주변온도에서 한 시간동안 배양한 후, 웰들을 강력하게 세척하였다. 이어서, 필터를 건조시키고, 관련 방사능을 감마 계수으로 측정하고; 모든 값들은 배경에 대해 보정하였다. 나타난 값들은 3중 측정의 평균이다.

도 5. 항체 2B8을 일반 식염수 또는 pH 6.8인 10 mM 글리신-HCl을 함유하는 일반 식염수 중에서 10 mg/mL의 최종 농도로 제제화하였다. 그리고 나서, 두 세트의 시료를 나사마개 바이알에 넣고, 바이알을 질소로 펴지한 후, 마개를 덮었다. 그리고 나서, 시료들을 4°C 또는 30°C에서 12주 동안 배양하고; 시료의 면역반응성을 매주 평가하였다. 12주 연구하는 동안 2B8 시료 중에서 면역반응성의 손실은 관찰되지 않았다. 1주(도 5A), 6주(도 5B) 및 12주(도 5C)의 면역반응성을 나타내었다.

도 6. 50 mg/mL 인간 혈청 알부민(48시간 배양)을 함유한 pH 7.4인 PBS 중에서 배양한 <sup>111</sup>In-표지된 2B8-MX-DTPA의 면역반응성의 측정을 위한 결합 분석. 도 6A) 일정량의 방사선표지 항체(5ng/mL)를 SB 세포( $20 \times 10^6$  세포/mL)의 부피를 증가시키면서 배양하였다. 세포에 결합된 방사능의 양(cpm)을 첨가된 세포 혼탁액의 부피에 대해 도표로 나타내었다. 도 6B) 결합 방사능에 대한 총 적용된 방사능(AT/B)을 도표로 나타내었다. 선형 외삽으로 y-절편(0.997)을 계산하였다. y-절편 X 100의 역수로 무한 항원 초과도에서 100%의 면역반응성 값을 얻었다.

도 7. 75 mg/mL 인간 혈청 알부민 및 1 mM DTPA를 함유하는 pH 7.4인 PBS 중에서 4°C에서 배양된 <sup>90</sup>Y-표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 방사선사진. 표시된 시간에서, 시료들을 비-환원 조건, 변성 조건(SDS)을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 젤 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 5μl(레인 1,2), 10μl(레인 5,6)로 부었다. 젤들을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 촬영하였다.

도 8. 75 mg/mL 인간 혈청 알부민 및 1 mM DTPA를 함유하는 pH 7.4인 PBS 중에서 4°C에서 배양된 <sup>90</sup>Y-표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 0시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 젤 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에서 5μl, 10μl, 및 20μl로 부었다. 젤을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크 (#2)의 상대 영역은 96.2%이었다.

도 9. 75 mg/mL 인간 혈청 알부민 및 1 mM DTPA를 함유하는 pH 7.4인 PBS 중에서 4°C에서 배양된 <sup>90</sup>Y-표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 48시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 젤 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에서 5μl, 10μl, 및 20μl로 부었다. 젤을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크 (#2)의 상대 영역은 95.5%이었다.

도 10. 50 mg/mL 인간 혈청 알부민을 함유하는 pH 7.4인 PBS 중에서 4°C에서 배양된 <sup>111</sup>In-표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 방사선사진. 표시된 시간에서, 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 젤 상에서 전기 영동하였다. 시료들은 5μl(레인 1,2), 10μl(레인 3,4), 및 20μl(레인 5,6)로 부었다. 젤들을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 촬영하였다. (주: 48시간 방사선사진은 강화 스크린을 사용하여 얻었으며, 0시간 방사선사진에 비해 더 강한 신호를 나타내었다).

도 11. 50 mg/mL 인간 혈청 알부민을 함유하는 pH 7.4인 PBS 중에서 4°C에서 배양된  $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 0 시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에 5 $\mu\text{l}$ , 10 $\mu\text{l}$ , 및 20 $\mu\text{l}$ 로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크(#2)의 상대 영역은 95.9%이었다.

도 12. 50 mg/mL 인간 혈청 알부민을 함유하는 pH 7.4인 PBS 중에서 4°C에서 배양된  $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 48 시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에 5 $\mu\text{l}$ , 10 $\mu\text{l}$ , 및 20 $\mu\text{l}$ 로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체의 상대 영역은 97.0%이었다(피크 #2, 3, 및 4의 결합된 영역).

도 13. 인간 혈청 중에서 37°C에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 방사선사진. 표시된 시간에서, 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 5 $\mu\text{l}$ (레인 1,2), 10 $\mu\text{l}$ (레인 3,4), 및 20 $\mu\text{l}$ (레인 5,6)으로 부었다. 겔들을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 촬영하였다.

도 14. 인간 혈청 중에서 37°C에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 0시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에 5 $\mu\text{l}$ , 10 $\mu\text{l}$ , 및 20 $\mu\text{l}$ 로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크(#2)의 상대 영역은 97.9%이었다.

도 15. 인간 혈청 중에서 37°C에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 98시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에 5 $\mu\text{l}$ , 10 $\mu\text{l}$ , 및 20 $\mu\text{l}$ 로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크(#2)의 상대 영역은 94.7%이었다.

도 16. 인간 혈청 중에서 37°C에서 배양된  $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 방사선사진. 표시된 시간에서, 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에 5 $\mu\text{l}$ (레인 1,2), 10 $\mu\text{l}$ (레인 3,4), 및 20 $\mu\text{l}$ (레인 5,6)로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 16-20 시간 동안 주변 온도에서 노출시키고, 촬영하였다.

도 17. 인간 혈청 중에서 37°C에서 배양된  $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 0시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 5 $\mu\text{l}$ , 10 $\mu\text{l}$ , 및 20 $\mu\text{l}$ 로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 16-20시간 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크(#3)의 상대 영역은 95.3%이었다.

도 18. 인간 혈청 중에서 37°C에서 배양된  $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 96시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에 5 $\mu\text{l}$ , 10 $\mu\text{l}$ , 및 20 $\mu\text{l}$ 로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 16-20시간 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크(#3)의 상대 영역은 94.0%이었다.

도 19. 게잡이 원숭이에 48시간마다 정맥내 주사하여 총 7회 주입하였고; 투여량을 나타낸다. 항-CD2(T-세포), 항-Mo-IgG(2B8), 항-CD20(Leu 16), 및 항-인간-IgG(B-세포)를 사용하여 FACS 분석으로 순환 T- 및 B-세포 수준을 측정하였다. 순환 T-세포 수준에 대한 효과는 관찰되지 않았다. (그룹 V 동물들은 단일 투여되었다).

도 20. 2B8을 주입한 동물에서 순환 B-세포 수준의 회복 후 도 19의 간단한 설명에서 기술된 형광-표지된 항체를 사용하여 FACS 분석하였다. 그룹 III 및 IV의 동물들은 13일 째에 치사되었으므로 측정되지 않았다.

도 21. 계집이 원숭이에 임상-등급 2B8-MX-DTPA를 사용하여 제조한  $^{89}\text{Y}$ -2B8-MX-DTPA를 정맥내 주사하였다. 이 동물에 상기 나타낸 양으로 48시간마다 투여하여 총 7회 투여하였다. 0, 2, 7, 10 및 14일째에, 원숭이의 혈액을 채취하여 혈청 화학 혈액학 및 순환 B-세포 수준을 평가하였다(10일째 혈청은 B-세포 함량에 대해 분석하지 않았다). 그룹 II의 한 마리를 제외하고는, 모든 동물들에서 총 림프구 수가 감소한 것 이외에, 연구 과정 동안 현저히 비정상적인 것은 보고되지 않았다.

도 22. 0일에 10 mg/kg의 단일 주입 후에 ELISA를 사용하여 계집이 원숭이로부터 쥐의 항-CD20 항체 2B8의 클리어런스를 측정하였다. 패널 A에 나타낸 바와 같이, 항체는 약 4.5일의  $\beta t_{1/2}$  값에서 나타났다. BALB/c 마우스의 순환으로부터 2B8 항체 및 이의 MX-DTPA 접합체의 클리어런스를 패널 B에 나타내었다. 마우스에 25 $\mu\text{g}$ 의 천연 또는 접합 2B8을 정맥내 주사하고, 주입 후 264시간 까지 다양한 시간에서 혈액 시료를 채취하고; 이어서 포획제로서 SB 세포를 사용하여 효소면역분석으로 혈청을 분석하였다. 천연 항체 및 접합 항체 모두 8.75 일의 클리어런스 값을 나타내었다.

도 23. 50 mg/mL HSA를 함유하는 pH 7.4인 PBS 중에서 제제화된 방사선표지 접합체(100 $\mu\text{l}$ ) 1.1  $\mu\text{Ci}$ 를 20마리의 BALB/c 마우스에 각각 주입하였다. 각각 다섯마리로 구성된 그룹을 1, 24, 48, 및 72 시간에 치사시키고, 혈액 및 다양한 조직을 준비하고, 관련 방사능에 대해 분석하였다.

도 24. 75 mg/mL 인간 혈청 알부민 및 1 mM MDPA를 함유하는 pH 7.4인 1 X PBS 중에서 제제화된 방사선표지 접합체(100 $\mu\text{l}$  중) 약 1.0  $\mu\text{Ci}$ 를 20마리의 BALB/c 마우스에 각각 정맥내 주사하였다. 각각 다섯마리로 구성된 그룹을 1, 24, 48, 및 72 시간에 치사시키고, 이들의 혈액 및 다양한 조직을 준비하고, 관련 방사능에 대해 분석하였다.

도 25.  $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-DTPA 24  $\mu\text{Ci}$ 를 라모스(Ramos) B-세포 종양을 가진 무흉선 마우스에 정맥내 주사하고, 각각 세마리로 구성된 그룹을 0, 24, 및 72 시간에서 치사시켰다. 조직 준비 및 관련 방사능 측정 후, g 조직 값 당 % 주입 투여량을 측정하고 도시된 바와 같이 도표화하였다.

도 26. 50-75 mg/mL 인간 혈청 알부민을 함유하는 pH 7.4인 PBS에서 배양(48시간 배양)된 "믹스-&-슈트(mix-and-shoot)"  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 면역반응성을 측정하기 위한 결합 분석. 패널 A) 일정량의  $^{90}\text{Y}$ -표지된 항체(약 1 ng/ml)를 SB 세포의 양을 증가시키면서 배양하였다. 세포에 결합된 방사능의 양(cpm)을 세포 농도에 대해 도시하였다. 패널 B) 결합 방사능(AT/B)에 대한 총 적용된  $^{90}\text{Y}$  방사능(AT/B)을 도시하였다. 선형 외삽으로  $y$ -절편(1.139)을 계산하였다.  $y$ -절편 X 100의 역수로 무한 항원 초과도에서 87.9%의 면역반응성 값을 구하였다. CD20-음성 세포(HSB)와의 결합은 관찰되지 않았다.

도 27. 75 mg/mL 인간 혈청 알부민 및 1 mM DTPA를 함유하는 pH 7.4인 PBS 중에서 4 °C에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 방사선사진. 표시된 시간에서, 시료들은 비-환원 조건, 변성 조건(SDS)을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기영동하였다. 시료들을 5 $\mu\text{l}$ (레인 1,2), 10 $\mu\text{l}$ (레인 5,6)로 부었다. 겔들을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 촬영하였다.

도 28. 75 mg/mL 인간 혈청 알부민 및 1mM DTPA를 함유하는 pH 7.4인 PBS 중에서 4 °C에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 0시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리브-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에서 5 $\mu\text{l}$ , 10 $\mu\text{l}$ , 및 20 $\mu\text{l}$ 로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크(#2)의 상대 영역은 96.1%이었다.

도 29. 75 mg/mL 인간 혈청 알부민 및 1mM DTPA를 함유하는 pH 7.4인 PBS 중에서 4 °C에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 48시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에서 5 $\mu\text{l}$ , 10 $\mu\text{l}$ , 및 20 $\mu\text{l}$ 로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크(#2)의 상대 영역은 94.1%이었다.

도 30. 인간 혈청 중에서 37°C에서 배양된 "믹스-&-슈트"  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 방사선사진. 표시된 시간에서, 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을  $5\mu\text{l}$ (레인 1,2),  $10\mu\text{l}$ (레인 3,4), 및  $20\mu\text{l}$ (레인 5,6)로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 촬영하였다.

도 31. 인간 혈청 중에서 37°C에서 배양된 "믹스-&-슈트"  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 0시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에  $5\mu\text{l}$ ,  $10\mu\text{l}$ , 및  $20\mu\text{l}$ 로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크(#2)의 상대 영역은 89.1%이었다.

도 32. 인간 혈청 중에서 37°C에서 배양된 "믹스-&-슈트"  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 SDS-PAGE 분석으로부터 얻은 72시간 방사선사진의 사진 농도계 스캔. 시료들은 비-환원 조건을 사용하여 4-20% 트리스-글리신 겔 상에서 전기 영동하였다. 시료들을 2중 웰에  $5\mu\text{l}$ ,  $10\mu\text{l}$ , 및  $20\mu\text{l}$ 로 부었다. 겔을 x-선 필름에 약 15분 동안 주변 온도에서 노출시키고, 사진 농도계를 사용하여 레인들 중 하나를 스캔하였다. 방사선표지 접합체 피크(#2)의 상대 영역은 88.8%이었다.

도 33. 75 mg/mL 인간 혈청 알부민 및 1 mM DTPA를 함유하는 pH 7.4인 1 X PBS 중에서 제제화된  $5\mu\text{Ci}$   $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA를 20마리의 BALB/c 마우스에 각각 정맥내 주사하였다. 각각 다섯 마리로 구성된 그룹을 1, 24, 48 및 72 시간에 치사시키고, 이들의 혈액 및 다양한 조직을 준비하고, 관련 방사능을 분석하였다.

도 34. 표지된 CHO-유래된 2B8 항체의 양을 증가시키면서 고정농도의 신선하게 수집된 CD20-양성 B-세포(SB) 또는 CD20-음성 T-세포(HSB)와 함께 배양하였다. 본 명세서에 기재된 바와 같이 염소 항-마우스 IgG-FITC F(ab)'<sub>2</sub>를 사용한 FACS 분석을 사용하여 세포에 결합하는 항체를 정량하였다. 무관련 아이소타입 항체(S004)에 대해 비교하였다. 단지 CHO-유래 2B8 항체만이 CD20-양성 SB 세포에 대해 상당한 결합을 나타내었다.

도 35. CHO-유래된 2B8의 면역반응성을 ORIGEN 분석에서 직접 경쟁에 의해 하이브리도마 세포주에서 생성된 2B8-49 부모 항체에 대해 비교하였다. 증가량의 항체를 고정된 농도의 CD20-양성 B-세포(SB) 및 소량의 루테늄-표지된 CHO 2B8과 함께 배양하였다. 주변 온도에서 세 시간 동안 배양한 후, 관련 전기화학발광(ECL)으로 발현된 결합을 재료 및 방법에서 설명한 바와 같은 ORIGEN 기구를 사용하여 측정하였다. 값들은 이중 측정의 평균을 나타낸다. CHO 2B8 및 2B8-49를 위한 평균 친화 상수는 각각  $1.3 \times 10^{-10}\text{M}$  및  $2.5 \times 10^{-10}\text{M}$ 로 계산되었다. 비교하기 위해 무관련 아이소타입 항체(S004)를 포함한다.

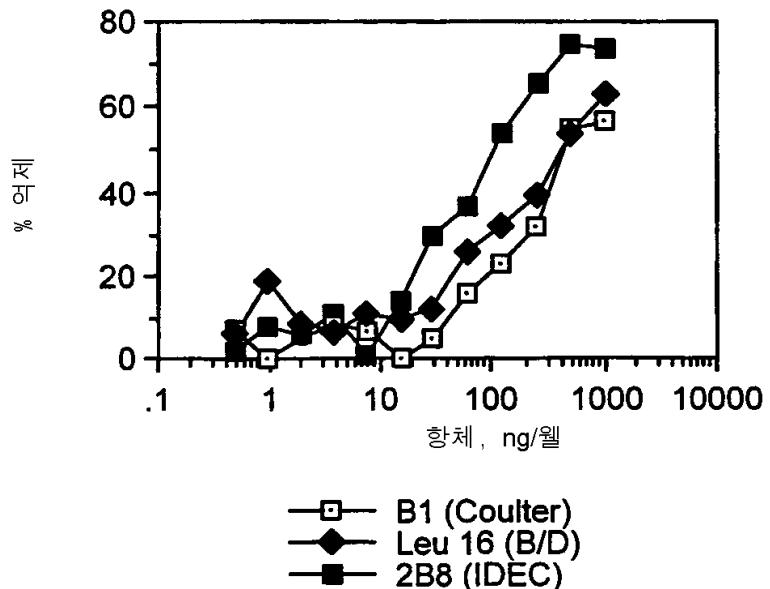
도 36. CHO-유래된 2B8로부터 준비한 2B8-MX-DTPA 접합체의 결합을 ORIGEN 분석에서 직접 경쟁에 의한 비접합 항체와 비교하였다. 접합체들은 비반응 퀄레이트를 제거하기 전에 2B8을 MX-DTPA와 함께 8, 17, 및 24시간 동안 배양하여 준비하였다. 결합 평가를 위해, 항체들을 고정 농도의 CD20-양성 B-세포(SB) 및 소량의 루테늄-표지된 CHO 2B8과 함께 배양하였다. 주변 온도에서 세 시간 동안 배양한 후, 상대 전기화학발광(ECL)으로 표현되는 결합을 재료 및 방법에서 기재된 바와 같이 ORIGEN 기구를 사용하여 측정하였다. 값들은 이중 측정의 평균을 나타낸다. 접합체 제조는 비접합 2B8 항체와 비교하여 유사한 결합을 나타내었다.

도 37. A) SB 세포를 세척하고,  $90 \times 10^6$  세포/mL로 희석 완충액(1%(w/v)의 소혈청 알부민을 함유하는 pH 7.4인 1X PBS)과 함께 재현탁하였다. 세포의 농도를 증가시키면서 2B8-MX-DTPA 로트 0165A를 사용하여 제조된 7.5 ng/mL In2B8과 함께 3시간 동안 배양하였다. B) 세포 농도 대 결합 방사능/전체 방사능(B/AT)의 이중-역 도표. 1/y-절편 X 100으로 면역반응성을 계산하였다. 면역반응성 및 상관 계수(R) 값은 각각 80.6% 및 0.981이었다.

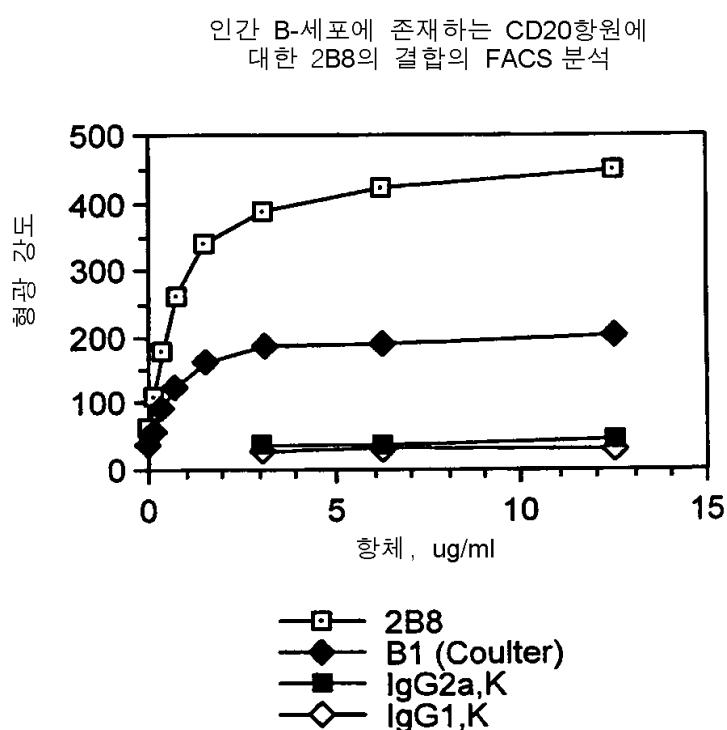
도 38은 A) SB 세포를 세척하고,  $90 \times 10^6$  세포/mL로 희석 완충액(1%(w/v)의 소혈청 알부민을 함유하는 pH 7.4인 1X PBS)과 함께 재현탁하였다. 세포의 농도를 증가시키면서 2B8-MX-DTPA 로트 0165A를 사용하여 제조된 2 ng/mL Y2B8과 함께 3시간 동안 배양하였다. B) 세포 농도 대 결합 방사능/전체 방사능(B/AT)의 이중-역 도표. 1/y-절편 X 100으로 면역반응성을 계산하였다. 면역반응성 및 상관 계수(R) 값은 각각 72.2% 및 0.999이었다.

## 도면

도면1

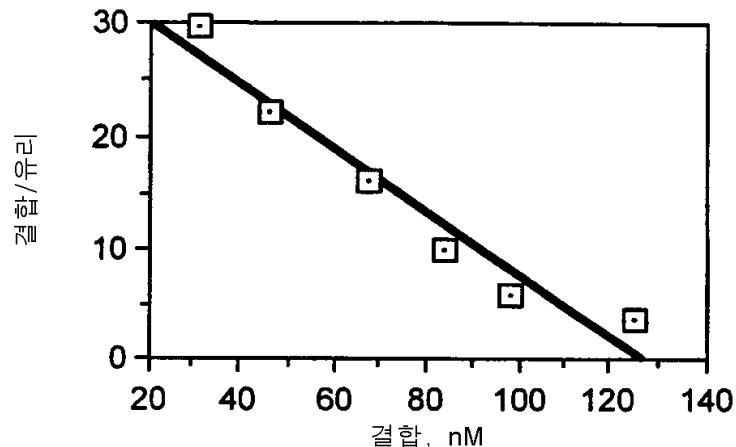


도면2



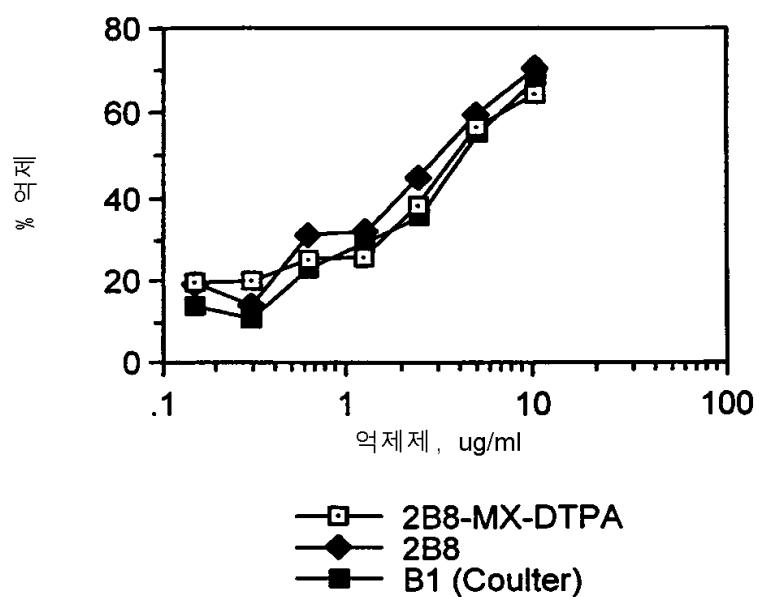
## 도면3

B-세포에 대한 2B8 결합의 스캐챠드 분석



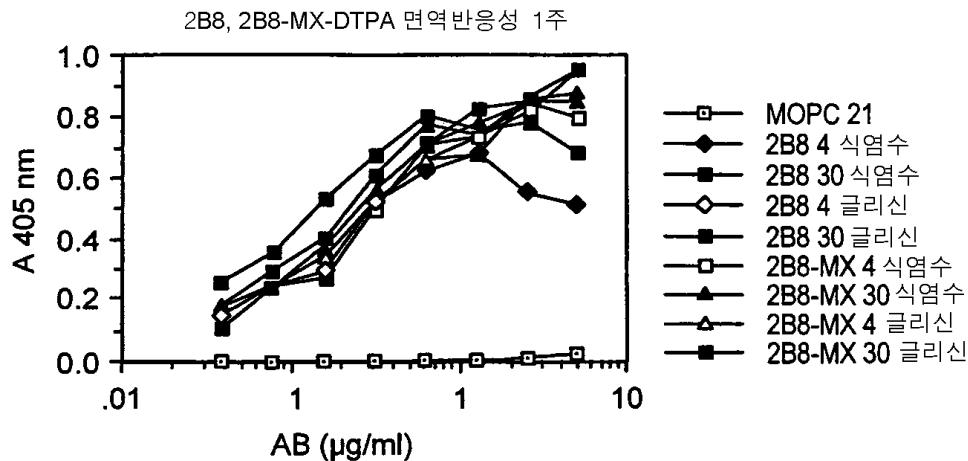
## 도면4

비표지된 B1, 2B8 및 MX-DTPA 접합된 2B8에  
의한 방사선 표지된 B1 항-CD20 Mab의 억제



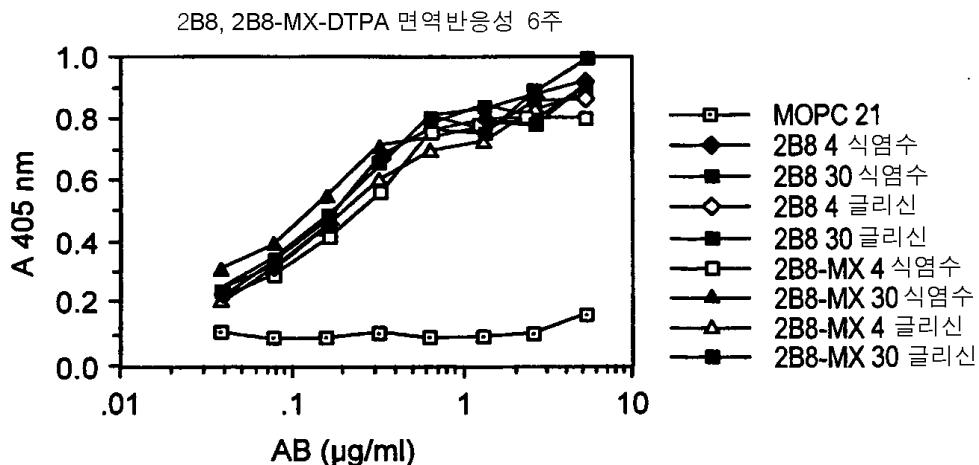
## 도면5a

4° 및 30°C에서 배양하는 동안 2B8의 면역반응성



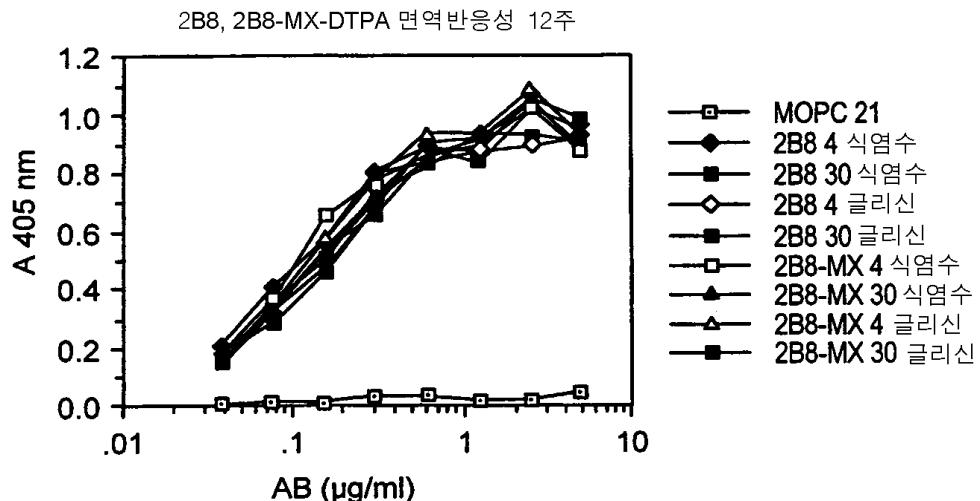
## 도면5b

4° 및 30°C에서 배양하는 동안 2B8의 면역반응성



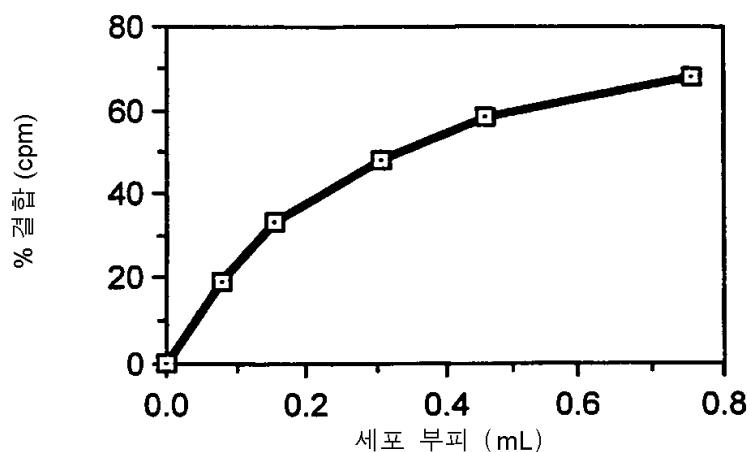
## 도면5c

4° 및 30°C에서 배양하는 동안 2B8의 면역반응성



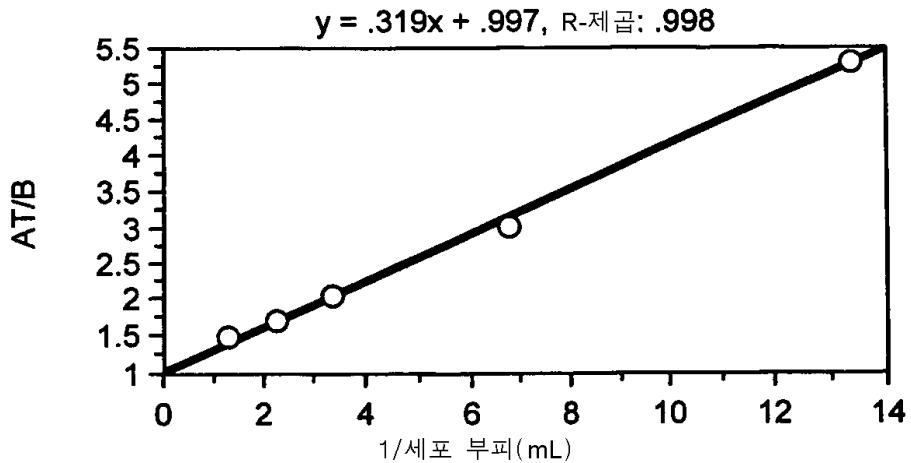
## 도면6a

CD-20 양성 인간 세포에 대한  
 $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 결합



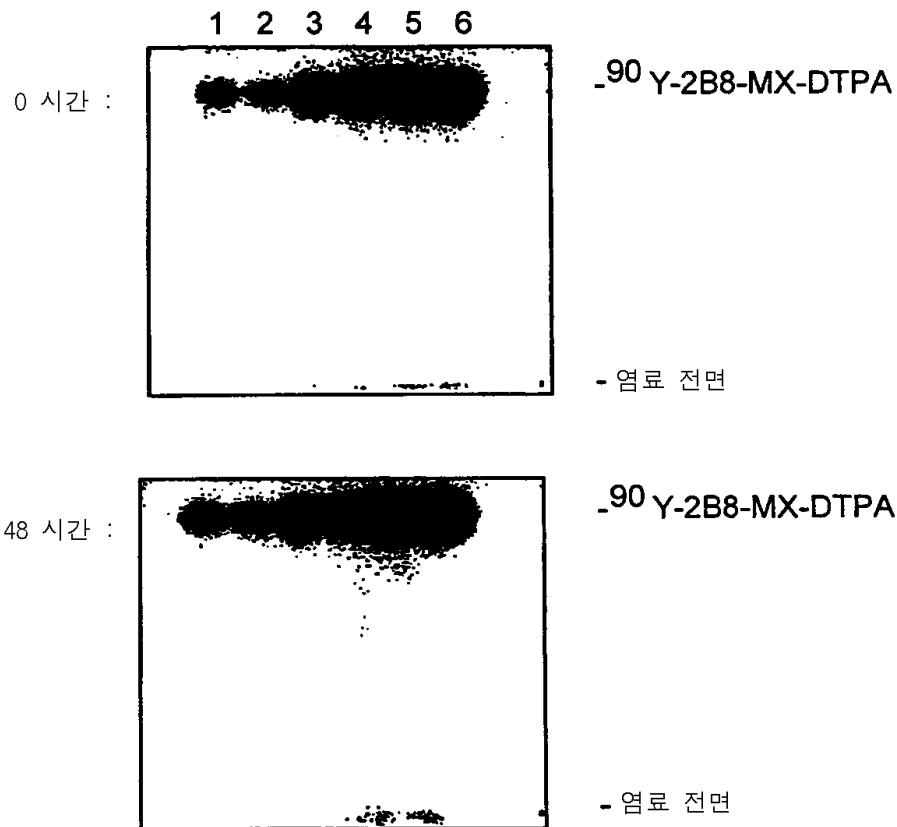
## 도면6b

CD-20 양성 인간 세포에 대한  
 $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 결합



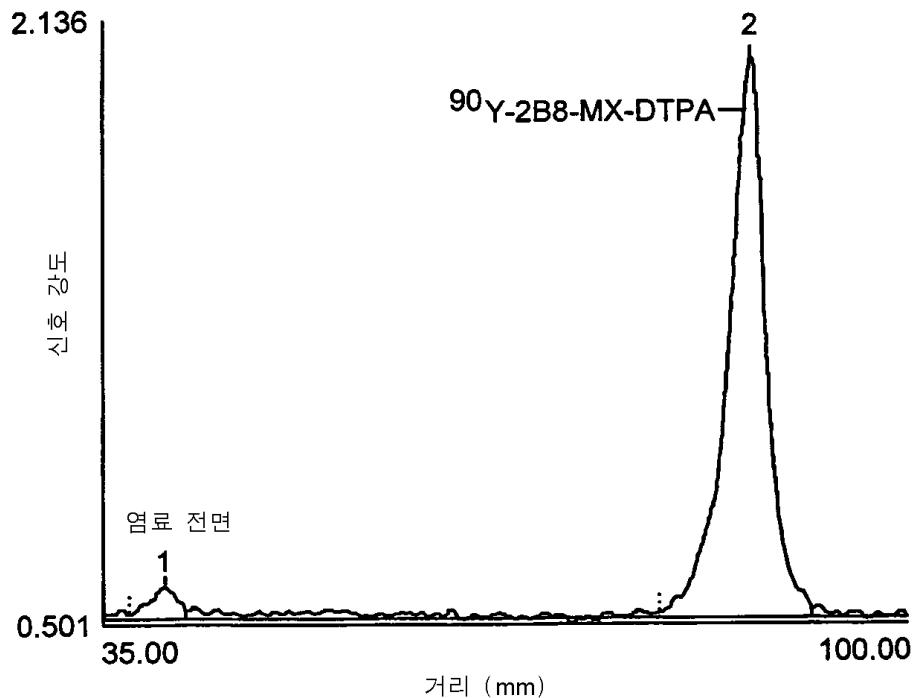
## 도면7

인간 혈청 알부민 및 DTPA를 합유하는 PBS 중에서  
 $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



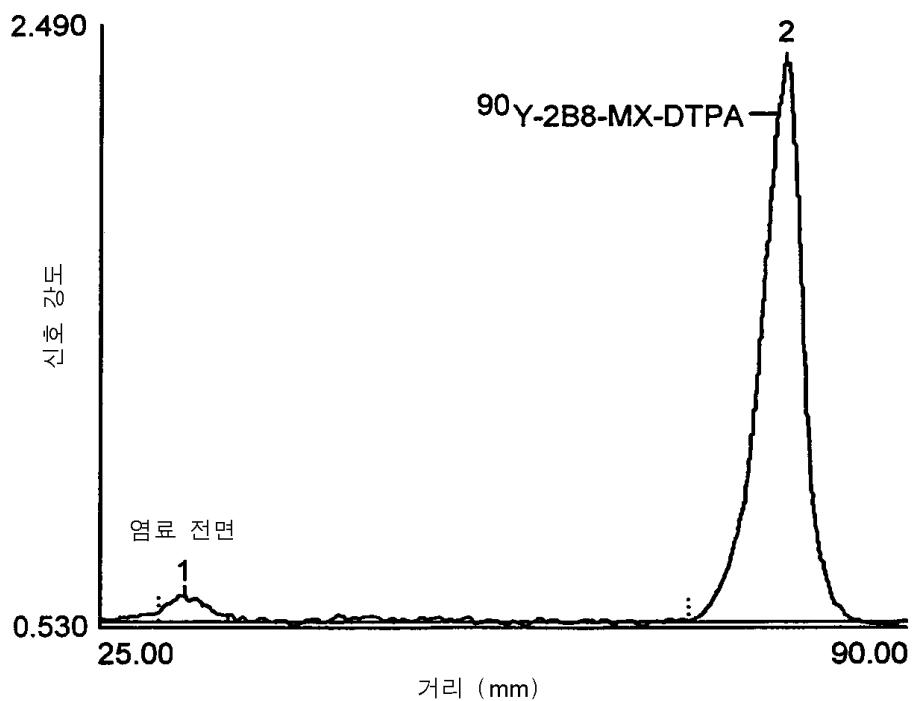
## 도면8

인간 혈청 알부민 및 DTPA를 함유하는 PBS 중에서  
 $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



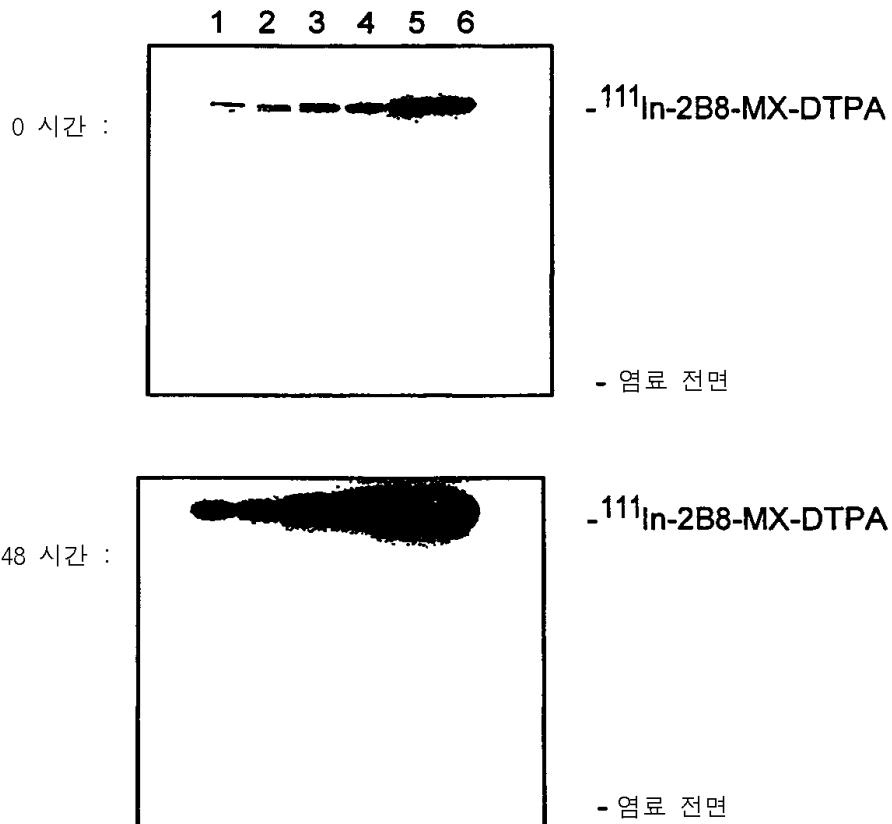
## 도면9

인간 혈청 알부민 및 DTPA를 함유하는 PBS 중에서  
 $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



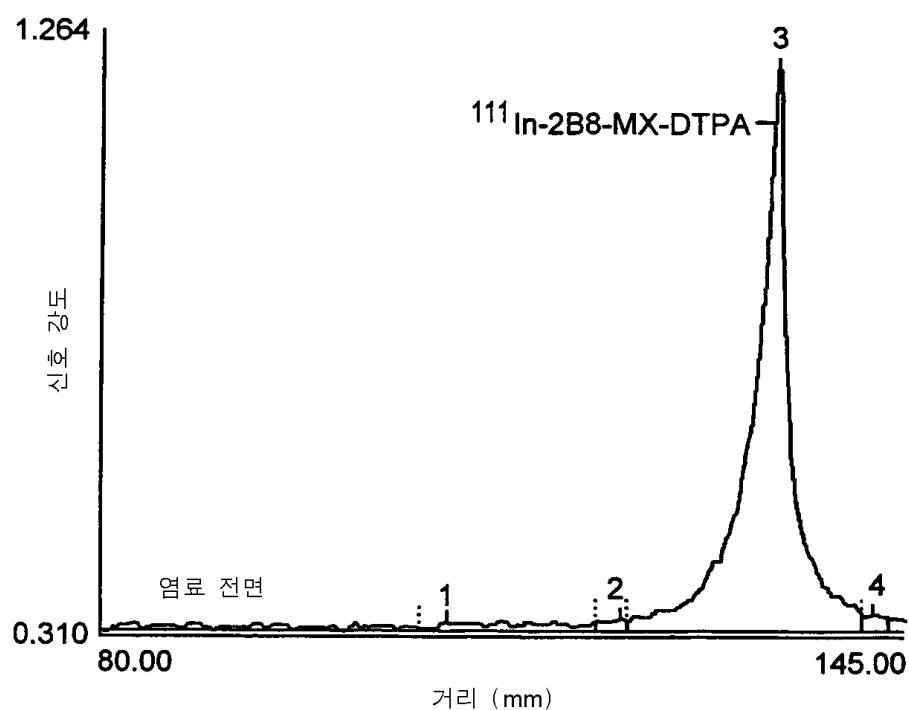
## 도면10

인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS 중에서  
 $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성



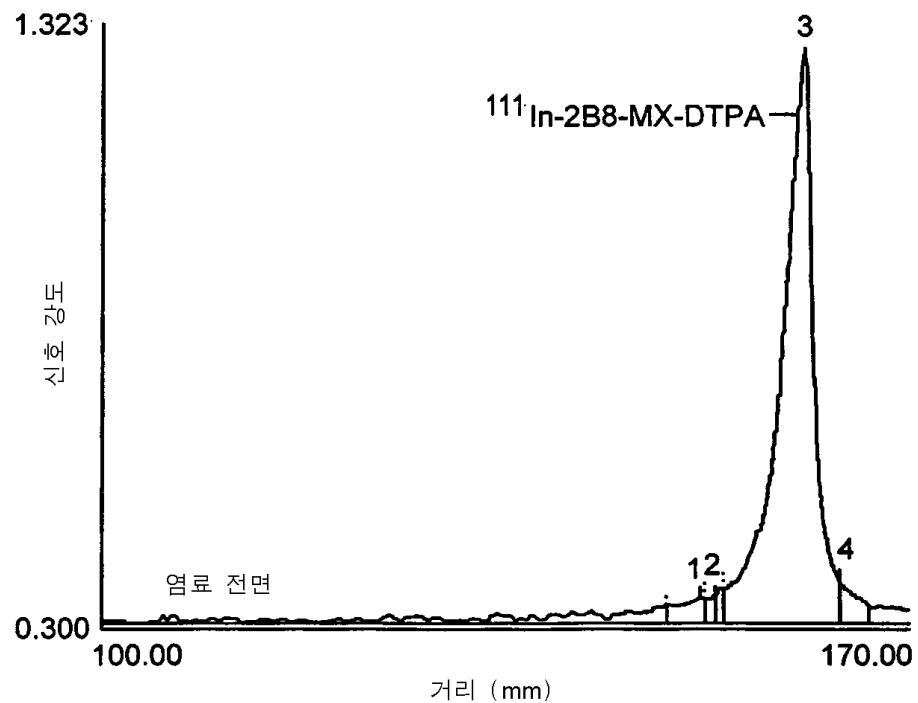
## 도면11

인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS 중에서  
 $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성



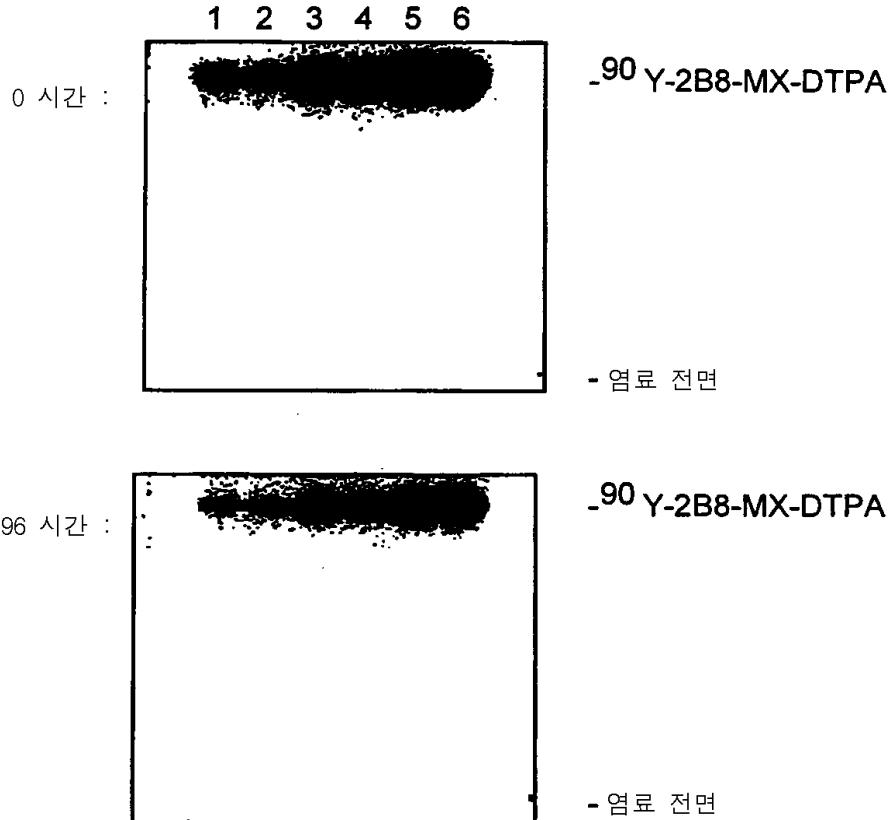
## 도면12

인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS 중에서  
 $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성



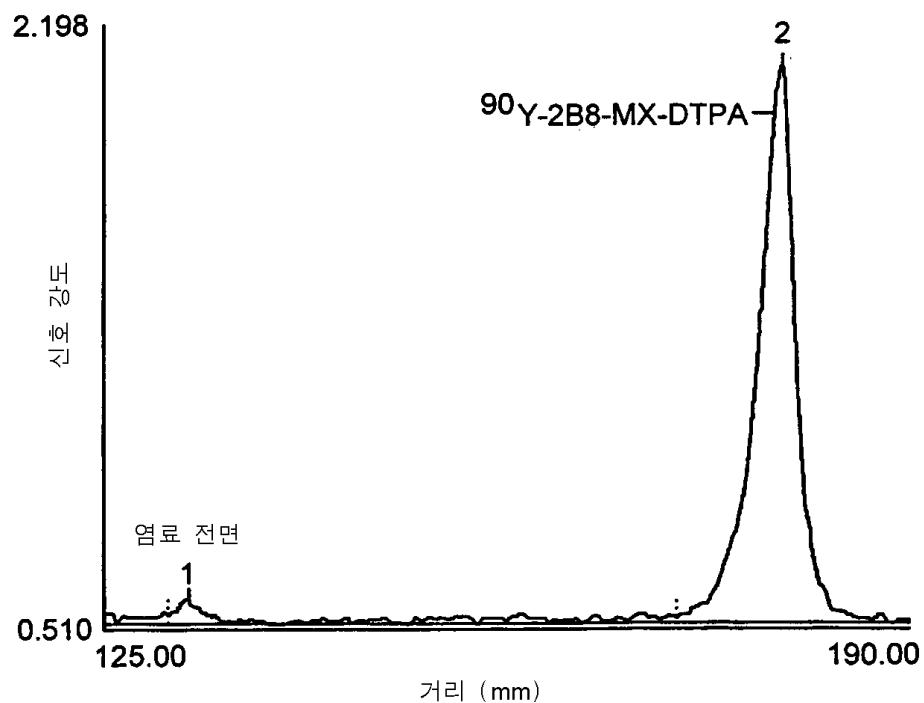
도면13

인간 혈청 중에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된  
2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



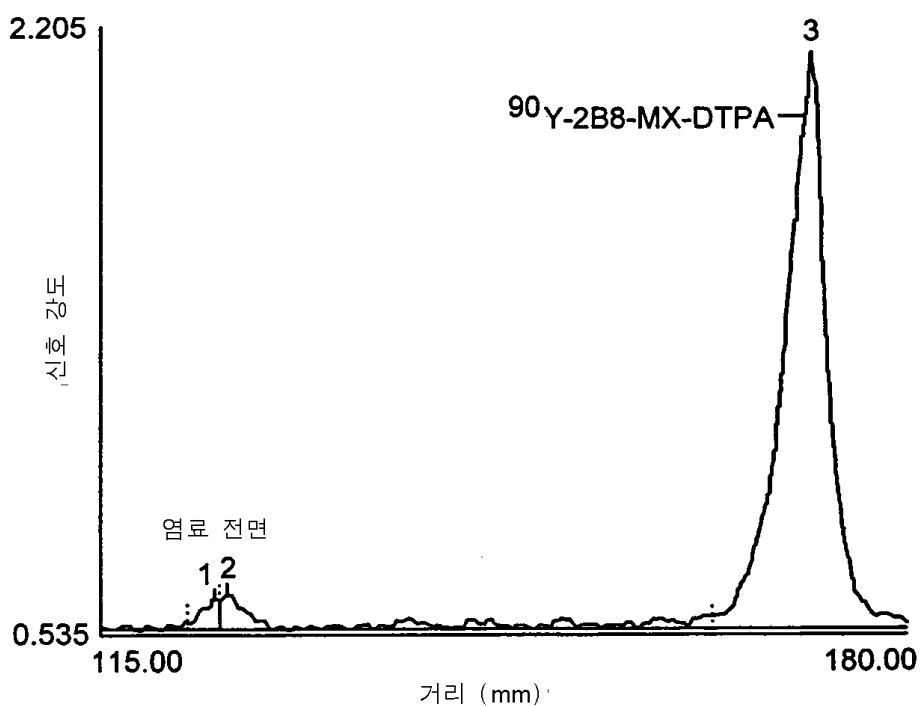
도면14

인간 혈청 중에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된  
2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



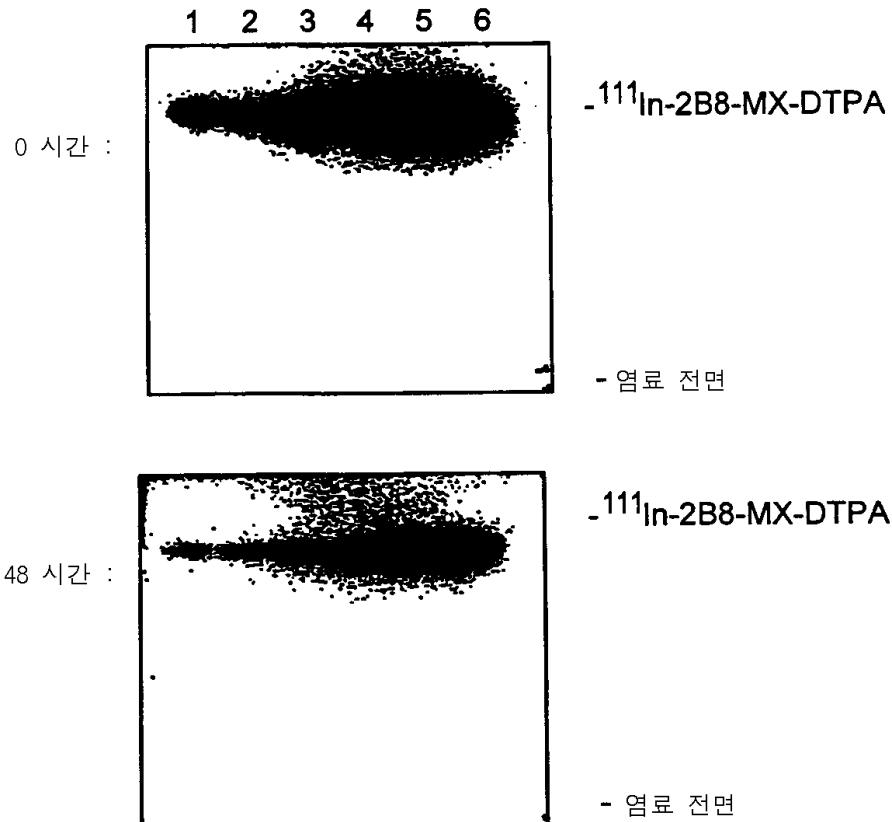
도면15

인간 혈청 중에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된  
2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



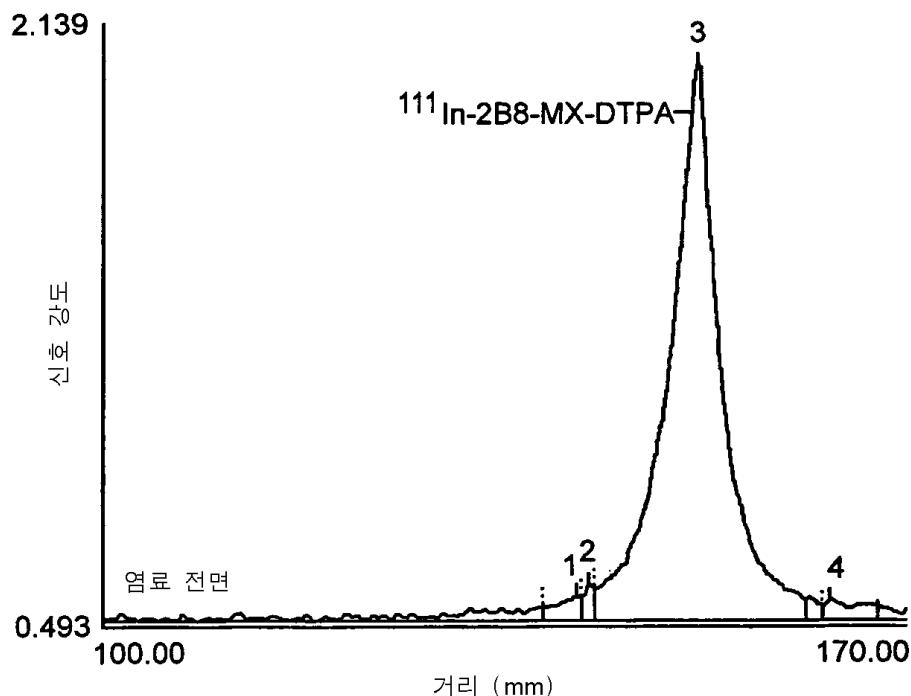
도면16

인간 혈청 일부분을 함유하는 PBS 중에서  
 $^{111}\text{In}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관내 안정성



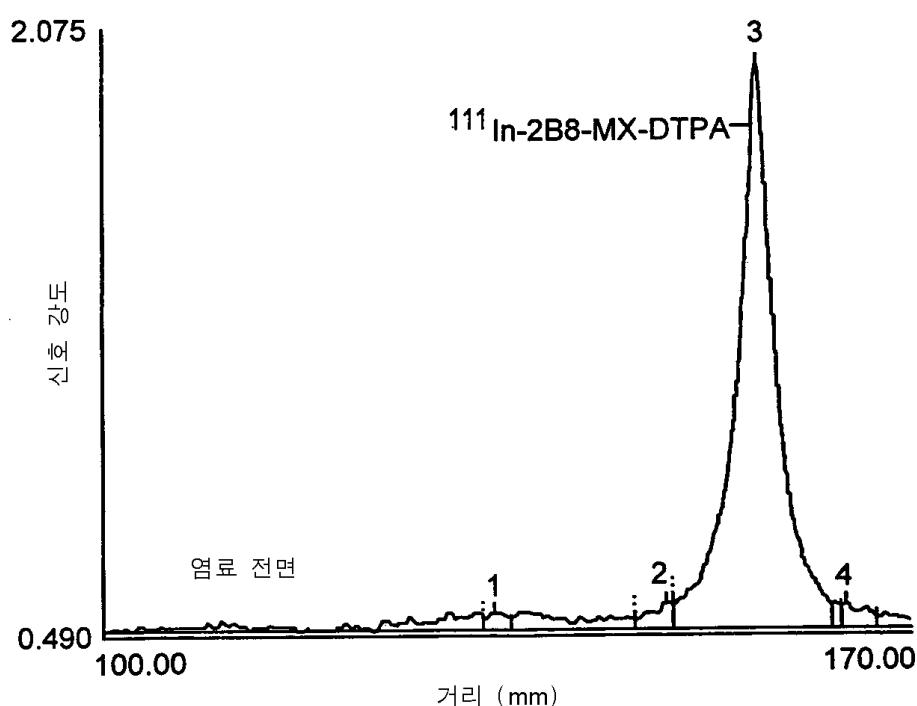
## 도면17

인간 혈청 중에서 배양된  $^{111}\text{In}$ -표지된  
2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



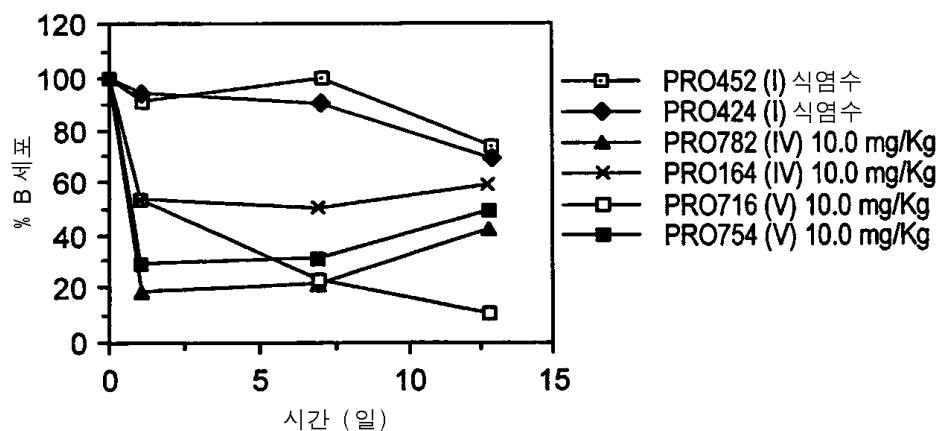
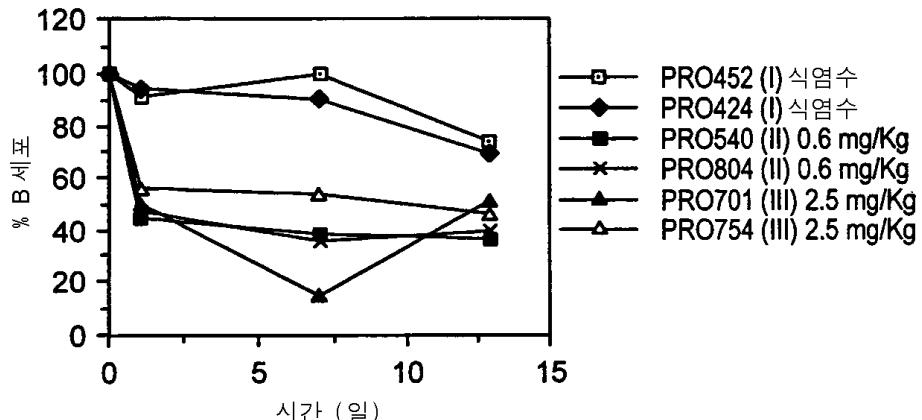
## 도면18

인간 혈청 중에서 배양된  $^{111}\text{In}$ -표지된  
2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



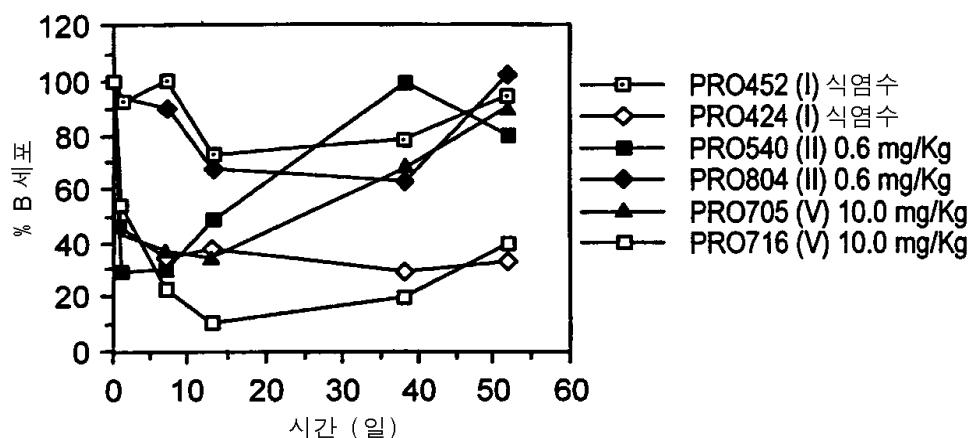
## 도면19

개잡이 원숭이에서 B-림프구 수준의  
2B8 주입 효과, 0일 내지 13일



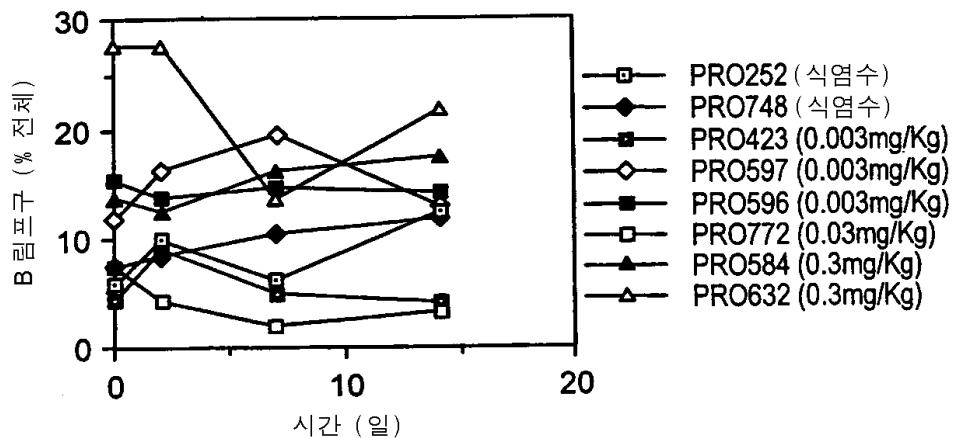
## 도면20

주의 모노클로날 항-CD20 항체 2B8로 주입된  
개잡이 원숭이 중에서 순환 B-세포 수준의 회복



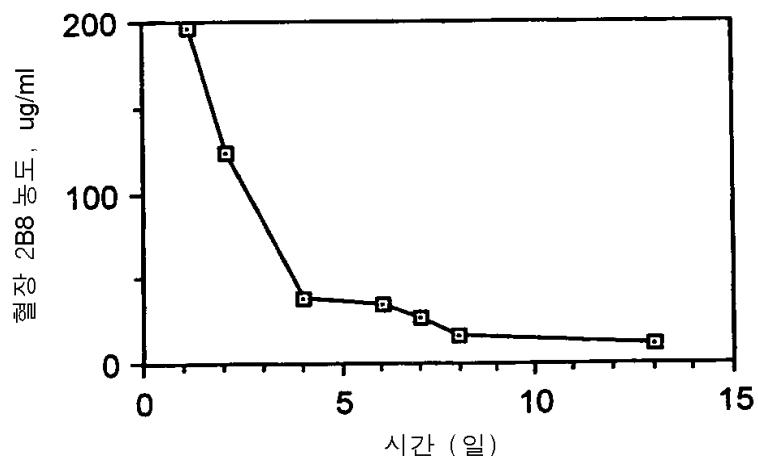
## 도면21

개잡이 원숭이에서 순환 B-세포에  
대한 2B8-MX-DTPA의 효과



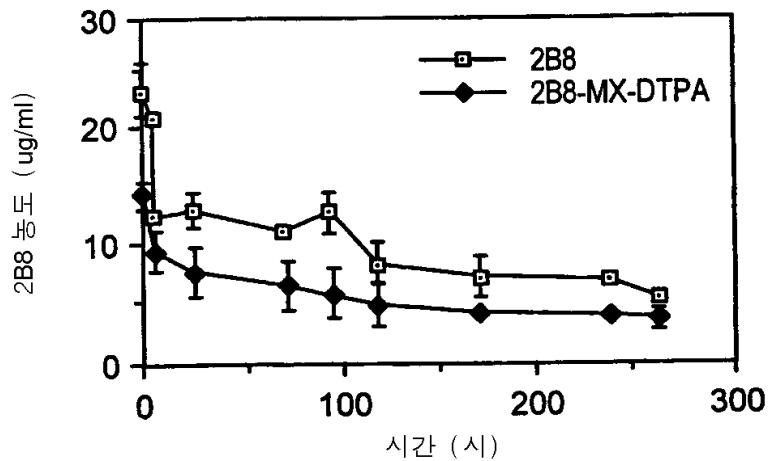
## 도면22a

10mg/kg의 단일 주입 후 개잡이  
원숭이로부터 2B8의 제거



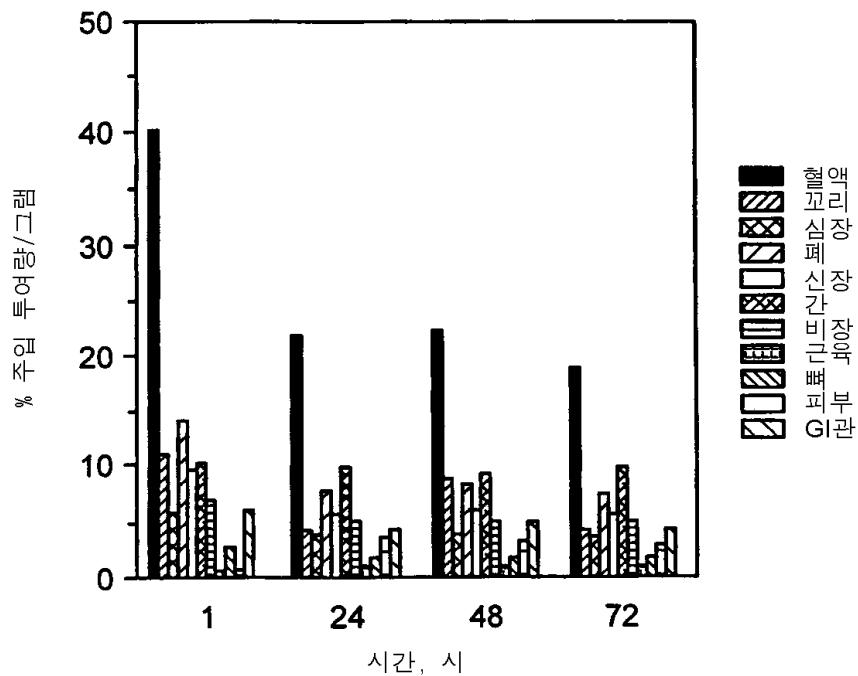
## 도면22b

BALB/C 마우스로부터 2B8,  
2B8-MX-DTPA의 혈액 제거



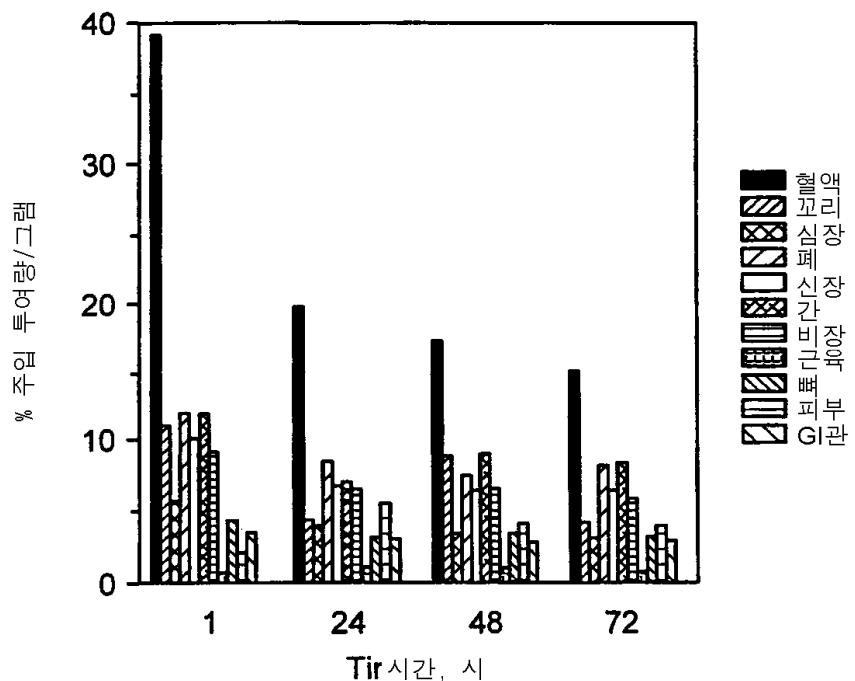
## 도면23

[111]-In-2B8-MX-DTPA 생체분포



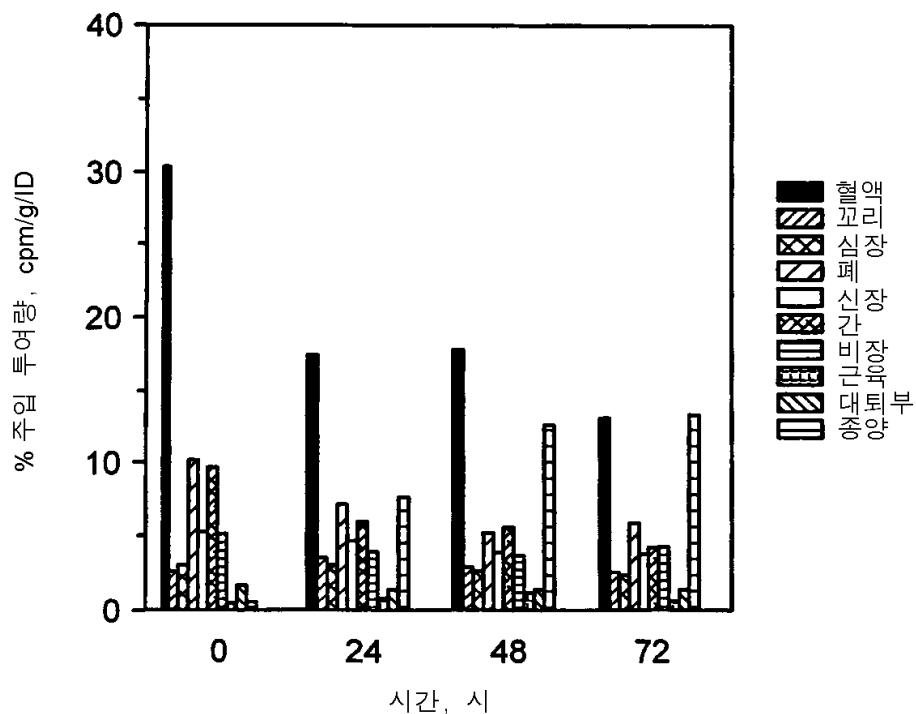
## 도면24

[90]-Y-2B8-MX-DTPA 생체분포



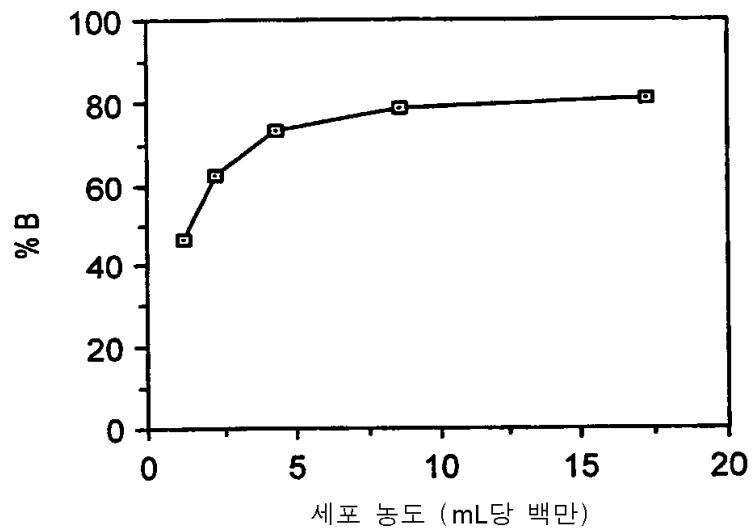
## 도면25

111 In-2B8-MX-DTPA 종양 위치



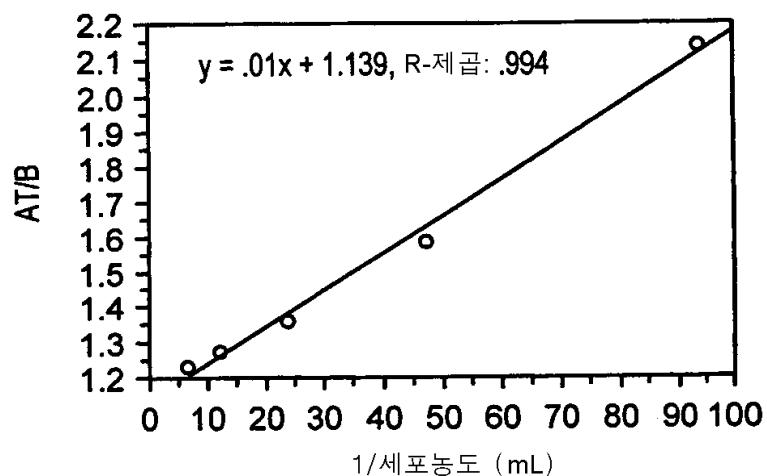
도면26a

CD20 양성 인간 세포에 대한  
 $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 결합



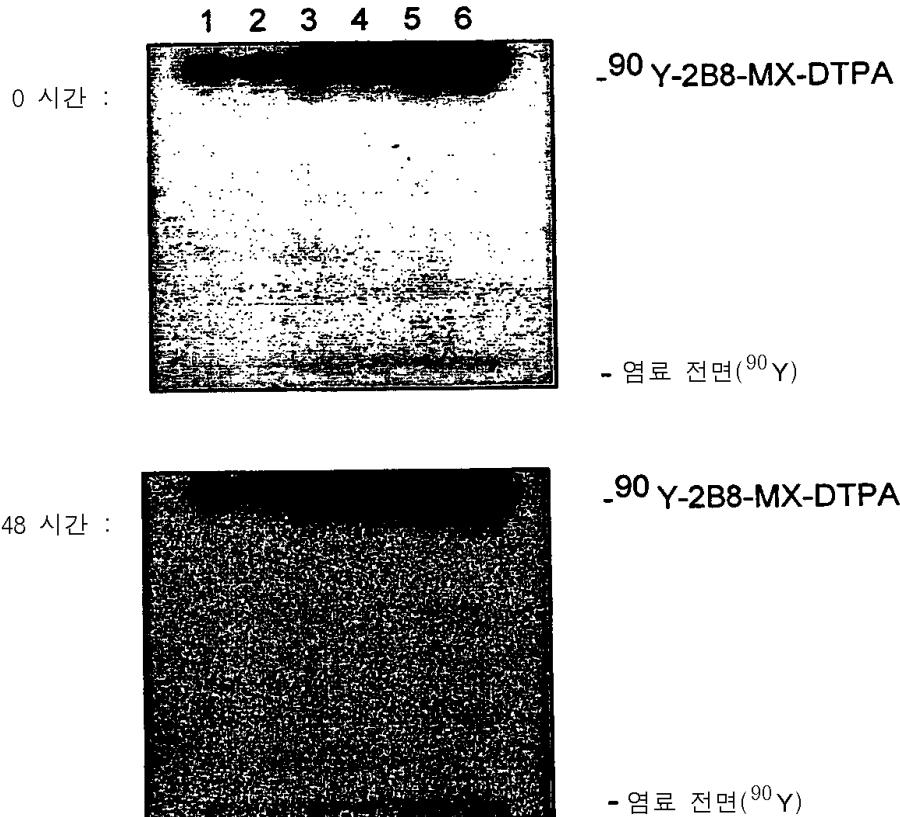
도면26b

CD20 양성 인간 세포에 대한  
 $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 결합



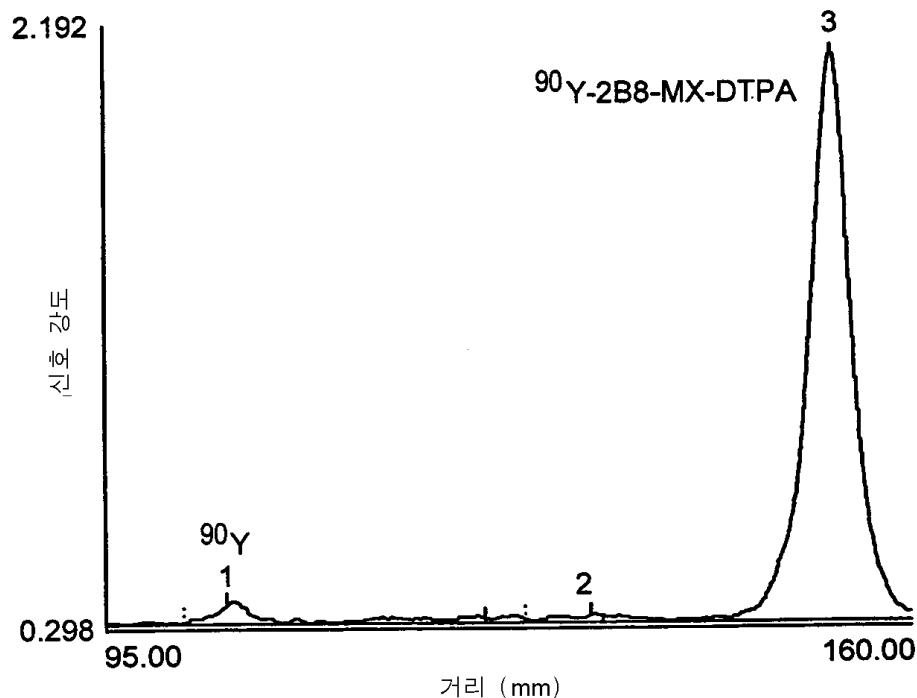
도면27

인간 혈청 알부민 및 DTPA를 합유하는 PBS 종에서  
 $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



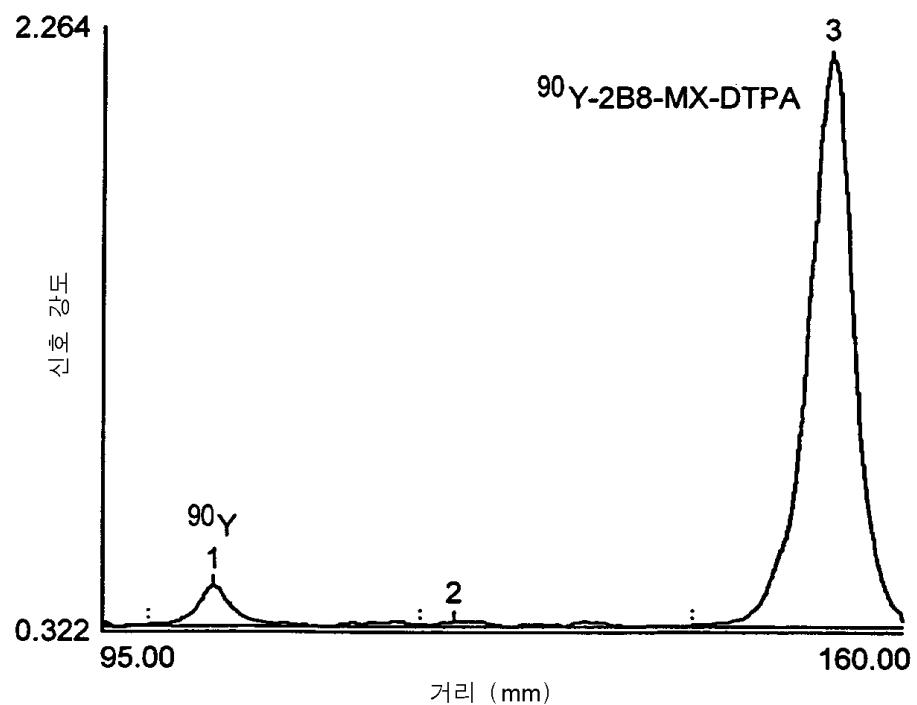
## 도면28

인간 혈청 알부민 및 DTPA를 함유하는 PBS 중에서  
 $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



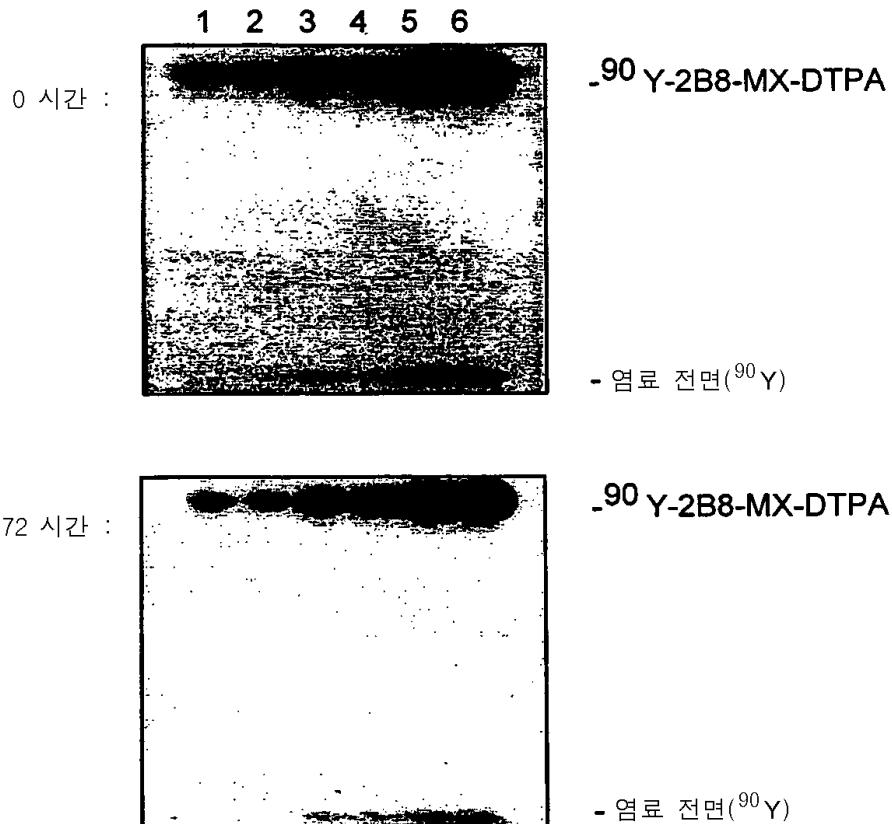
## 도면29

인간 혈청 알부민 및 DTPA를 함유하는 PBS 중에서  
 $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



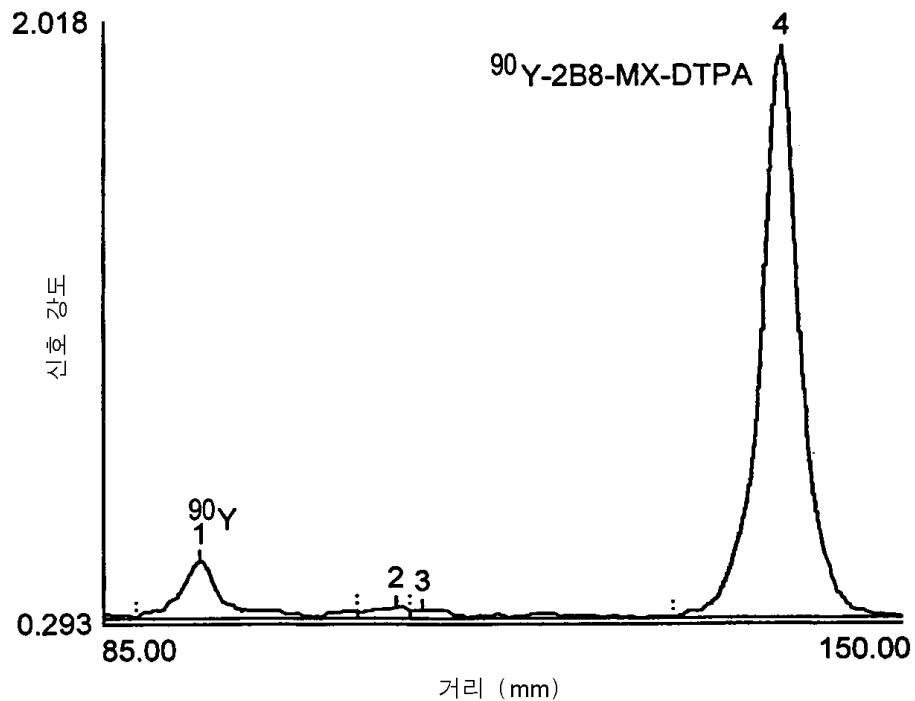
도면30

인간 혈청 중에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된  
2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성



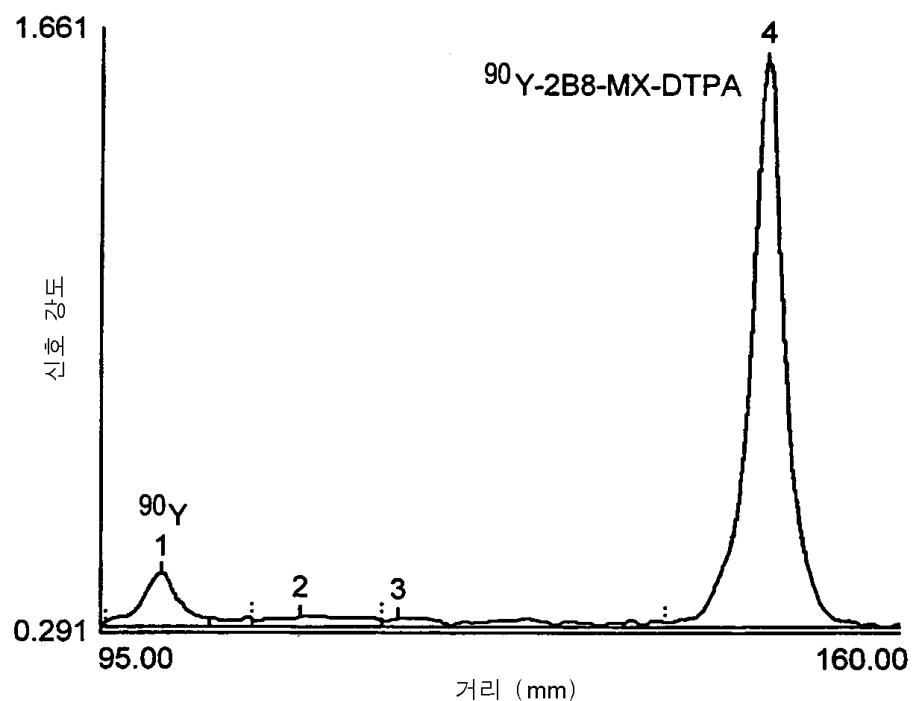
도면31

인간 혈청 중에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된  
2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성

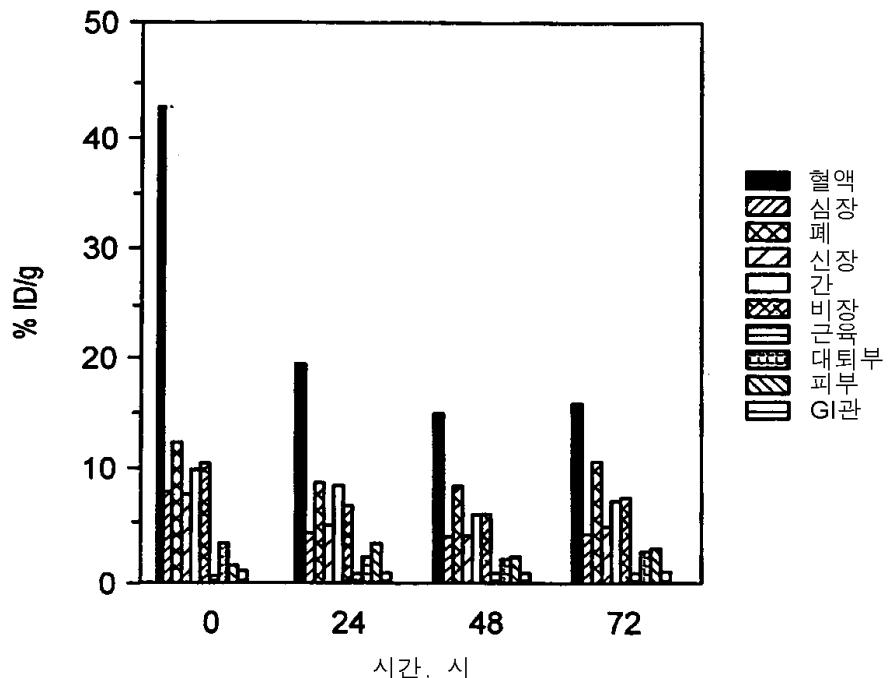


도면32

인간 혈청 중에서 배양된  $^{90}\text{Y}$ -표지된  
2B8-MX-DTPA의 시험관 내 안정성

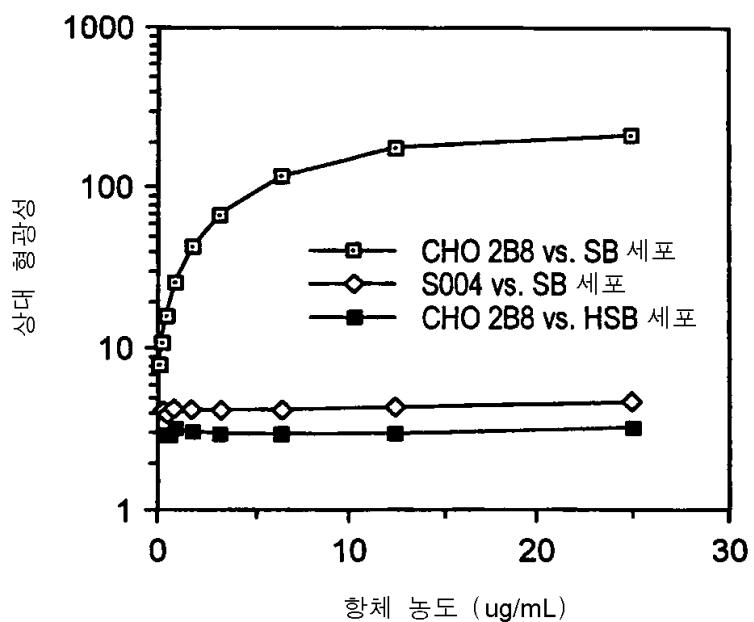


## 도면33

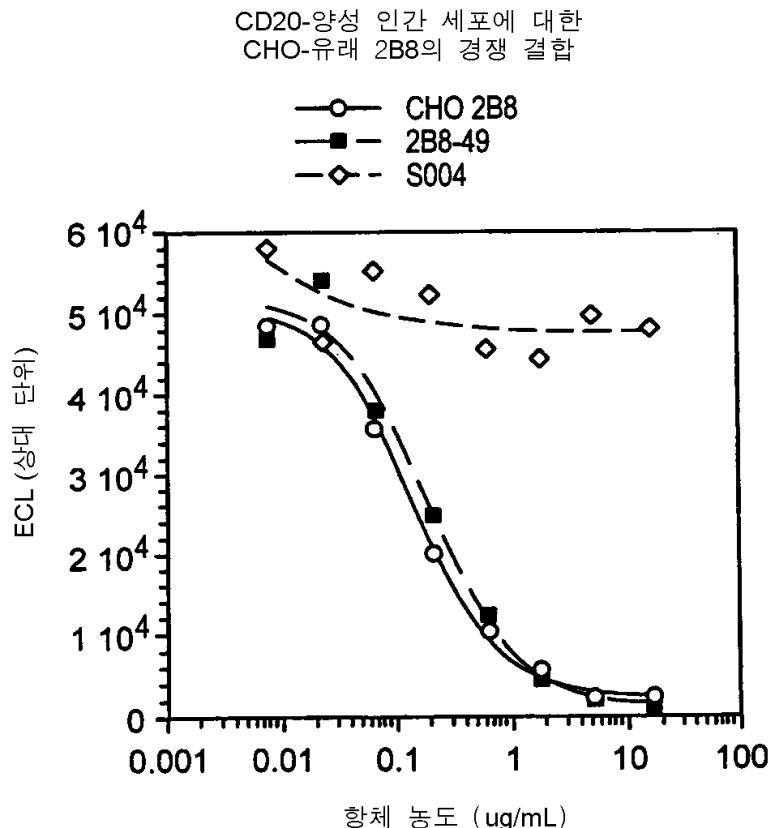
마우스에서  $^{90}\text{Y}$ -표지된 2B8-MX-DTPA의 생체분포

## 도면34

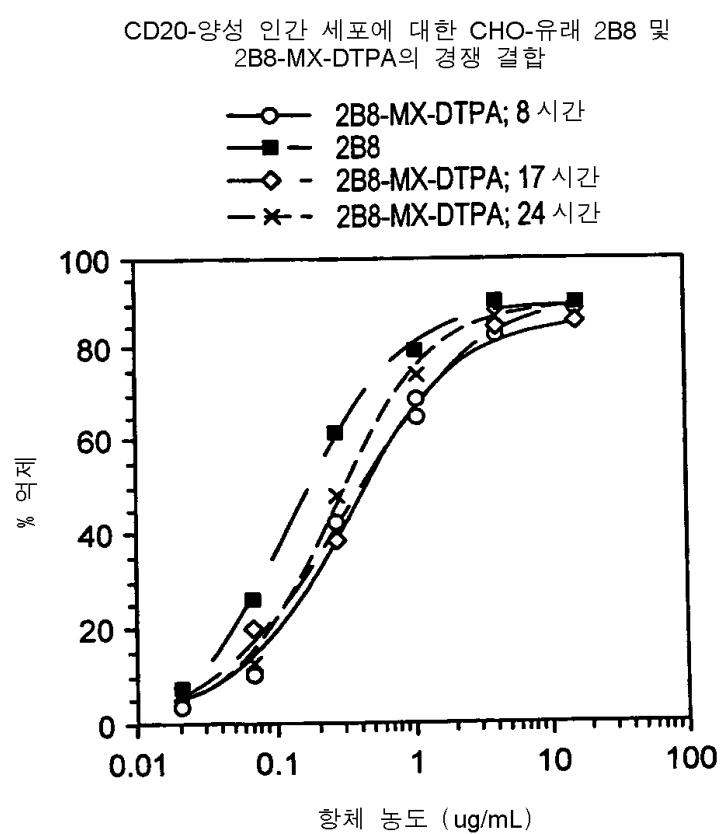
CD20-양성 및 CD20-음성 인간 세포에 대한 CHO-유래 2B8의 직접 결합



## 도면35

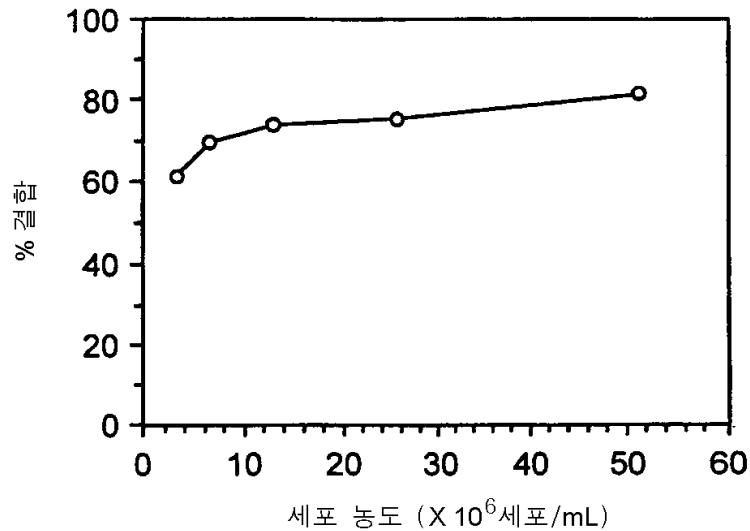


## 도면36



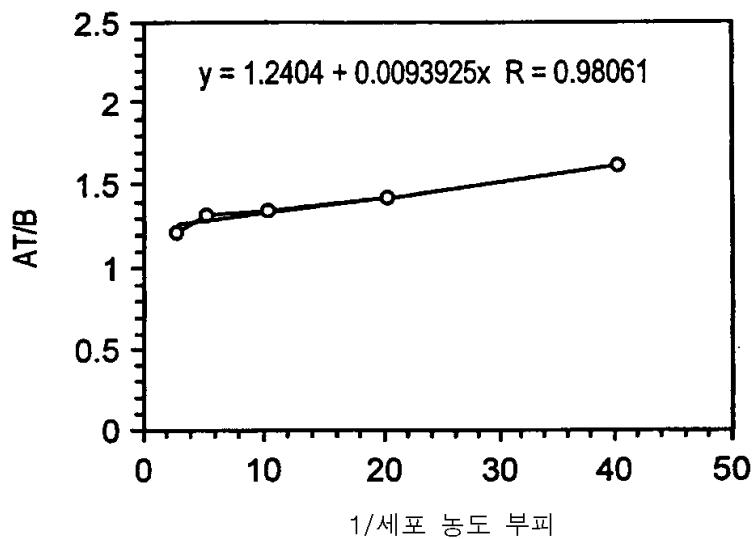
도면37a

CD20-양성 세포에 대한 CHO  
2B8-MX-DTPA로부터 제조된 In2B8의 결합



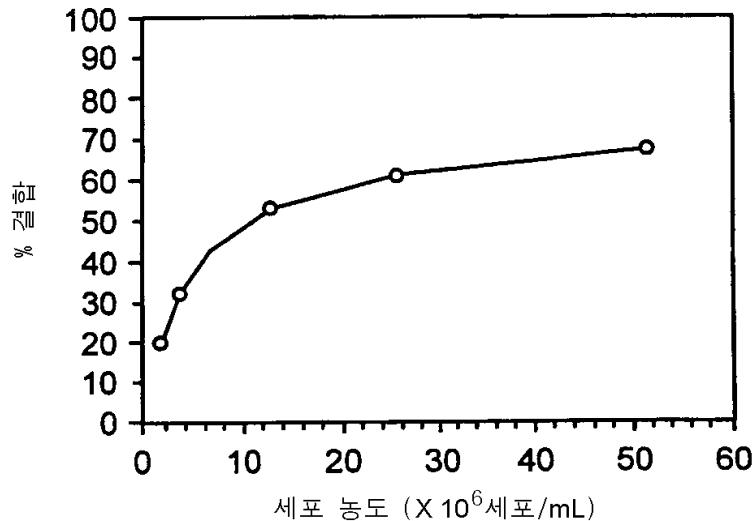
도면37b

CD20-양성 세포에 대한 CHO  
2B8-MX-DTPA로부터 제조된 In2B8의 결합



도면38a

CD20-양성 세포에 대한 CHO  
2B8-MX-DTPA로 부터 제조된 Y2B8의 결합



도면38b

CD20-양성 세포에 대한 CHO  
2B8-MX-DTPA로 부터 제조된 Y2B8의 결합

