



HU000230516B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **230 516**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 13 00275**(51) Int. Cl.: **G01N 335/34** (2006.01)(22) A bejelentés napja: **2000. 02. 29.****G01N 33/60** (2006.01)(40) A közzététel napja: **2002. 11. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2016. 11. 28.**

(30) Elsőbbségi adatok:

P0202522	2000. 02. 29.	HU
09/259,337	1999. 03. 01.	EU

(73) Jogosult(ak):

**Biogen Idec Inc., Cambridge, Massachusetts
(US)**

(72) Feltaláló(k):

Chinn, Paul, Vista, Kalifornia (US)
Morena, Ronald, El Cajon, Kalifornia (US)
Labarre, Michael, San Diego, Kalifornia (US)
Leonard, John E., Carlsbad, Kalifornia (US)

(74) Képviselő:

SBGK Szabadalmi Ügyvivői Iroda, Budapest

(54)

Radioaktív jelölő készlet és kötési mérőeljárás

(57) Kivonat

A találmány antitest kötési mérőeljárásokra és radioaktív jelölő készletekre, reagensekre és eljárásokra vonatkozik terápiás antitestek radioaktív jelölésére és klinikai hatásosságának tesztelésére tumorok és tumorsejtek kezelése/leképezése céljából. Specifikusan a találmány szerinti készleteket olyan radioaktívan jelölt antitest-konjugátumok előállítására és kiértékelésére alkalmazzák, melyet a CD20 B-sejt felszíni antigén megcélzásával B-sejt limfóma tumorok kezelésére és leképezésére alkalmaznak.

Radioaktív jelölő készlet és kötési mérőeljárás

A találmány antitest kötési mérőeljárásokra és radioaktív jelölő készletekre, liofilizált sejt-készítményekre, reagensekre és eljárásokra vonatkozik terápiás antitestek klinikai hatásosságának tesztelésére tumorok és tumorsejtek kezelése/leképzése céljából. Specifikusan a találmány szerinti készleteket olyan radioaktívan jelölt antitest konjugátumok előállítására és kiértékelésére használjuk, melyeket a BP35 B-sejt felszíni antigén („CD20”) megcélzásával B-sejt limfóma tumorok kezelésére és leképzésére alkalmazunk.

Az összes publikáció és szabadalmi bejelentés referenciaként a találmány részét képezi ugyanolyan terjedelemben, mintha mindegyik publikációnál vagy szabadalmi bejelentésnél specifikusan és egyenként megjelöltük volna, hogy az referenciaként a leírásba épül.

A gerincesek immunrendszere (például a főemlősöké, melybe az emberek, félmajmok, majmok, stb. tartoznak), számos szervből és sejttípusból áll, melyek abba az irányba fejlődtek, hogy hibátlanul és fajlagosan felismerjék az idegen mikroorganizmusokat („antigén”), melyek megtámadják a gerinces gazdát; specifikusan kötődjenek az ilyen idegen mikroorganizmusokhoz; és megsemmisíték/elpusztítsák az ilyen idegen mikroorganizmusokat.

A limfociták valamint más sejttípusok alapvető fontosságúak

az immunrendszer számára. A limfocitákat a csecsemőmirigy, lép, és a csontvelő (felnőtt) termeli, és az emberek (felnőttek) keringési rendszerében jelen lévő összes fehérvérsejt körülbelül 30%-át képviselik.

A limfocitáknak két fő szubpopulációja van: a T-sejtek és a B-sejtek. A T-sejtek a felelősek a sejtközvetített immunitásért, míg a B-sejtek az antitest-termelésért felelősek (humorális immunitás). Mindemellett a T-sejtekre és a B-sejtekre úgy tekinthetünk, hogy azok kölcsönösen függnek egymástól - egy jellemző immunválaszban a T-sejtek akkor aktiválódnak, amikor a T-sejt-receptor egy antigén fragmentumaihoz kötődik, melyek a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) glikoproteinjeihez kötődnek egy antigénprezentáló sejt felszínén; az ilyen aktiváció biológiai mediátorok („interleukinek”) felszabadulását okozza, mely a B-sejteket lényegében arra stimulálja, hogy differenciálódjanak, és az antigén ellen antitesteket („immunglobulinok”) termeljenek.

A gazdában minden B-sejt különböző antitestet expresszál a felszínén - tehát egy B-sejt egy antigénre specifikus antitestet fog kifejezni, míg egy másik B-sejt egy eltérő antigénre specifikus antitestet fog expresszálni. Következésképpen a B-sejtek meglehetősen sokfélék, és ez a sokféleség alapvető fontosságú az immunrendszer számára. Emberekben mindegyik B-sejt az antitest molekulák hatalmas számát (azaz körülbelül 10^7 - 10^8) képes termelni. Az ilyen antitest-termelés jellemzően megszűnik (vagy jelentősen lecsökken), amikor az idegen antigén semlegesítődött. Esetenként azonban egy adott B-sejt proliferációja változatlanul folytatódik; az ilyen proliferáció „B-sejt limfómának” nevezett

rákot eredményezhet.

A T sejtek és B sejtek is tartalmazznak sejtfelszíni fehérjéket, melyeket a differenciáció és az azonosítás „markerei”-ként hasznosíthatunk. Egy ilyen humán B-sejt marker a csak a humán B-limfocitákra korlátozódó Bp35 differenciációs antigén, melyre „CD20”-ként hivatkozunk. A CD20 a korai-pre-B-sejt-fejlődés alatt fejeződik ki, és a plazmasejt-differenciációig fennmarad. A CD20 molekula az aktivációs folyamatban különösen egy olyan lépést szabályoz, mely a sejtciklus beindításához és a differenciációhoz szükséges, és általában nagy mértékben fejeződik ki a neoplasztikus („tumoros”) B-sejtekben. A definíció szerint a CD20 a „normális” B-sejteken valamint a „malignus” B-sejteken is jelen van, azaz azokon a B-sejteken, melyeknek nem csökkenő proliferációja B-sejt limfómához vezet. Tehát a CD20 felszíni antigén magában foglalja annak a lehetőségét, hogy B-sejt limfómák „megcélzására” szolgáljon.

Lényegében az ilyen célbavétel a következőképpen általánosítható: A B-sejtek CD20 felszíni antigénjére specifikus antitesteket egy betegbe például beoltjuk. Ezek az anti-CD20 antitestek specifikusan kötődnek a (látszólag) normális és malignus B-sejtek CD20 sejtfelszíni antigénjéhez; a CD20 felszíni antigénhez kötött anti-CD20 antitest a neoplasztikus B-sejtek megsemmisítéséhez és kimerítéséhez vezethet. Továbbá olyan kémiai szerek és radioaktív jelek konjugálhatók az anti-CD20 antitesthez, melyek megsemmisítik a tumort, úgy hogy a szert specifikusan például a neoplasztikus B-sejtekhez „szállítja”. A módszertől függetlenül az elsődleges cél a tumor megsemmisítése: a specifikus módszert az adott, alkalmazott anti-CD20 antitest határozhatja

meg, és így a CD20 antigén megcélzásának lehetséges módszerei jelentősen változhatnak.

Például már beszámoltak ilyen, a CD20 felszíni antigén célba-vételére tett kísérletekről. Állítólag 1F5 egér monoklonális antitestet (egy anti-CD20 antitestet) adtak be a B-sejt limfómás betegeknek folyamatos intravénás infúzióval. Arról számoltak be, hogy az 1F5 rendkívül nagy mennyisége (2 gramm) volt szükséges a keringő tumorsejtek kimerítéséhez, és az eredményekről azt írták, hogy „átmenetiek” voltak. [Press et al., „Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas”, Blood 69/2, 584-591 (1987)].

Evvel a módszerrel kapcsolatban az a potenciális probléma áll fenn, hogy a nem-humán monoklonális antitesteknek (például egérfélék monoklonális antitestjeinek) jellemzően hiányzik az effektor funkciójuk. Azaz ezek többek között, képtelenek komplementtől függő lízist közvetíteni, vagy lizálni a humán célsejteket az antitestfüggő sejtes toxicitáson vagy az Fc-receptor által közvetített fagocitózison keresztül. Továbbá a nem humán monoklonális antitesteket a humán gazdaszervezet idegen fehérjeként ismeri fel; ezért az ilyen antitestek ismételt beadása immunválaszok kiváltásához vezethet, melyek káros hiperszenzitivitási reakciókhoz vezetnek. Az egérféléken alapuló monoklonális antitesteknél ezt gyakran Humán Anti-Egér Antitest válasznak vagy „HAMA” válasznak nevezik. Továbbá ezeket az idegen antitesteket a gazda immunrendszere megtámadhatja úgy, hogy ezek végeredményben semlegesítődnek, mielőtt elérnék a célhelyüket. A limfociták és limfómasejtek velük születetten érzékenyek a radioterápiára. Tehát a rosszindulatú B-sejtek vonzó célpont-

jai a radioimmunterápiának (RIT) több okból is: a radioaktívan jelölt antitestek ionizáló sugárzásának lokális emissziója elpusztíthatja a célantigénnel (például CD20-szal) rendelkező vagy anélküli sejteket az antigénhez kötött antitest közvetlen közelében; a mélyre hatoló sugárzás, azaz a béta-sugárzók megakadályozhatják azt a problémát, hogy az antitestek korlátozottan tudnak bejutni a vastag vagy vérerekkel gazdagon ellátott tumorokba; és így a teljes antitest-mennyiség szükségletet lecsökkenthetik. A radionuklidok radioaktív részecskéket bocsátanak ki, melyek a celluláris DNS-t azon a ponton károsíthatják, ahol a sejtes javító mechanizmusok képtelenek a sejt életének folytatását lehetővé tenni, ha a célsejtek tumorok, a radioaktív jel gyógyító hatással elpusztítja a tumorsejteket. A radioaktívan jelölt antitestek, a definíció szerint, egy radioaktív anyag alkalmazását foglalják magukban, mely óvintézkedéseket kíván a betegről (azaz a lehetséges csontvelő transzplantáció alanyától) valamint az egészségügyi dolgozótól (azaz nagyfokú óvatosságra van szükség, amikor radioaktivitással dolgoznak).

Tehát az egyik módszernél az egérféle monoklonális antitestek azon képességének javítására, hogy a B-sejt rendellenességekre hatással legyenek, egy radioaktív jelet konjugáltak az antitesthez úgy, hogy a jel vagy a toxin a tumor helyére lokalizálódjon. Toxinokat (azaz kemoterápiás szereket, mint például doxorubicint vagy mitomicin C-t) szintén konjugáltak már az antitestekhez. Lásd például a WO 92/074466 számú nemzetközi közzétételi iratot (1992. május 14-én publikálva).

A „konjugált” antitestek alternatívájaként „kiméra” antitesteket, azaz olyan antitesteket fejlesztettek ki, melyek két vagy

több faj (például egér és ember) részeit tartalmazzák. Egér/humán kiméra antitesteket hoztak létre, és kimutatták a szülő egér antitest kötési jellemzőit és a humán konstans régióhoz kapcsolódó effektor funkciókat. Lásd például Cabilly et al., 4 816 567 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírását; Shoemaker et al., 4 978 745 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírását; Beavers et al. 4 975 369 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírását, és Boss et al. 4 816 397 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírását, melyek mindegyike referenciaként a leírásba épül. Általánosságban ezeket a kiméra antitesteket úgy állítják elő, hogy egy már létező egérféle hibridómákból kivont DNS-ből genomiális génkönyvtárat készítenek [Nishimura et al., Cancer Research 47, 999(1987)]. A könyvtárat ezután olyan nehéz- és könnyűláncokból származó variábilis régió génekre szűrik, melyek helyes antitestfragmentum újrarendeződési mintázatot mutatnak. A klónozott variábilis régió géneket ezután egy, a megfelelő nehéz- vagy könnyűlánc humán konstans régió gén klónozó kazettáit tartalmazó expressziós vektorba ligálják. A kiméra géneket ezután egy kiválasztott sejtvonalban, általában egérféle mielóma-vonalban fejezik ki.

Például Liu A. Y. és munkatársai az „Egy CD20 elleni, hatásos Fc-dependens biológiai aktivitással rendelkező, egér-humán kiméra monoklonális antitest előállítására” című művében [J. Immun. 139/10, 3521-3526 1987]] egy CD20 antigén ellen irányuló egér/humán kiméra antitestet írnak le. Lásd még például a WO 88/04936 számú nemzetközi közzétételi iratot is. Azonban nem közöltek információkat ezen az irodalmi helyen a Liu-féle kiméra

antitestek alkalmazásának sem a hatásosságáról sem a praktikus-ságáról a B-sejt rendellenességek kezelésénél.

Megjegyzendő, hogy az *in vitro* funkcionális mérőeljárások (például komplement-függő lizis („CDC”), antitest-függő sejtes citotoxicitás („ADCC”), stb.) nem képesek eredendően megjósolni semelyik antitestnek sem azt a képességét, hogy *in vivo* elpusztítják-e vagy kimerítik-e a specifikus antigént kifejező célsejtet. Lásd például Robinson és munkatársai munkáját [„Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate different anti-tumor cell biological activities” (Kiméra egér-humán anti-karcinóma antitestek, melyek eltérő anti-tumorsejt biológiai aktivitást közvetítenek), Hum. Antibod. Hybridomas 2, 84-93 (1991) (nem kimutatható ADCC aktivitással rendelkező kiméra egér-humán antitest)]. Ezért az antitestek potenciális terápiás hatékonyságát valójában csak *in vivo* kísérletezéssel lehet mérni.

Ebből a célból a 08/475 813, 08/475 815 és 08/478 697 számú függő amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentések, melyek referenciaként teljes terjedelmükben a leírásba épülnek, radioaktívan jelölt anti-CD20 konjugátumokat ismertetnek B-sejt limfóma tumorok diagnosztikai „leképzésére” a terápiás antitest beadása előtt. A „In2B8” konjugátum egy humán CD20 antigénre specifikus egér monoklonális antitestet, a 2B8-t tartalmazza, mely az indium[111]-hez (In^{111}) egy bifunkcionális kelátképzőn, azaz az MX-DTPA-n (dietilén-triamin-pentaecetsav) át kapcsolódik, mely az 1-izotiocianáto-benzil-3-metil-DTPA és az 1-metil-3-izotiocianáto-benzil-DTPA 1:1 arányú elegyét tartalmazza. Diagnosztikai radionuklidként azért választották az indium[111]-t, mert az gamma-sugarakat bocsát ki, és elsődlegesen leképző

szerként történő alkalmazását fedezték fel.

A kelátképzőkre és kelátképző-konjugátumokra vonatkozó szabadalmi leírások a szakterületen jól ismertek. Például Gansow 4 831 175 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírása többszörösen szubsztituált dietilén-triamin-pentaecetsav kelátokra és ezt tartalmazó fehérjekonjugátumokra és az előállítási eljárásaira vonatkozik. Gansow 5 009 069, 5 246 692, 5 286 850 és 5 124 471 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírása szintén többszörösen szubsztituált DTPA kelátokra vonatkozik. Ezek a szabadalmi leírások referenciaként teljes terjedelmükben a leírásba épülnek.

A 08/475 813, 08/475 815 és 08/478 967 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben a kelátképzés elősegítésére specifikus bifunkcionális kelátképzőt választottak, mivel ennek nagy az affinitása a három vegyértékű fémek iránt, és megnövekedett tumor/nem tumor arányokat, csökkent csont általi felvételt és a radionuklid nagyobb mértékű in vivo fennmaradását biztosítja a célhelyeken, azaz a B-sejt limfóma tumor helyein. Mindemellett más bifunkcionális kelátképzők is ismertek a szakterületen, és ezek szintén jótékony hatásúak lehetnek a tumorterápia során.

A 08/475 813, 08/475 815 és 08/478 967 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben radioaktívan jelölt terápiás antitesteket is ismertetnek a B-sejt limfómák és tumorsejtek elpusztítására. Pontosabban, az Y2B8 konjugátum ugyanezt a 2B8 anti-humán CD20 egérféle monoklonális antitestet tartalmazza az ittrium-[90] (^{90}Y)-hoz kapcsolva ugyanezzel a bifunkcionális kelátképzővel. Ezt a radionuklidot hasonló okok-

ből választották ki a terápiára. Az ^{90}Y 64 órás féléletideje elegendően hosszú ahhoz, hogy lehetővé tegye az antitest felhalmozódását a tumornál, és a ^{131}I -től eltérően, ez egy tiszta, nagy energiájú béta-sugárzó, melyhez lecsengésekor nem kapcsolódik gamma-sugárzás, és 100-1000 sejt átmérő tartománnyal rendelkezik. A kiszűrődő sugárzás minimális mennyisége lehetővé teszi az ^{90}Y -jelölt antitestek ambuláns beadását. Továbbá a sejt elpusztításához nem szükséges a jelölt antitestek bejutása, és az ionizáló sugárzás lokális kisugárzása letális a cél-antigén nélküli szomszédos tumorsejtekre.

Mivel a ^{90}Y radionuklidot ugyanazt a bifunkcionális kelátképző molekulát, az MX-DTPA-t alkalmazva kapcsolták a 2B8 antitesthez, az Y2B8 konjugátum ugyanazokkal az előnyökkel rendelkezik, mint amiket fentebb tárgyaltunk, például a radionuklid meghosszabbodott fennmaradásával a célhelynél (tumor). Szemben a ^{111}In -nel ezt nem lehet leképzési célokra felhasználni, mivel nem jár vele gamma-sugárzás. Tehát egy diagnosztikai „leképző” radionuklid, mint például a ^{111}In egy tumor elhelyezkedésének és relatív méretének meghatározására alkalmazható a terápiás kiméra vagy ^{90}Y -jelölt antitestek tumorcsökkentés céljából történő beadás előtt és/vagy követően. Továbbá az indium-jelölt antitest lehetővé teszi dozimetriás mérés elvégzését.

Attól függően, hogy az antitestet mire kívánjuk felhasználni, azaz diagnosztikai vagy terápiás reagensként, más-más radioaktív jelek ismertek a szakterületen, és már hasonló célokra felhasználták ezeket. Például a klinikai diagnózisban már alkalmazott radionuklidok közé tartozik a ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{67}Ga valamint ^{111}In . Az antitesteket már egy sor különböző radionukliddal is

jelölték a célzott immunterápiában történő potenciális alkalmazás céljából [Peirersz et al., The use of monoclonal antibody conjugates for the diagnosis and treatment of cancer" (Monoklonális antitest konjugátumok alkalmazása rák diagnosztizálására és kezelésére) Immunol. Cell. Biol. 65, 111-125 (1987)]. Ezek közé a radionuklidok közé tartoznak a ^{188}Re és ^{186}Re valamint a ^{90}Y , és kisebb mértékben a ^{199}Au és a ^{67}Cu . Az I-[131]-t szintén alkalmazták már terápiás célokra. Az 5 460 785 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás az ilyen radioizotópok listáját biztosítja, és referenciaként a leírásba épül.

Ahogy a 08/475 813, 08/475 815 és 08/478 967 számú függő amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentések beszámoltak róla, a radioaktívan jelölt Y2B8 konjugátum valamint a jelöletlen kiméra anti-CD20 antitest jelentős tumorcsökkenést okozott B-sejt limfoblaszt tumort hordozó egerekben. Továbbá az itt ismertetett humán klinikai kísérletek jelentős B-sejt kimerülést mutattak a limfómás betegekben, melyekbe infúzióval kiméra anti-CD20 antitestet juttattak be. Valójában a kiméra 2B8-t a közelmúltban a nemzet első FDA által jóváhagyott rákellenes monoklonális antitestjének kiáltották ki Rituxan[®] néven. Tehát legalább egy kiméra anti-CD20 antitestről kimutatták már, hogy terápiás hatékonyságot mutat a B-sejt limfóma kezelésében.

Továbbá a 08/475 813 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés, mely referenciaként a leírásba épül, a Rituxan[®], egy kiméra anti-CD20 egymás utáni beadását ismerteti, indiummal jelölt vagy ittriummal jelölt egérféle monoklonális antitesttel vagy mindkettővel. Bár az ezekben a kombinált terá-

piákban alkalmazott radioaktívan jelölt antitestek egérfélék antitestei, a kiméra anti-CD20-szal történő kezelés elegendően kimeríti a B-sejt populációt, úgy, hogy csökken a HAMA válasz, ezáltal kombinált terápiás és diagnosztikai beadási módot tesz lehetővé.

Tehát a kombinált immunterápiának ebben az értelmezésében az egérféle antitestek különösen alkalmasak lehetnek diagnosztikai reagensként. Sőt a 08/475 813 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben kimutatták, hogy az ittriummal jelölt anti-CD20 antitest hatásos dózisa a Rituxan® beadása után elegendő (a) a megmaradt perifériás vér B-sejtek eltávolítására, melyeket a kiméra anti-CD20 antitest nem távolított el; (b) B-sejt kimerítést indít el a nyirokcsomókból; vagy (c) B-sejt kimerülést indít el a más szövetekből.

Tehát a radioaktív jeleknek a rákterápiás antitestekhez való konjugálása egy értékes klinikai eszközt biztosít, mely az ilyen antitestek potenciális terápiás hatékonyságának mérésére, a kezelés lefolyásának nyomon követésére szolgáló diagnosztikai reagensok létrehozására és további olyan terápiás reagensok tervezésére használható fel, melyeket a kiméra antitest kezdeti tumor-pusztító potenciáljának fokozására alkalmazhatunk. Figyelembe véve egy anti-CD20 antitest bizonyított hatékonyságát a nem-Hodgkin limfóma kezelésében, és a limfociták érzékenységét a radioaktivitással szemben, nagyon előnyös lenne, ha az ilyen terápiás antitestek kereskedelemben készlet formájában beszerezhetőek lennének, melyek egy radioaktív jellel gyorsan módosíthatók, és közvetlenül beadhatók a betegnek klinikai körülmények között.

Bár számos módszer és reagens létezik az antitestek radioak-

tív jelölésének végrehajtására, hiányzik a szakterületen egy hagyományos hordozó ezeknek a reagenseknek a klinikai környezetbe vivésére, olyan módon, hogy azok könnyen előállíthatóak és beadhatóak legyenek a betegnek mielőtt a radioaktív jel jelentős legyengülése vagy az antitest radioaktív jel miatti jelentős lebomlása megtörténne. Az értékes technológia kereskedelmi forgalomba hozása céljára szolgáló megfelelő eszközök hiányának az oka az, hogy gyenge a beépülési hatékonyság, ezt több ismert jelölő eljárással kimutattak már, és hogy utólagos oszlopon történő tisztításra van szükség a radioaktív jelölési eljárás után. Annak az oka, hogy késlekednek az ilyen készletek kifejlesztésével, részben az lehet, hogy korábban nem lehetett beszerezni tiszta, kereskedelmi forgalomban lévő radioizotópokat, melyeket hatásosan alkalmazhattak volna jelölt termékek létrehozására utólagos tisztítás nélkül. Másik lehetőségként talán az az oka annak, hogy ilyen készletek általában nem hozzáférhetőek, hogy jelenleg hiányoznak azok az antitestek, melyek képesek elérni a Rituxan®-nak a limfómák kezelésére a humán betegekben elért hozzájárulását vagy hatékonyságát.

Például, ahogy a 4 636 380 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik, mely referenciaként a leírásba épül, a tudományos világban általánosságban úgy gondolják, hogy ahhoz, hogy egy radioaktív gyógyszer klinikai felhasználását felfedezzék, hosszú és fáradságos szeparációs és tisztítási eljárást kell végrehajtani. Valóban nem kívánatos a nem kötött radioaktív jel beinjektálása a betegbe. A további tisztítási lépések szüksége miatt az antitestek radioaktív jelölési eljárása lehetetlen klinikai környezetben, különösen azoknak az

orvosoknak a számára, akiknek sem felszerelésük sem idejük nincs a saját gyógyszereik tisztítására.

Továbbá a radioaktívan jelölt fehérjék eredendően instabilak lehetnek, különösen azok, melyeket radiolítikus izotópokkal, mint például ^{90}Y -nal jelöltek, melyek annál inkább hajlamosak károsítani az antitestet, minél közelebb kapcsolódnak ahhoz. Viszont ez a radiolízis a gyógyszer megbízhatatlan hatékonyságát okozza a radioaktív jel elvesztése és/vagy a célantigén lecsökkent kötése miatt, és a denaturált fehérjére irányuló nem kívánt immunválaszokhoz vezethet. Az antitestek helyben történő jelölésére és tisztítására szolgáló eszközök hiányában a klinikai orvosoknak nem volt választásuk, vagy megrendelték a már jelölt terápiás antitestet, vagy nem a helyszínen jelöltették meg egy megfelelő berendezéssel, és a jelölést követően átszállították a betegbe történő beadáshoz. Az összes ilyen manipuláció megnöveli a jelölés és a beadás közötti értékes időt, ezáltal hozzájárul a gyógyszer instabilitásához, így tulajdonképpen csökkentí a radioaktív jelölő készlet hasznosíthatóságát a klinikai környezetben.

Mások sikertelenül próbálkoztak olyan antitest radioaktív jelölési készlet kifejlesztésével, mely elég szakszerű lett volna ahhoz, hogy elkerülhető legyen vele az antitest külön tisztítási lépése. Például a Cytogen a közelmúltban kibocsátott egy kereskedelemben kapható készletet a TAG-72 tumor-asszociált glikoprotein elleni egérféle monoklonális antitest radioaktív jelölésére. Azonban a Cytogen antistete különösen alkalmatlan készlet készítményként, annak köszönhetően, hogy hajlamos részecskéket kialakítani a tárolás alatt, melyeket később egy to-

vábbi szűrési lépéssel kell eltávolítani. Továbbá a Cytogen antitestek káros reakciókat okozott a betegekben a HAMA immunválaszoknak köszönhetően.

Mások olyan radioaktív jelölő eljárásokat fejlesztettek ki, melyek alkalmasak olyan készlet formára, melyben nincs szükség egy külön tisztítási lépésre [Richardson et al., „Optimization and batch production of DTPA-labeled antibody kits for routine use in ^{111}In immunoscintigraphy” (DTPA-jelölt antitest készletek optimalizálása és nagy tételben történő előállítása ^{111}In immunszcintográfiában való rutin alkalmazáshoz), Nuc. Med. Commun. 8, 347-356 (1987); Chinol és Hnatowich, „Generator-produced yttrium-[90] for radioimmunotherapy” (Generátor által előállított ittrium-[90] radioimmunoterápiához) J. Nucl. Med. 28(9), 1465-1470 (1987)]. Azonban ezek az eljárások nem képesek a beépülésnek azt a szintjét elérni, mint amit mi elértünk a bejelentésben ismertetett eljárások alkalmazásával, melyek legalább 95%-os beépülési hatékonyságot eredményeznek. Egy ilyen szintű beépülés pozitív irányban járul hozzá a megnövekedett biztonsághoz, mert gyakorlatilag nem fogunk nem kötött jelet bejuttatni a betegbe a kismértékű radioaktivitás-beépülés következtében.

A találmány szerinti készlettel végzett eljárások gyors jelölést tesznek lehetővé, mely hozzávetőleg fél óra alatt elvégezhető vagy egészen kevés idő, akár öt perc alatt is, a jeltől függően. Mindemellett a találmány szerinti készlethez tartozó eljárás több mint 95%-os jelölési hatékonyságú, ezáltal elkerüljük azt, hogy további tisztításra legyen szükség. A további tisztítás elkerülésével a radioaktív jel féléletideje és az an-

titest épsége megőrződik arra a terápiás célra, mely miatt a jelölést végeztük.

A bejelentés olyan hagyományos készleteket és eljárásokat ismertet, melyekkel a diagnosztikai és terápiás antitestek reprodukálható, megbízható és kényelmes módon radioaktívan megjelölhetők és beadhatók egy betegnek. A találmány szerinti készletek az antitestek radioaktív jelölési eljárását egy zavarmentes, kellemetlenségek nélküli standardizált eljárássá változtatják, mely nagyban segíti a betegek kezelési eljárását. Ezek a készletek a technika állásához képest előnyösebbek, mivel a terápeutikumok vagy diagnosztikumok jelölésére és beadására szolgáló optimális paramétereket meghatároztuk, így a termékek árát lecsökkentettük. Mivel a bejelentésben ismertetett készletek az adott jelnek megfelelő optimális paramétereket biztosítják, egy adott jelhez tervezett készlet alkalmazása minimálisra csökkenti a kannibalizációt, mely például akkor fordul elő, amikor egy nem megfelelő készletet alkalmazunk egy adott jelhez. A kannibalizáció elkerülésével viszont optimális jelölési hatékonyságot is biztosítunk. Mindemellett a mindegyik készletben megtalálható eljárási útmutatók és a steril, pirogénmentes összetevők sokkal jobban felhasználóbaráttá teszik az eljárást, mivel a reagensek sterilításának, pirogenitásának vizsgálata, és a jelölés utáni tisztítás elkerülhető.

A találmány tárgya egy készlet egy diagnosztikai vagy terápiás antitest radioaktív jelölésére egy betegbe történő beadás előtt, mely tartalmaz (i) egy kelátképzővel konjugált antitestet tartalmazó fiolát, (ii) egy, a radioaktívan jelölt antitest sta-

bilizálására és beadására szolgáló készítménypuffert tartalmazó fiolát, és (iii) használati útmutatót az antitest radioaktív jelöléséhez, ahol az említett fiola alkotórészeket olyan mennyiségben és koncentrációban biztosítjuk, hogy amikor ezeket egy megfelelő tisztaságú és aktivitású radioaktív jellel összekeverjük a készlet használati útmutatójának megfelelően, nincs szükség a jelölt antitest további tisztítására azelőtt, hogy azt az említett betegnek beadjuk. Továbbá ha a készlet használati útmutatójának megfelelően és egy megfelelő tisztaságú és aktivitású radioizotóppal végezzük a jelölést, ennek az izotópnak a beépülése több mint 95%-os mértéket érhet el, akár 98%-ot vagy többet.

A készletben lévő antitest legelőnyösebben egy anti-CD20 antitest. Az antitestet olyan formában biztosítjuk, melyben egy bifunkcionális kelátképzőhöz kapcsolódik. Előnyösen az antitest MX-DTPA-hoz van konjugálva, de más kelátképzőket, mint például fenil- vagy benzil-konjugált DTPA-t, ciklohexil-DTPA-t, EDTA származékokat és DOTA-t is alkalmazhatunk. Egy találmány szerinti kelátképző bármilyen kelátképző lehet, mely legalább bifunkcionális, azaz legalább két kötési hellyel rendelkezik (legalább egy hely egy fémion kelátképzésére és legalább egy hely egy fehérjeligandum kapcsolásához).

Az alkalmazott antitesttől függően a konjugált antitestet jellemzően 0,5-30 mg/ml koncentrációban, előnyösebben 2 mg/ml koncentrációban biztosítjuk. A konjugált antitest mennyisége az optimális jelöléshez szükséges koncentrációtól és mennyiségtől függ majd a radioaktív jeltől függően. Mindemellett a konjugált antitestet egy olyan mennyiségben és koncentrációban biztosít-

jük, hogy a teljes mennyiséget tegyük majd bele a reakciófiolába egy steril fecskendőt és fertőzésmentes módszert alkalmazva. Ez megnövekedett reprodukálhatóságot és könnyű alkalmazást tesz lehetővé. Az itt ismertetett készletek összes reagense steril és pirogéntől mentes, és specifikusan az egyszerű használathoz és ahhoz terveztük, hogy az antitest tesztelésétől közvetlenül gyorsan eljussunk a beadásig. Bizonyos jelek esetében a jelölés hatékonyságának vizsgálata lehet, hogy nem szükséges.

A készlet egyik különösen előnyös alkotórésze a radiolízis hatásaival szembeni stabilitást és a radioaktív jellel ellátott konjugált antitest egy betegbe történő beadását szolgáló készítménypuffer. A készítménypuffer egy olyan gyógyászati lag elfogadható hordozó, mely a jelölt antitest oldószereként és beadási puffereként is szolgál. Noha bármilyen gyógyászati lag elfogadható oldószert alkalmazhatunk a terápiás vagy diagnosztikai antitestek betegbe történő beadására, a találmány szerinti készítménypuffer különösen alkalmas radioaktívan jelölt antitestek beadására.

Például a találmány szerinti készítménypuffer egy radioprotektív anyagot, mint például humán szérumalbumint (HSA) vagy aszkorbátot tartalmaz, mely minimálisra csökkenti az ittriumnak, és kisebb mértékben az indiumnak köszönhető radiolízist. Egyéb radioprotektív anyagok is ismertek a szakterületen, és a találmány szerinti készítménypufferben alkalmazhatók, például szabadgyökkel rendelkező mentesítő anyagok (fenol, szulfitek, glutation, cisztein, gentizinsav, nikotinsav, aszkorbilpalmitát, $\text{HOP}(:\text{O})\text{H}_2$, glicerín, nátrium-formaldehid-szulfoxilát, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ és SO_2 , stb).

Meg kell jegyeznünk, hogy míg a radioprotektív anyagokat az antitest megvédésére a radiolízissel szemben a készítménypufferben általánosan alkalmazzuk, lehetőség van további védelem elérésére úgy, hogy radioprotektív anyagot teszünk a reakciópufferbe is. Ezt általában nem tesszük meg előre, például a HSA-val, mert a fémek jelenléte miatt meggátolhatja a jelölési eljárást. Azonban „megtisztíthatjuk” a HSA-t kelátképző gyantát alkalmazva, melyet szintén a reakciópuffer tartalmazhat. Az aszkorbát vagy más radioprotektív anyag esetén szintén szükség lehet kezelésre a szennyező fémek eltávolítására.

A találmány szerinti készítménypuffer a nem konjugált kelátképzőt feleslegben is tartalmazhatja. A nem konjugált kelátképző-tartalom célja, hogy ez a kelátképző arra szolgáljon, hogy kiürítse a betegből a fehérje által nem kötött radioaktív jelet, és elérje a radioaktív jel kiválasztását, ezáltal csökkentve hogy a beteg csontjai a „csont-kereső” izotópokat, például a ^{90}Y -t felvegyék. Például amikor a készlet antitestét egy DTPA kelátképzőhöz konjugáljuk, a készítménypuffer DTPA vagy más kelátképző feleslegét tartalmazhatja. A készítménypuffert szintén olyan mennyiségben biztosítjuk, hogy a teljes mennyiséget tehesük be a reakciófolyádba. Ahogy fentebb tárgyaltuk, ez az alkalmazást még inkább megkönnyíti, és növeli a reprodukálhatóságot, mivel a pontos mennyiségeket nem kell kimérni és bevenni.

Az egyik előnyös készítménypuffer foszfáttal pufferolt vagy fiziológiás sóoldatot, mely humán szérumalbumint és DTPA-t tartalmaz. A humán szérumalbumin előnyösen 1-25% (tömeg/térfogat), előnyösebben körülbelül 7,5% (tömeg/térfogat) koncentrációjú. A DTPA koncentrációja előnyösen körülbelül 1 mM. A humán szérumal-

bumin alternatívájaként aszkorbinsavat alkalmazhatunk, és ezt jellemzően körülbelül 1-100 mg/ml koncentrációban használjuk. Mindemellett a koncentrációk egy szélesebb tartományban is alkalmazhatók a beteg biztonságának veszélyeztetése nélkül.

A radioaktív jelölő készlet antitestét könnyen megjelölhető egy választott radioizotóppal egy bifunkcionális kelátképzőn keresztül a találmány szerinti eljárásokat alkalmazva. Ebben a tekintetben az egyszerűség érdekében a találmány szerinti készlet egy a radioizotóp oldat pH-jának beállítására szolgáló puffert tartalmazó fiolát és a jelölés és a végső radioaktívan jelölt antitest készítménypufferbe történő újra szuszpendálására szolgáló steril üveg reakciócsövet tartalmaz. Jellemzően egy 10 ml-es reakciócső elegendő, de 5-20 ml tárolására alkalmas csöveket is alkalmazhatunk. A puffer előnyösen egy fémbe szegény nátrium-acetát oldat 10-1000 mM, legelőnyösebben 50 mM koncentrációban.

A találmány szerinti specifikus készlet a 2B8-MX-DTPA MX-DTPA-konjugált antitestet tartalmazza. A 2B8 egy anti-CD20 antitest, melyről kimutatták, hogy hatással van a B-sejt kimerülésre a limfómás betegeknek való beadáskor. Azonban a szakterületen jártasak számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti radioaktív jelölő készlet optimalizálható más anti-CD20 antitestek vagy más olyan antitest radioaktív jelölésére, melyeket DTPA-hoz vagy más polivalens kelátképzőhöz konjugáltunk. Az előnyös találmány szerinti készlet tartalmazhat legalább (i) egy olyan fiolát, mely MX-DTPA-konjugált 2B8 antitestet tartalmaz oldatban vagy liofilizálva (helyreállítás szükséges); és (ii) egy, a radioaktívan jelölt antitest egy betegnek történő beadásra szolgáló

készítménypuffert tartalmazó fiolát. Az előnyben részesített készlet még tartalmazni fog (iii) az izotóp pH-jának beállítására szolgáló puffert, és (iv) egy reakciócsövet. Alternatív lehetőségként és előnyösebben, a puffert a reakciócsőben biztosítjuk, ezáltal kiiktatjuk a puffer mérését és átvitelét, és megnöveli a készlet alkotórészek egyszerűségét, konzisztenciáját és a sterilitását. Azonban más megvalósítási módokat is említhetünk, azaz, melynél a puffert először az izotóp fiolába tesszük be, és a pufferolt izotópot ezután visszük át a reakciócsőbe. Ebben az esetben a reakciócsőben biztosíthatjuk a szükséges antitest mennyiséget. Alternatív lehetőségként az izotóp/puffer fiolája készíthető el olyan nagyra, hogy az megfelelő legyen ahhoz, hogy az antitestkonjugátumot beletegyük, azaz közvetlenül a gyártó fiolájába. Ezzel elkerülhető, hogy reakciócsőre legyen szükség.

Ahogy fentebb leírtuk, egy másik előnyös készlet-elrendezés is a találmány körébe tartozik, melynél a reakciócső maga tartalmazza a konjugált antitest szükséges mennyiségét (azaz 1 ml a ^{111}In -nél illetőleg 1,5 ml a ^{90}Y -nál). Az antitestet egy olyan pufferben adhatjuk, mely biztosítja a specifikus kívánt izotóp szerinti megfelelő radioaktív jelölési pH-t (azaz 3-6-os értékű pH a ^{111}In -nél és 3-6-os értékű pH a ^{90}Y -nál). Különböző puffereket alkalmazhatunk az izotóptól függően (így nátrium-acetátot a ^{90}Y -nál, nátrium-citrátot a ^{111}In -nél). A puffer pH-ja és összetétele szintén változhat a jelölendő ligandum kötésének természetétől függően (azaz a jelölő peptidek pH=3-nál kisebb alkalmazható pH-t is lehetővé tesznek). Lényegében ezután az izotópot közvetlenül a reakciócsőbe vihetjük, ahogy a készítménypuffert. A készlet alkalmazását két átviteli lépésre korlátozva tovább nő

a reprodukálhatóság és az egyszerűség, és tovább csökken a sterilitás elvesztésének kockázata a készlet alkotórészeivel történő munka alatt.

A találmány szerinti radioaktív jelölő készletek továbbá tartalmazhatnak egy radioizotópos fiolát, vagy a radioizotópot egy megfelelő forgalmazótól külön rendelhetjük meg. A találmány szerinti, előnyben részesített radioizotópok a ^{111}In -klorid és a ^{90}Y -klorid HCl-ben, bár az ismertetett eljárásokat nem korlátozzuk ezekre az izotópokra. Egyéb, a leképzési alkalmazásokban használt radionuklidok ismertek a szakterületen, például melyeket a 4 634 586, 5 460 785 és 5766 71 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások írtak le, melyek referenciaként a leírásba épülnek. Az indium-[111] különösen előnyös a B-sejt tumorok leképzésére, és a bétasugárzók, mint például a ^{90}Y különösen hasznosak radioterápiás szerként. Más, erre és más célokra alkalmas radioizotópokat, például alfa-sugárzókat is alkalmazhatunk az antitest konjugációhoz használt kelátképzőtől függően.

A 08/475 813 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben ismertetett kombinált terápiás beadási mód megfelelő hatékonyságát figyelembe véve egy további készlet kiviteli alak a radioaktívan jelölt anti-CD20 antitest előtt vagy után beadandó kiméra antitest, úgy mint a Rituxan® egy külön fioláját is tartalmazza. Amikor a kiméra antitestet a radioaktívan jelölt antitest előtt adjuk be, a HAMA immunválasz, mely általában egy egérféle anti-CD20 antitest beadására adott válaszból fordulhat elő, jelentősen lecsökkenhet, ezáltal megnövelve a radioaktívan megjelölt egérféle antitestek terápiás alkalmazhatóságát. Sőt, amikor kiméra anti-CD20-t alkalmazunk a keringő B-

sejtek kimerítésére, a ^{111}In -jelölt antitestekkel elért diagnosztikai képek sokkal tisztábbak lehetnek.

Az is nyilvánvaló, hogy a diagnosztikai radioaktívan jelölt antitest és egy terápiás radioaktívan jelölt antitest együtt alkalmazható egy kombinált terápiás beadási módban. Ezt tekintve a diagnosztikai antitest a terápiás antitest előtt vagy után alkalmazható, hogy láthatóvá tegyük a tumor méretét a kezelés előtt és után. Ebben az esetben a találmány szerinti készlet a radioaktív jelölő antitestek és az alkalmazandó specifikus radioizotópok optimális pH igényeinek megfelelően specifikusan kisserelt, elkülönített, esetleg szinkódolt pufferfiolákat tartalmazhat. Egy ilyen rendszer biztosítaná, hogy a megfelelő puffert alkalmazzuk mindegyik jelnél, és lehetővé tenné, hogy a klinikai orvos ugyanolyan könnyen végezze el a két antitest jelölését, mintha két készletet vett volna. Egy ilyen készlet hatásában két radioaktív készlet komponenseit egyesíti.

A találmány szerinti radioaktív jelölő készlet komponenseit megfelelő koncentrációban és pH-n biztosítjuk, úgy, hogy a sterilítés könnyen fenntartható legyen az antitest beadása előtt, és kevésbé legyen szükség további pufferekre vagy médiumokra. Mindemellett a szakterületen jártasaknak nyilvánvaló, hogy a reagensek néhány helyben előállítható, sterilizálható és a sterilítésre tesztelhető. Tehát a találmány szerinti készlet több változata elképzelhető a vásárló anyagi lehetőségeitől és kívánságától függően.

A találmány szerinti készletet egy kelátképzővel konjugált antitest radioaktív jelölésére alkalmazhatjuk egy betegbe történő beadásra. A találmány szerint egy ilyen eljárás általában a

következőkből áll: (i) egy kelátképzővel konjugált antitestet egy radioizotópot tartalmazó antitesttel keverünk össze; (ii) az elegyet megfelelő hosszú ideig megfelelő hőmérsékleten inkubáljuk; és (iii) a jelölt antitestet megfelelő koncentrációjára hígítjuk készítménypufferben azért, hogy a radioaktívan jelölt antitestet közvetlenül be lehessen adni egy betegnek további tisztítás nélkül.

Legelőnyösebben az antitest egy anti-CD20 antitest, és az anti-CD20 antitest különösen 2B8 lehet. Az antitestet bármilyen megfelelő kelátképzőhöz konjugálhatjuk, azaz MX-DTPA-hoz, CHX-DTPA-hoz, fenil- vagy benzil-DTPA-hoz, DOTA-hoz, EDTA származékokhoz, stb., melyek közül az MX-DTPA-t részesítjük előnyben. Az antitestkonjugáció elvégzésének módszerei a szakterületen jól ismertek [Kozak et al (1989); Mirzadeh et al. (1990); Brachbiel et al. (1986)].

Úgy találtuk, hogy egy kelátképzőhöz konjugált antitest radioaktív jelölési eljárása jobban működik ott, ahol a radioaktív jelet tartalmazó oldat körülbelül 3,0 és 6,0 közötti pH értékre van beállítva, és előnyösebben körülbelül 4,2-es értékre, mielőtt a kelátképző-konjugált antitesttel összekeverjük. A pH beállítására különösen előnyös a kis-fém tartalmú nátrium-acetát, bár pufferokat is alkalmazhatunk. Előnyösen a nátrium-acetát körülbelül 10-1000 mM közötti koncentrációjú, és előnyösebben 50 mM koncentrációjú.

Amikor a radioizotóp ^{111}In -klorid, az ^{111}In -klorid azon mennyisége, mely egyetlen beadási dózis előállítására alkalmazható, jellemzően körülbelül 5,5 mCi osztva a radioaktivitás koncentrációval a jelölés időpontjában. A betegnek történő beadásra az

¹¹¹In jellemző diagnosztikai dózisa körülbelül 2-10 mCi. A pH beállítására alkalmazott nátrium-acetát mennyisége változik a nátrium-acetát koncentrációtól és az izotóp hordozó oldattól függően, és ezért meglehetősen tág tartományban mozoghat. Amikor a nátrium-acetát koncentrációja 50 mM, a pH beállításához szükséges mennyiség jellemzően az alkalmazott ¹¹¹In-klorid mennyiségének 1,2-szerese, bár nagyobb mennyiségek is használhatók. Tisztában kell lenni azzal, hogy a nátrium-acetát HCl-hez viszonyított aránya számít, és az alkalmazott nátrium-acetát mennyisége a pufferben lévő HCl mennyiségétől és koncentrációjától függően változik. Körülbelül 1 ml, körülbelül 2 mg/ml koncentrációjú kelátképző-konjugált antitestet elegyítünk ezután a radioaktív jel - acetát oldattal, és az elegyet körülbelül 30 percen át, vagy annyi ideig inkubáljuk, mely elegendő az antitest optimális jelölésének eléréséhez. Ez az idő körülbelül 30 másodperctől körülbelül 60 percig terjedhet. Ezután készítménypuffert adunk hozzá olyan mennyiségben, mely a körülbelül 10 ml-es teljes végső térfogat eléréséhez szükséges.

Az antitest jelöléséhez szükséges optimális idő az antitesttől, az adott radioaktív jeltől és az adott alkalmazott konjugátumtól függően változik. A radioaktivitási jelölésre biztosított idő optimalizálásában egy alaptényező a jelölendő reagens kelátképző/antitest aránya. Például a kelátképző/antitest arálynak elég nagynek kell lennie, hogy a beépülés terápiásan hatásos mennyiségét elérjük, azaz 90-95%-ot, a radioizotóptól függően, de túl magas sem lehet, mert az az antitest épségét és immunreaktivitását veszélyezteti. Ehhez egy bizonyos kiegyensúlyozási eljárásra van szükség, mely néhány esetben a konjugált

kelátképző kisebb mennyiségéhez és hosszabb jelölési időhöz vezethet.

Például a 2B8-nál és az MX-DTPA-nál felfedeztük, hogy a jelölés a ^{90}Y -nál öt perc alatt és az ^{111}In -nél harminc perc alatt hajtható végre úgy, hogy a radioaktivitás kívánt mértékű beépülését elérjük, a kelátképző és antitest csupán egy 1:1 molarányánál. Ezért nem volt szükséges a kelátképző-antitest arányt megnövelni, mivel a radioaktivitás egy kívánt mértékét értük el. Sőt nem volt előnyös a konjugált kelátképző mennyiségnek megnövelése, mivel ez hatással lehet az antitest immunreaktivására. Ezek a paraméterek más antitesteknél empirikusan meghatározhatók, hogy készleteket, úgymint a találmányban leírt készleteket megtervezzük.

Amikor a radioaktív izotóp ^{90}Y -klorid, az egyetlen beadási dózis előállítására alkalmazott ^{90}Y -klorid mennyisége jellemzően 10-50 mCi közötti, és előnyösen 45 mCi osztva a jelölés időpontjában lévő radioaktivitás koncentrációval. A pH beállítására használt nátrium-acetát mennyisége a nátrium-acetát koncentrációtól és az izotóp hordozó koncentrációjától függ, és ezért széles tartományban mozoghat. Amikor a nátrium-acetát koncentrációja 50 mM és a ^{90}Y -t 50 mM HCl tartalmazza, a pH beállításához szükséges mennyiség jellemzően 1,2-szerese az alkalmazott ^{90}Y -klorid mennyiségének. Körülbelül 1,5 ml, körülbelül 2 mg/ml koncentrációjú kelátképző-konjugált antitestet elegyítünk ezután a radioaktív jel acetát oldatával, és az elegyet körülbelül 5 percen át, vagy annyi ideig inkubáljuk, mely elegendő az antitest optimális jelölésének eléréséhez. Ez az idő körülbelül 30 másodperctől körülbelül 60 percig terjedhet. Ezután készítménypuffert

adunk hozzá olyan mennyiségben, mely a körülbelül 10 ml-es teljes végső térfogat eléréséhez szükséges.

Előnyösen a találmány szerinti radioaktív jelölési eljárást az itt leírt készletet használva hajtjuk végre. Mindemellett a szakterületen jártasak számára nyilvánvaló kell hogy legyen, hogy az előnyben részesített komponensek és körülmények csupán elfogadható iránymutatók a találmány szerinti eljárás megvalósításához, és bizonyos mértékben megfelelő optimalizálással megváltoztathatók. Azok a körülmények, melyek eltérnek az előnyöstől, de még az eljárás célját megvalósítják, a találmány oltalmi körébe tartozónak tekintendők.

A találmány szerinti radioaktív jelölő készletet együtt biztosíthatjuk azokkal a reagensekkel, melyek alkalmasak arra, hogy a radioaktív jelölés után az antitest kötési affinitását kényelmesen ellenőrizzük. Ebben az esetben a találmány szerinti készletet egy radioaktívan jelölt antitest célsejtjével szembeni kötési százalékanak meghatározására is felhasználhatjuk mielőtt az antitestet egy betegnek beadnánk. Azt is felismertük, hogy az ismertetett kötési mérőeljárás készlet általánosan felhasználható bármely antitest affinitásának vizsgálatára, melynél a tisztított antitest nem áll rendelkezésre. Következésképpen a kötési mérőeljárás komponenseit egy külön készletként árusíthatjuk.

Általánosságban egy kötési mérőeljárás és radioaktív jelölési készlet tartalmaz (i) legalább egy, a készletben lévő antitest által felismert antigént kifejező liofilizált sejtek fioláját; (ii) egy kelátképzővel konjugált antitestet tartalmazó fiolát; (iii) készítménypuffert tartalmazó fiolát, és (iv) haszná-

lati útmutatót az antitest radioaktív jelöléséhez, oly módon, hogy a radioaktívan jelölt antitest közvetlenül beadható legyen egy betegnek, anélkül, hogy szükség lenne ezt követő tisztításra. Ahogy fentebb leírtuk, a radioaktív jelölési készletnél a készlet tartalmazhat egy radioizotóp pH-ját beállító puffert tartalmazó fiolát és egy steril üveg reakciócsövet. Előnyösen a puffer egy kis fémtartalmú nátrium-acetát oldat, körülbelül 10-10000 mM közötti koncentrációban, és az üveg reakciócső legalább 5 ml térfogatú. Az antitest előnyösen egy anti-CD20 antitest, és a kelátképző előnyösen MX-DTPA. Más kelátképzőket is alkalmazhatunk, ahogy korábban leírtuk. Az előnyben részesített konjugált antitest a 2B8-MX-DTPA, bár bármilyen kelátképző-konjugált antitestet megjelölhetünk, és affinitását mérhetjük. A készítménypuffer foszfáttal puffertolt sóoldat, mely egy radioprotektív anyagot és nem konjugált kelátképzőt tartalmaz, ahogy fentebb leírtuk, és a radioizotóp vagy benne van vagy nincs, és előnyösen ez ^{111}In -klorid vagy ^{90}Y -klorid. Más radioizotópokat is alkalmazhatunk a kelátképzőtől függően.

A különbség a fentebb leírt kötési mérőeljárási/radioaktív jelölési készlet és a radioaktív jelölési készlet között az, hogy előbbi antigén-pozitív sejteket tartalmaz, melyek célszubsztrátként szolgálnak az antitest-affinitás tesztelésére. Amikor az antigén CD20, előnyben részesített CD20-pozitív sejtek az SB sejtek (ATCC CLL 120), de bármilyen CD20-pozitív sejtet alkalmazhatunk. A kötési mérőeljárási és radioaktív jelölési készlet továbbá antigén-negatív sejteket is tartalmazhat egy negatív kontrollként történő alkalmazás céljából. Előnyben részesített CD20-negatív sejtek a HSB sejtek (ATCC CLL 120.1), de

bármilyen CD20-negatív sejtet alkalmazhatunk.

Természetesen a kombinált radioaktív jelölési és kötési mérő-eljárási készlet tartalmazhatja még a kiméra anti-CD20 antitest egy fioláját a jelölendő antitest mellett egy kombinált terápiás beadási mód céljából, vagy a diagnosztikai leképzés előtt a perifériás B-sejtek kiűritésére. Ez a különálló antitest előnyösen Rituxan®, de bármilyen antitest lehet, melyről kimutatták, hogy tumorsejt pusztítást hajt végre. Valójában két eltérő típusú antitestet kombinálhatunk egy készletben, azaz két eltérő B-sejt antigén elleni antitestet, azzal a feltétellel, hogy a kombinált terápiás beadási mód ugyanolyan típusú sejtek, azaz a B-sejt limfóma megcélzására szolgál.

Ahogy a készlet komponenseit más antitestek jelölésére alkalmazhatjuk, az antitest affinitás tesztelésére más sejteket is készíthetünk a cél-antigéntől függően. Azonban az anti-CD20 antitesteknél a találmány szerinti kötési mérő-eljárási és radioaktív jelölési készlet különösen alkalmas olyan kereskedelmi készletként, melyben a célsejteket liofilizált formában biztosítjuk. Ez lehetővé teszi az antitest hatékonyság ellenőrzésének egyszerű és rendszeres elvégzését, és nincsenek a szövettenyészet felteleinek fenntartásával járó bonyodalmak és költségek. A liofilizált sejteket általában $0,5$ és 500×10^6 sejt/fiola alikvotokban biztosítjuk a találmány szerint.

Az is lehetséges, hogy bizonyos helyzetekben előnyös, ha már radioaktívan jelölt antitesteket rendelünk meg, mely esetben kötési mérő-eljárási reagensekre van szükség, hogy ellenőrizzük, hogy az antitestek megtartották-e kötési affinitásukat. Ebben az esetben a találmány egy kötési mérő-eljárási készletet is bizto-

sít egy radioaktívan jelölt antitestnek a célsejtjéhez való százalékos kötésének meghatározására. Egy ilyen készlet tartalmaz legalább egy rögzített és/vagy liofilizált antigén-pozitív sejtet tartalmazó fiolát, és adott esetben antigén-negatív sejteket is tartalmaz, ahogy fentebb ismertettük, a kötési mérőeljáráshoz és a radioaktív jelölési készlethez. Másfelől nyilvánvaló hogy egy ilyen készlet változatai egy jelöletlen kontroll antitestet tartalmazhatnak a vásárló antiteste kötési specifitásának igazolására egy kompetitív mérőeljáráson keresztül.

Ismételten, amikor az antigén CD20, a CD20-pozitív sejtek előnyösen SB sejtek (ATCC CCL 120) és a CD20-negatív sejtek előnyösen HSB sejtek (ATCC CCL120.1), melyeket liofilizált formában $0,5-50 \times 10^6$ sejt mennyiségű alikvotok formájában biztosítunk. Ebben az esetben az antitest előnyösen a ^{111}In -nel vagy ^{90}Y -nal jelölt 2B8 MX-DTPA egy konjugátuma.

Tekintettel az itt tárgyalt további készlet kiviteli alakokra, hangsúlyozni kell, hogy a találmány szerinti radioaktív jelölési készlet és eljárás egyik előnye, hogy nincs szükség további tisztítási lépésre, és a radioaktívan jelölt antitest közvetlenül beadható a betegnek, ezáltal értékes időt és megnövekedett antitest-stabilitást nyerve. Ezért kihangsúlyozzuk, hogy bár a klinikai orvos számára kívánatos lehet a radioaktívan jelölt antitest kötési specifitásának és affinitásának tesztelése vagy ellenőrzése a beadást megelőzően, egy ilyen teszt előre elvégezhető az adott radioizotópokkal, ha az antitest stabilitása és a radiolízis gátlása különösen fontos, mint például az ittriumnál. Azzal, hogy olyan készlet kiviteli alakokat biztosítunk, mellyel a kötési affinitás és specifitás teszt-

telhető, semmiképpen sem állítjuk azt, hogy az ilyen tesztek alapvetően szükségesek a találmány szerinti eljárásokban vagy készletekben. Egy ilyen antitest validációs tesztelése csupán egy választható lehetőség a klinikai orvos számára.

Úgy találtuk, a találmány szerinti kötési mérőeljárási készletekhez használt rögzített és liofilizált sejtek előállítására alkalmazott eljárás különösen alkalmas a sejtek kereskedelmi készletekhez történő előállítására. A sejteket a liofilizálás előtt rögzíthetjük, hogy javítsuk a szerkezetet/stabilitást. Nevezetesen, a találmány szerinti sejtek nagy reprodukivitást mutatnak, amikor az antitest kötési mérőeljárásokban alkalmazzuk őket.

A találmány pontosabban liofilizált sejtek előállítási eljárását foglalja magában, mely során (i) centrifugálással sejteket gyűjtünk össze $0,5-2 \times 10^6$ sejt/ml sejtsűrűségben; a sejteket legalább egyszer mossuk egy kiegyensúlyozott sóoldatban, úgymint HBSS-ben; (iii) a pelletizált sejteket egy liofilizációs pufferben, mely egy hordozófehérjét és legalább egy cukortípust tartalmazó kiegyensúlyozott sóoldat, újra szuszpendáljuk; (iv) az újraszuszpendált sejtek egy alikvotját egy mikrofugacsőbe vagy egy üvegfiolába kimérjük, és (v) a sejteket 12-96 órán át, előnyösebben 24-72 órán át körülbelül 30-60 mtorr-nál liofilizáljuk. Az eljárás különösen előnyös olyan liofilizált sejtek előállítására, ahol az említett sejtek SB sejtek (ATCC CCL 120) vagy HSB sejtek (ATCC CCL 120.1), de valószínűen más sejttípusuknál is alkalmazható. Előnyösen puffer hordozófehérjeként marha szérumalbumint tartalmaz 1% (tömeg/térfogat) koncentrációban, és mannitot tartalmaz 10% koncentrációban. Mindemellett lehetsé-

ges, hogy más hordozófehérjék, úgymint a HSA, és más cukrok is alkalmazhatóak. A sejteket körülbelül 1300 rpm-en végett centrifugálással gyűjtjük össze, és HBSS-t (Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldat) adunk hozzá. A sejteket általánosságban 5×10^6 sejt/ml koncentrációban szuszpendáljuk újra. Mindemellett a szakterületen jártasak számára nyilvánvaló, hogy a fenti körülményeket némileg módosíthatjuk a sejt életképességének jelentős veszélyeztetése nélkül. Mindemellett a fenti körülmények további, az eljárásnak a sejtek nagyobb mennyiségét szolgáló optimalizálásával kiegészíthetők, például tangenciális áramlásos diafiltrációval a sejtek liofilizációs pufferben történő kicserélésére.

A találmány szerinti kötési mérőeljárási készletet bármilyen, egy radioaktívan jelölt antitest kötési affinitásának mérésére szolgáló mérőeljárásban alkalmazhatjuk. Egy ilyen mérőeljárás szintén a találmány tárgyát képezi. Egy radioaktív antitestnek a célsejtthez való százalékos kötődését meghatározó kötési mérőeljárás általánosan a következő lépéseket tartalmazza: (i) egy radioaktívan jelölt antitestnek legalább egy alikvotját antigén-pozitív sejtek legalább egy alikvotjával keverünk össze; (ii) a radioaktívan jelzett antitest legalább egy, az (i) lépés alikvotjával azonos alikvotját kontrollként legalább egy, az (i) lépés antigén-pozitív sejtjeinek alikvotjával egyező mennyiségű hígítási pufferrel keverünk össze; (iii) a sejteket centrifugálással pelletizáljuk; (iv) a pelletizált sejtek és a kontroll felülúszójában mérjük a radioaktivitást; és (v) összehasonlítjuk a sejt felülúszóban lévő radioaktivitás mennyiségét és a kontrollban mért radioaktivitás mennyiségét.

Éppen úgy, ahogy a találmány szerinti radioaktív jelölési

készletek adott esetben ^{111}In -kloridot vagy ^{90}Y -kloridot tartalmaznak, a találmány szerinti kötési mérőeljárást jellemzően ^{111}In -nel vagy ^{90}Y -nal jelölt antitestekkel hajtjuk végre. Amikor ^{111}In a jel, a radioaktivitást gamma-számlálót alkalmazva mérjük. Amikor ^{90}Y a jel, a radioaktivitást szcintillációs számlálót alkalmazva mérjük, bár gamma-számláló is használható.

A találmány szerinti kötési mérőeljáráshoz az előnyös antitest egy anti-CD20 antitest, az anti-CD20 antitest előnyösen 2B8, ahol a 2B8 antitestet a találmány szerinti radioaktív jelölési készlettel jelöltünk meg. Azonban bármilyen radioaktívan jelölt antitest tesztelhető, ha biztosítjuk, hogy az adott antigént expresszáló sejtek hozzáférhetőek legyenek. Amikor CD20 az antigén, a mérőeljárás végrehajtására az előnyös sejtek az SB sejtek (ATCC CCL 120), azonban a mérőeljárás bármilyen radioaktívan jelölt antissztel és megfelelő célsejttel is optimalizálható és végrehajtható.

A mérőeljáráshoz alkalmazott hígítási puffernek fenn kell tartania az antitest kötődését, így az egy olyan fiziológiai puffer, mely egy hordozó fehérjét, például BSA-t tartalmazhat, hogy minimálisra csökkentsük a sejtekhez való nem specifikus kötődést. Bár egy hígítási puffert tartalmazó cső szolgál kontrollként, egy további kontrollt is tartalmazhat az assay, melynél antigén-negatív sejteket használunk. Ebben az esetben a kötési mérőeljárás a következő lépéseket is tartalmazza: (i) egy radioaktívan jelölt antitest legalább egy alikvotját antigén-negatív sejtek legalább egy alikvotjával keverjük össze; (ii) centrifugálással pelletizáljuk az antigén-negatív sejteket; (iv) mérjük a radioaktivitást az antigén-negatív pelletizált sejtek

felülszójában; és (v) összehasonlítjuk az antigén-negatív sejt-felülszóban lévő radioaktivitás mennyiséget az antigén-pozitív sejt-felülszó radioaktivitásának mennyiségével és a kontrollal. Ebből a csőből kapott radioaktivitás összehasonlítása a hígítási puffert kontrollal az antigén-pozitív sejtekhez való nem specifikus kötés mennyiségének mérésére szolgál. Amikor CD20 az antigén, és a CD20-pozitív sejtek SB sejtek, a CD20-negatív sejtek előnyösen HSB sejtek (ATCC CCL 120.1).

Ahogy fentebb leírtuk, a találmány szerinti liofilizált sejtek egy egyszerű, hatékony és reprodukálható standardot biztosítanak egy radioaktívan jelölt antitest hatékonyságának tesztelésére. Tehát a találmány szerinti kötési mérőeljárást előnyösen a kötési mérőeljárás készletben lévő liofilizált sejteket alkalmazva hajtjuk végre. Továbbá találmány szerinti radioaktív jelölési készlet a találmány szerinti kötési mérőeljárásokkal kombinálható, ahol az antitestet először egy kelátképző-konjugált antitest jelölési eljárásával jelöljük, ahogy a találmányban ismertetjük. Előnyösen a találmány szerinti kötési mérőeljárást az itt leírt kötési mérőeljárás és radioaktív jelölési készletek egyikét alkalmazva hajtjuk végre.

Lehet néhány eset, ahol az antitest affinitását tesztelni vagy ellenőrizni kell, amikor a radioaktív jelet még nem kapcsoltuk hozzá. Például bizonyos körülmények között, így hibakezelenél, előnyös lehet az antitest kötési affinitásának a tesztelése a radioaktív jelölés előtt. Egy ilyen esetben a találmány magában foglal egy kompetitív kötési mérőeljárást egy teszt-antitest egy célsejthez való affinitásának mérésére, mely a következő lépéseket tartalmazza: (i) egy ruténiummal jelölt kont-

roll antitestet készítünk egy ugyanarra az antigénre specifikus ismert antitesttel; (ii) a tesztantitestet növekvő mennyiségben és a jelöletlen kontroll antitestet növekvő mennyiségben inkubáljuk a rögzített koncentrációjú célsejtekkel és a ruténium-jelölt antitest nyomnyi mennyiségével, ahol a teszt-antitest mindegyik koncentrációnál és a kontroll antitest mindegyik koncentrációnál külön-külön csövekben van; (iii) meghatározzuk a kötés mennyiségét mindegyik reakciócsőben relatív elektrokemilumineszcencia (ECL) alapján ORIGEN készüléket alkalmazva; és (iv) kiszámoljuk a teszt-antitest átlagos affinitási értékét. Az átlagos affinitási értéket az EC50 értékekből és a nyomnyi mennyiségű antitest ismert koncentrációiból számoljuk ki Muller módszerével [J. Immunological Methods 34, 345 (1980)] vagy más megfelelő módszerrel. Megjegyzendő, hogy ezt a mérőeljárást a radioaktívan jelölt antitestek affinitásának tesztelésére is alkalmazhatjuk, vagy bármilyen antitest tesztelésére, ahol az antigént nem tudjuk tisztítani, és antigénforrásként sejtek szükségesek. A találmány rögzített, liofilizált sejtjeit használhatjuk célsejtekként.

Amikor a találmány szerinti kompetitív kötési mérőeljárást hajtunk végre az anti-CD20 antitestek affinitásának tesztelésére, a kontroll antitest 2B8 vagy más nem konjugált anti-CD20 antitest lehet. A kontroll antitest egy kelátképzővel konjugált antitest lehet. A teszt-antitest szintén a kontroll antitest egy kelátképző-konjugátuma lehet. Alternatív lehetőségként a teszt-antitest egy másik anti-CD20 antitest lehet, melynek a 2B8-cal összehasonlított, CD20-szal szembeni kötési affinitása számít. Mindemellett a mérési eljárás más specifitással rendelkező anti-

testek alkalmazására is átalakítható, feltéve hogy a megfelelő célsejt hozzáférhető.

A találmány szerinti kompetitív kötési mérőeljárásban az előnyben részesített célsejtek a CD20-pozitív sejtek, előnyösebbek az SB sejtek (ATCC CCL 120), és még előnyösebbek a találmány szerinti eljárással előállított újrassuszpendált liofilizált SB sejtek. Más módszerek alkalmazásával liofilizált sejtek vagy rögzített sejtek is alkalmazhatóak. A ruténiummal jelölt antitestet jellemzően egy olyan eljárással állítjuk elő, mely során a kontroll antitestet a ruténium(II)-tris-bipiridin kelátképző N-hidroxi-szukcinimid észterével (TAG-NHS) inkubáljuk, bár az antitestek jelölésének más ismert eljárása is elképzelhető. A jelöléshez a kontroll antitestet és a TAG-NHS-t előnyösen körülbelül 1:15 mólarányban inkubáljuk.

A találmánynak ezek és más aspektusai a következő ábrákra, példákra és a találmány leírására hivatkozva világosan érthetővé válnak.

Az ábrák rövid ismertetése

1. ábra: A natív 2B8 immunreaktivitását hasonlítottuk össze a kereskedelemben beszerezhető B1 (Coulter) és a Leu 16 (Becton Dickinson) anti-CD20 antitesttel egy radioimmun mérőeljárásban közvetlen kompetícióval ^{125}I -vel jelölt B1-t alkalmazva. Antigén-pozitív SB sejteket (100 000) adtunk V&P szűrőlemezek mindegyik mérőhelyére; 10 ng radioaktívan jelölt B1-t összekevertünk a jelöletlen kompetitor különböző koncentrációival, és az elegyet adtuk a sejtekhez. Az antitesteket a sejtekkel inkubáltuk egy órán át környezeti hőmérsékleten; a meghatározásokat három példányban hajtottuk végre. Ezt követően a mérőhelyeket mostuk,

szárítottuk és a szűrőre kapcsolódott radioaktivitást meghatároztuk. A bemutatott adatokat a háttér aktivitáshoz korrigáltuk, és a meghatározások három példányának átlagát vettük.

2. ábra: A nem konjugált 2B8-t növekvő mennyiségben analizáltuk a humán B-sejtekhez (SB) való kötődésre FACS analízist alkalmazva. Összehasonlításokat végeztünk egy kereskedelembe hozzáférhető anti-CD20 monoklonális antitesttel (B1) és két irreleváns izotípusú antitesttel. Egér anti-egér IgG-FITC F(ab)'₂-t alkalmaztunk második reagensként. Az eredmények azt mutatják, hogy a 2B8 specifikus a CD20 antigénre, és nagyobb kötődést mutat, mint a B1.

3. ábra: Humán B-sejteket (SB) inkubáltunk növekvő mennyiségű ¹²⁵I-vel jelölt 2B8-cal. Három példányban mintákat inkubáltunk egy órán át, és a sejtkötött radioaktivitást meghatároztuk, miután a sejtek összegyűjtése céljából szűrtük a mintát. A Scatchard analízis lehetővé tette egy $4,3 \times 10^{-9}$ M-os látszólagos affinitási konstans kiszámítását.

4. ábra: A natív 2B8, 2B8-MX-DTPA és B1 immunreaktivitása. A B1 antitestet radioaktívan jelöltük, ahogy azt a „Módszerek” részben ismertetjük. Tíz nanogramm radioaktívan jelölt B1-t összekevertünk a kompetitor növekvő koncentrációival, és az elegyet 100 000 antigén-pozitív SB sejtet tartalmazó V & P szűrőlemezek mérőhelyeihez adtuk; mindegyik meghatározást három példányban hajtottuk végre. Egyórás környezeti hőmérsékleten végzett inkubálás után a sejteket erőteljesen mostuk. Ezt követően a szűrőket szárítottuk és a hozzájuk kapcsolódott radioaktivitást gamma-számlálóval határoztuk meg. Mindegyik értéket a háttérhez korrigáltuk. Az értékek a három meghatározás átlagát mu-

tatják.

5. ábra: A 2B8 antitestet 10 mg/ml végső koncentrációra formuláltuk normál sóoldatban vagy 10 mM glicin-HCl-t tartalmazó, 6,8 pH értékű normál sóoldatban. A minták két példányát csavarkupakos fiolákba helyeztük, a fiolákat nitrogénnel fűvattuk át, és lezártuk. A mintákat ezután 4°C-on vagy 30°C-on inkubáltuk 12 héten át; a minták immunreaktivitását hetenként értékeltük ki. Nem figyeltük meg az immunreaktivitás elvesztését egyik 2B8 mintánál sem a teljes 12 hetes vizsgálat során. Az 1. héten (5A. ábra), a 6. héten (5B. ábra) és a 12. héten (5C. ábra) mért immunreaktivitást ábrázoljuk.

6. ábra: Kötési mérőeljárás a ^{111}In -nel jelölt 2B8-MX-DTPA immunreaktivitásának meghatározására, melyet 50 mg/ml humán szérumalbumint tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) inkubáltunk (48 óras inkubálás). 6A. ábra: A radioaktívan jelölt antitest konstans mennyiségét (5ng/ml) inkubáltuk az SB sejtek növekvő mennyiségével (20×10^6 sejt/ml). A sejtekhez kötött radioaktivitás mennyiségét (cpm) a hozzáadott sejtsuszpenzió térfogatának függvényében ábrázoltuk. 6B. ábra: A kötött radioaktivitás feletti teljes, alkalmazott radioaktivitást ábrázoltuk. A lineáris extrapoláció lehetővé tette az y-metszet kiszámítását (0,997). Az y-metszet $\times 100$ reciproka egy 100 %-os immunreaktivitási értéket eredményezett nagyon nagy antigénfeleslegnél.

7. ábra: ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott autoradiogramok, mely mintát 4°C-on 75 mg/ml humán szérumalbumint és 1 ml DTPA-t tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) inkubáltunk. A megjelölt időpontokban a mintákat 1-20%-os Tris-glicin géleken elektroferetizáltuk nem redukáló körülményeket, és denaturáló

körülményeket (SDS) alkalmazva. A mintákat 5 μ l-nél (1., 2. sáv) és 10 μ l-nél (5., 6. sáv) vittük fel. A géleket röntgenfilmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percig környezeti hőmérsékleten, és lefényképeztük.

8. ábra: ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott 0. időpontban vett autoradiogrammok denzitometriás letapogatása, mely mintát 4°C-on 75 mg/ml humán szérumalbumint és 1 ml DTPA-t tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) inkubáltunk. A mintát 4-20%-os Tris-glicin gélen elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μ l-ben, 10 μ l-ben és 20 μ l-ben vittük fel a mérőhelyek két példányában. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és a sávok egyikét egy denzitométert használva szkenneltük. A radioaktívan jelölt konjugátum csúcs (2. számú) relatív területe 96,2 % volt.

9. ábra: ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott 48 órás autoradiogrammok denzitometriás letapogatása, mely mintát 4°C-on 75 mg/ml humán szérumalbumint és 1 ml DTPA-t tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) inkubáltunk. A mintát 4-20%-os Tris-glicin gélen elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μ l-ben, 10 μ l-ben és 20 μ l-ben vittük fel a mérőhelyek két példányában. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és a sávok egyikét egy denzitométert használva szkenneltük. A radioaktívan jelölt konjugátum csúcs (2. számú) relatív területe 95,5 % volt.

10. ábra: ^{111}In -nel jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott autoradiogrammok, mely mintát 4°C-on 50 mg/ml humán szérumalbumint tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) inkubáltunk. A mintát 4-

20%-os Tris-glicin gélen elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 µl-ben (1., 2. sáv), 10 µl-ben (3., 4. sáv) és 20 µl-ben (5. és 6. sáv) vittük fel a mérőhelyek két példányában. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és lefényképeztük. (Megjegyzés: 48 órás autoradiogrammot kaptunk intenzifikáló letapogatásokat alkalmazva, mely egy intenzívebb jelet eredményez összehasonlítva a 0. időpontban felvett autoradiogramm-mal.)

11. ábra: ^{111}In -nel jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott 0. időpontú autoradiogrammok denzitometriás letapogatása, mely mintát 4°C-on PBS-ben (pH=7,4) inkubáltunk, ami 50 mg/ml humán szérumalbumint tartalmazott. A mintát 4-20%-os Tris-glicin gélen elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 µl-ben, 10 µl-ben és 20 µl-ben vittük fel a mérőhelyek két példányában. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és a sávok egyikét egy denzitométert használva szkenneltük. A radioaktívan jelölt konjugátum csúcs (3. számú) relatív területe 95,9 % volt.

12. ábra: ^{111}In -nel jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott 0. időpontú autoradiogrammok denzitometriás letapogatása, mely mintát 4 °C-on PBS-ben (pH=7,4) inkubáltunk, ami 50 mg/ml humán szérumalbumint tartalmazott. A mintát 4-20%-os Tris-glicin gélen elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 µl-ben, 10 µl-ben és 20 µl-ben vittük fel a mérőhelyek két példányában. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és a sávok egyikét egy denzitométert használva szkenneltük. A radioaktívan jelölt konjugátum relatív területe 96,2 % volt (2., 3. és 4. számú csú-

csak egyesített területei).

13. ábra: Humán szérumban 37°C-on inkubált ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE-ből kapott autoradiogrammok. A megjelölt időpontokban a mintákat 4-20% Tris-glicin géleken elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben (1., 2. sáv), 10 μl -ben (3., 4. sáv) és 20 μl -ben (5. és 6. sáv) vittük fel a mérőhelyek két példányában. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és lefényképeztük.

14. ábra: Humán szérumban 37°C-on inkubált ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE-ből kapott 0. időpillanatban felvett autoradiogramm denzitometriás letapogatása. A mintákat 4-20% Tris-glicin géleken elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben, 10 μl -ben és 20 μl -ben vittük fel a mérőhelyek két példányában. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és a sávok egyikét denzitométert alkalmazva szkenneltük. A radioaktívan jelölt konjugátum csúcs (2. számú) relatív területe 97,9 % volt.

15. ábra: Humán szérumban 37°C-on inkubált ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott 98 órás autoradiogramm denzitometriás letapogatása. A mintát 4-20%-os Tris-glicin gélben elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben, 10 μl -ben és 20 μl -ben vittük fel a mérőhelyek két példányában. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és a sávok egyikét egy denzitométert alkalmazva szkenneltük. A radioaktív konjugátum csúcs (2. számú) relatív területe 94,7% volt.

16. ábra: Humán szérumban 37°C -on inkubált ^{111}In -nel jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE-ből kapott autoradiogrammok. A megjelölt időpontokban a mintákat 4-20% Tris-glicin géleken elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben (1., 2. sáv), 10 μl -ben (3., 4. sáv) és 20 μl -ben (5. és 6. sáv) vittük fel. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és lefényképeztük.

17. ábra: Humán szérumban 37°C -on inkubált ^{111}In -nel jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE-ből kapott 0. időpillanatban felvett autoradiogramm denzitometriás letapogatása. A mintákat 4-20% Tris-glicin géleken elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben, 10 μl -ben és 20 μl -ben vittük fel a mérőhelyek két példányában. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 16-20 órán át környezeti hőmérsékleten, és a sávok egyikét denzitométert alkalmazva szkenneltük. A radioaktívan jelölt konjugátum csúcs (3. számú) relatív területe 95,3 % volt.

18. ábra: Humán szérumban 37°C -on inkubált ^{111}In -nel jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott 98 órás autoradiogrammok denzitometriás letapogatása. A mintát 4-20%-os Tris-glicin gélen elektroforetizáltuk nem redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben, 10 μl -ben és 20 μl -ben vittük fel a mérőhelyek két példányában. A gélrt röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 16-20 órán át környezeti hőmérsékleten, és a sávok egyikét egy denzitométert alkalmazva szkenneltük. A radioaktív konjugátum csúcs (3. számú) relatív területe 94,0% volt.

19. ábra: Jávai makákó majmoknak intravénásan minden 48. órá-

ban injekciót adtunk, összesen hét injekciót; a beadott mennyiségeket bemutatjuk. A keringő T- és B-sejtek mennyiségét anti-CD2-t (T-sejt), anti-Mo-IgG-t (2B8), anti-CD20-t (Leu 16), és anti-humán-IgG-t (B-sejt) alkalmazó FACS analízissel határoztuk meg. Semmilyen hatást nem figyeltünk meg a keringő T-sejtek mértékére. (a V csoport állatai egyetlen dózist kaptak).

20. ábra: A keringő B-sejt mennyiségének megállapítása olyan állatokban, melyek 2B8-t kaptak, amit a 19. ábra rövid leírásában ismertetett fluoreszcenciásan jelölt antitesteket alkalmazó FACS analízis követett. A III. és IV. csoport állatait nem követjük nyomon, mivel ezeket a 13. napon fájdalommentesen megöltük.

21. ábra: Jávai makákó majmoknak intravénásan ^{89}Y -2B8-MX-DTPA injekciót adtunk be, melyet klinikai minőségű 2B8-MX-DTPA-ból készítettünk. Az állatoknak minden 48. órában a fentebb bemutatott dózisokat adtuk be, összesen hét dózist. A 0., 2., 7., 10., 14. napon a májoktól vért vettünk, és kiértékeltek szérumkémiára, hematológiára és a keringő B-sejt mennyiségére (a 10. napi szérumokat a B-sejt tartalomra nem elemeztük ki).

22. ábra: A 2B8 egérféle anti-CD20 antitest kitisztulását a jávai makákó májokból ELISA-val határoztuk meg, miután egyetlen 10 mg/kg dózist tartalmazó injekciót adtunk be nekik. Ahogy az A mezőben bemutatjuk, az antitest hozzávetőleg a 4,5. nap fejeződött ki βtg -del. A 2B8 antitest és az MX-DTPA konjugátumának kitisztulását a BALB/c egerek keringéséből a B mezőben mutatjuk be. Az egereknek intravénásan 25 μg natív vagy konjugált 2B8-t adtunk be injekcióban, és vérmintákat vettünk különböző időpontokban az injekciót követően 264 órán át; a szérumot ezután ki-

elemeztük befogószerként SB sejteket alkalmazó enzim-immuncassayvel. A natív és a konjugált antitestek is 8,75 napos kitisztulási értékeket mutattak.

23. ábra: 20 BALB/c egér mindegyikének 50 mg/ml HSA-t tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) készített, 1,1 μ Ci radioaktívan jelölt konjugátumot (100 μ l) adtunk be injekcióban. Az öt egérből álló csoportokat az 1., 24., 48. és 72. órában fájdalommentesen megöltük, majd kivérettük, és különböző szöveteket preparáltunk, és a kapcsolt radioaktivitásra kielemeztük.

24. ábra: 20 BALB/c egér mindegyikének 75 mg/ml humán szérumalbumint tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) készített, hozzávetőleg 1,0 μ Ci radioaktívan jelölt konjugátumot (100 μ l) adtunk be intravénás injekcióban. Az öt egérből álló csoportokat az 1., 24., 48. és 72. órában fájdalommentesen megöltük, és a vérüket és különböző szöveteiket kipreparáltunk, és a kapcsolt radioaktivitásra kielemeztük.

25. ábra: Ramos B-sejt tumorokat hordozó timusz nélküli egereknek 24 μ Ci 111 In-2B8-MX-DTPA-t adtunk be injekcióban, és a három egérből álló csoportokat fájdalommentesen megöltük a 0., 24., 48. és 72. órában. A szövetpreparálás és a kapcsolt radioaktivitás meghatározását követően meghatároztuk a százalékos beadott dózis per gramm szövet értéket és ábráztuk, ahogy bemutatjuk.

26. ábra: Kötési mérőeljárás 50-75 mg/ml humán szérumalbumint tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) inkubált (48 órán át) „mix-&-shoot” 90 Y-jelölt 2B8-MX-DTPA immunreaktivitásának meghatározására. A mező: A 90 Y-jelölt antitest egy állandó mennyiségét (hozzávetőleg 1 ng/ml-t) inkubáltunk az SB sejtek növekvő mennyiségével. A

sejtekhez kötött radioaktivitás mennyiségét (cpm) ábrázoltuk a sejtkoncentráció függvényében. B mező: A teljes alkalmazott ^{90}Y radioaktivitás per kötött radioaktivitást (AT/B) ábrázoltuk. A lineáris extrapolálás lehetővé tette az y-metszet kiszámolását (1,139). Az y-metszet reciproka $\times 100$ egy 87,9 %-os immunreaktivitási értéket eredményezett nagyon nagy antigén feleslegnél. Nem figyeltünk meg kötést a CD20-negatív sejtekkel (HSB).

27. ábra: 75 mg/ml humán szérumalbumint és 1 mM DTPA-t tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) 4°C-on inkubált, ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott autoradiogrammok. A megjelölt időpontokban a mintákat 4-20 % Tris-glicin géleken elektroforetizáltuk nem-redukáló körülményeket, denaturáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben (1., 2. sáv), 10 μl -ben (5., 6. sáv) vittük fel. A géleket röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és lefényképeztük.

28. ábra: 75 mg/ml humán szérumalbumint és 1 mM DTPA-t tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) 4°C-on inkubált, ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott 0. időpontban felvett autoradiogrammok denzitometriás letapogatása. A mintákat 4-20 % Tris-glicin géleken elektroforetizáltuk nem-redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben, 10 μl -ben és 20 μl -ben vittük fel. A géleket röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környezeti hőmérsékleten, és a sávok egyikét egy denzitométert alkalmazva szkenneltük. A radioaktívan jelölt konjugátum relatív területe (2. számú) 96,1 % volt.

29. ábra: 75 mg/ml humán szérumalbumint és 1 mM DTPA-t tar-

talmazó PBS-ben (pH=7,4) 4°C-on inkubált, ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott 48. órában felvett autoradiogrammok denzitometriás letapogatása. A mintákat 4-20 % Tris-glicin géleken elektroforetizáltuk nem-redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben, 10 μl -ben és 20 μl -ben vittük fel. A géleket röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környeztetési hőmérsékleten, és a sávok egyikét egy denzitométert alkalmazva szkenneltük. A radioaktívan jelölt konjugátum relatív területe (2. számú) 94,1 % volt.

30. ábra: Humán szérumalbuminban 37°C-on inkubált „mix-&-shoot” ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott autoradiogrammok. A megjelölt időpontokban a mintákat 4-20 % Tris-glicin géleken elektroforetizáltuk nem-redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben (1., 2. sáv), 10 μl -ben (3., 4. sáv) és 20 μl -ben (5., 6. sáv) vittük fel. A géleket röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környeztetési hőmérsékleten, és lefényképeztük.

31. ábra: Humán szérumalbuminban 37°C-on inkubált „mix-&-shoot” ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott 0. időpontban felvett autoradiogrammok denzitometriás letapogatása. A mintákat 4-20% Tris-glicin géleken elektroforetizáltuk nem-redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben, 10 μl -ben és 20 μl -ben vittük fel a mérőhelyek két példányában. A géleket röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környeztetési hőmérsékleten, és a sávok egyikét egy denzitométert alkalmazva szkenneltük. A radioaktívan jelölt konjugátum relatív területe (2. számú) 89,1 % volt.

32. ábra: Humán szérumalbuminban 37°C-on inkubált „mix-&-

shoot" ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA SDS-PAGE analíziséből kapott 72. órában felvett autoradiogrammok denzitometriás letapogatása. A mintákat 4-20% Tris-glicin géleken elektroforetizáltuk nem-redukáló körülményeket alkalmazva. A mintákat 5 μl -ben, 10 μl -ben és 20 μl -ben vittük fel a mérőhelyek két példányában. A géleket röntgen filmre exponáltuk hozzávetőleg 15 percen át környeztetési hőmérsékleten, és a sávok egyikét egy denzitométert alkalmazva szkenneltük. A radioaktívan jelölt konjugátum relatív területe (2. számú) 88,8 % volt.

33. ábra: 20 BALB/c egér mindegyikének 75 mg/ml humán szérum-albumint és 1 mM DTPA-t tartalmazó 1 X PBS-ben (pH=7,4) készített, 5 μCi ^{90}Y -nal radioaktívan jelölt konjugátumot (100 μl) adtunk be intravénás injekcióban. Az öt egérből álló csoportokat az 1., 24., 48. és 72. órában fájdalommentesen megöltük, és a vérüket és különböző szöveteiket kipreparáltunk, és a kapcsolt radioaktivitásra kielemeztük.

34. ábra: CHO-eredetű jelölt 2B8 antitesteket növekvő mennyiségben frissen begyűjtött, rögzített koncentrációjú CD20-pozitív B-sejtekkel (SB) vagy CD20-negatív T-sejtekkel (HSB) inkubáltuk. A sejtekhez való antitest kötést kecske anti-egér IgG-FITC F(ab)'₂-t alkalmazó FACS analízissel mennyiségileg meghatároztuk az itt ismertetett módon. Összehasonlítottuk egy irreleváns izotípusú antitesttel (S004). Csak a CHO-eredetű 2B8 antitest mutatott észlelhető kötődést a CD20-pozitív SB sejtekhez.

35. ábra: A CHO-eredetű 2B8 immunreaktivitását hasonlítottuk össze egy hibridóma sejtvonalban termelt 2B8-49 szülő antitesttel egy ORIGEN assay-ben végzett közvetlen kompetícióval. Az antitestet növekvő mennyiségben inkubáltuk a rögzített koncentrá-

ciójú CD20-pozitív B-sejtekkel és ruténiummal jelölt CHO 2B8 nyomnyi mennyiségével. Miután három órán át környezeti hőmérsékleten inkubáltuk, a kötést relatív elektrokemilumineszcenciában kifejezve (ECL) ORIGIN berendezést alkalmazva határoztuk meg az „Anyagok és Módszerek” fejezetben leírt módon. Az értékek két meghatározás átlagát képviselik. A CHO 2B8 és 2B8-49 átlagos affinitási állandóját kiszámítva az $1,3 \times 10^{-10}$ illetve $2,5 \times 10^{-10}$ M volt. Egy irreleváns izotípusú antitestet (SOO4) alkalmaztunk az összehasonlításához.

36. ábra: A CHO-eredetű 2B8-ból készített 2B8-MX-DTPA konjugátumok kötését összehasonlítottuk a nem konjugált antitesttel közvetlen kompetícióval egy ORIGIN assay-ben. Konjugátumokat készítettünk oly módon, hogy a 2B8-t MX-DTPA-val inkubáltuk 8, 17 és 24 órán át mielőtt a nem reagáló kelátot eltávolítottuk. A kötési méréshez az antitesteket a CD20-pozitív B-sejtek (SB) egy rögzített koncentrációjával és ruténiummal jelölt CHO 2B8 nyomnyi mennyiségével inkubáltuk. Miután három órán át környezeti hőmérsékleten inkubáltuk, a kötést relatív elektrokemilumineszcenciaként (ECL) kifejezve határoztuk meg ORIGIN készüléket alkalmazva, ahogy az „Anyagok és Módszerek” részben leírtuk. Az értékek két meghatározás átlagát képviselik. A konjugátum készítmények hasonló kötődést mutatnak mint a nem konjugált 2B8 antitest.

37. ábra: A) SB sejteket mostunk, és 90×10^6 sejt/ml koncentrációig újra szuszpendáltuk hígítási pufferrel (1% (tömeg/térfogat) marha szérumalbumint tartalmazó 1 X PBS, pH=7,4). A sejteket növekvő koncentrációban 3 órán át 7,5 ng/ml In2B8-cal inkubáltuk 2B8-MX-DTPA 0165A jelű tételét alkalmazva. B) A sejt-

koncentráció kétszeresen inverz grafikinja a kötött radioaktivitás/teljes radioaktivitás (B/TA) függvényében. Az immunreaktivitást $1/y$ -metszet $\times 100$ képlettel számoltuk ki. Az immunreaktivitás 80,6% és a korrelációs koefficiens (R) értéke 0,981 volt.

38. ábra: A) SB sejteket mostunk, és 90×10^5 sejt/ml koncentrációban hígítási pufferrel (1% (tömeg/térfogat) marha szérumalbumint tartalmazó 1 X PBS, pH=7,4) újra szuszpendáltuk. A sejteket növekvő koncentrációban 3 órán át 2 ng/ml Y2B8-cal inkubáltuk, melyet 2B8-MX-DTPA 0165A számú tételét alkalmazva készítettünk el. B) A sejtkoncentráció kétszeresen inverz grafikinja a kötött radioaktivitás/teljes radioaktivitás (B/TA) függvényében. Az immunreaktivitást $1/y$ -metszet $\times 100$ képlettel számoltuk ki. Az immunreaktivitás 72,2 % és a korrelációs koefficiens (R) értéke 0,999 volt.

A találmány részletes ismertetése

Meghatározások

Ha másképpen nem határozzuk meg, az összes leírásban használt műszaki és tudományos kifejezés ugyanolyan jelentéssel bír, ahogy egy azon a szakterületen szokásosan jártas személy értené, mely szakterületbe a találmány tartozik. Bár akármilyen, az itt leírtakhoz hasonló vagy azzal egyenértékű eljárás és anyag alkalmazható a találmány megvalósításában vagy tesztelésénél, az előnyös eljárásokat és anyagokat ismertetjük. A találmány céljából a következő kifejezéseket határozzuk meg a következőkben:

Kis fémtartalmú - olyan reagensekre vonatkozik, melyeket kezeltünk, hogy lecsökkentsük a fémszennyeződést egy olyan szintre, mely nincs hatással a radioaktivitás beépülésére.

Antigén-pozitív - olyan antigént fejez ki, amit az adott találmány szerinti antitest felismer oly módon, hogy az antitest képes a kötésére.

% radioaktív beépülés - egy radioaktív jelölési reakcióból származó antitesthez konjugálódott radioaktív jel mennyisége, a reakcióelegyhez kezdetben adott radioaktív jel teljes mennyiségéhez viszonyítva.

% kötés - egy mintából származó antitest azon mennyiségére vonatkozik, mely a cél-antigénhez kötődik specifikusan vagy nem specifikusan.

% immunreaktivitás vagy kötési specifitás - egy mintából származó antitest azon mennyiségére vonatkozik, mely specifikusan kötődik a cél-antigénhez.

diagnosztikai antitest - egy olyan antitestre vonatkozik, mely egy radioaktív jelhez van konjugálva, mint például ^{111}I -hez, mely a tumorok és antigén-pozitív sejtek diagnosztikai leképezését képes végrehajtani.

Terápiás antitest - egy alfa- vagy bétasugárzó radioaktív jelhez (mint például ^{90}Y -hoz) konjugált antitestre vonatkozik, mely képes sejtpusztulást okozni, amikor a megcélzott antigénhez kötődik.

A találmány ismertetése

2B8 egérféle monoklonális anti-CD20 antitest, konjugált 2B8,

^{111}In - és ^{90}Y -jelölt 2B8 preklinikai kifejlesztése

I. Anyagok és módszerek a 2B8 egérféle monoklonális anti-CD20 antitest, 2B8-MX-DTPA, ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA és HPLC-vel tisztított ^{90}Y -MX-DTPA kialakítására

A. Anyagok

1. Sejtek

Az SB és HSB humán sejtvonalakat az American Type Culture Collection-tól szereztük be, és 10% magzati borjúsérumot tartalmazó RPMI-1640-ben tenyésztettük. A CD20-pozitív SB sejtvonal egy akut limfoblaszt leukémiás beteg perifériás vér „buffy coat”-jából származó B-limfoblasztoid sejtvonal (1). A HSB anti-gén-negatív sejtvonal egy újszülött szíriai hörcsögökben indukált tumorokból kifejlesztett T-limfoblasztoid sejtvonal (2). Az egérféle SP2/2 mielóma sejtvonalat hasonló módon 10% magzati borjúsérumot tartalmazó RPMI-1640-ben tartottuk fenn.

2. Antitestek

A B1 anti-CD20 antitesteket a Coulter Immunology-tól és a Leu 16 anti-CD20 antitesteket a Becton/Dickinsontól vásároltuk. A ^{125}I -jelölt kecske anti-egér IgG-t és a kecske anti-humán IgG antitesteket az ICN-től szereztük be. A kecske F(ab')_2 anti-egér IgG-t a Cappel-től szereztük be.

3. Reagensek

A Freund komplett és inkomplett adjuvánst a Sigma Chemical Company-tól vásároltuk. A polietilén-glikol, HAT-koncentrátum és a HT koncentrátum mindegyikét a Boehringer Mannheim-tól szereztük be. Az indium-[111]-kloridot és a ^{90}Y -kloridot az Amersham-tól vagy a NEN Dupont-tól szereztük be. Az ittrium-[89]-kloridot az Aldrich Chemical Company-tól vásároltuk. Minden más reagenst szokásos forrásokból szereztünk be.

A konjugációs és radioaktív jelölési eljárásokhoz használt reagenseket feldolgoztuk, hogy eltávolítsuk a szennyező nehézfém-ionokat, melyek kompetícióba lépnek a radioizotópokkal a ra-

radioaktív jelzés alatt. A reagenseket jellemzően úgy dolgozzuk fel, hogy az oldatokat egy Chelex 100 ioncserélő gyantán (BioRad Industries) visszük keresztül vagy Chelex 100 hozzáadásával adagonként feldolgozzuk egy preparált oldattá. Milli-Q-val tisztított vagy Water for Irrigation (WFIr) kis fémtartalmú vizet alkalmaztunk az összes készítménynél és oldatnál. A fémmentes oldatokat sterilre szűrtük, és steril műanyag tartályokban gyűjtöttük össze.

B. Eljárások

1. 2B8 hibridóma felülűszók előállítása és szkrinelése RIA-val

Tíz BALB/c egeret 20 millió, Freund féle komplett adjuvánst tartalmazó PBS-be szuszpendált SB sejttel immunizáltunk. A sejteket szubkután és intraperitoneálisan is, az állat több helyére beoltottuk. Egy kéthetes várakozási időszak után az egereket másodszor is beoltottuk Freund féle inkomplett adjuvánsban emulgeált SB sejtekkel. Az immunizálás után emlékeztető oltásokat adtunk be hetenkénti ütemezésben PBS-ben szuszpendált SB sejtekkel. Az egereket 6 hetes - 4 hónapos időszakon át immunizáltuk.

Időpontonként két állatot cervikális diszlokációval fájdalommentesen megöltünk, és a lépeket eltávolítottuk az SP2/0 egér mielómával történő fúzió céljából. Az állatokat azon képességük alapján választottuk ki, hogy a poszt-immunszérum hatásosan gátolta-e a radioaktívan jelölt Coulter B1 anti-CD20 antitest kötődését az SB sejtekhez. Három nappal mindegyik fúzió előtt a kiválasztott állatoknak egy utolsó intravénás (farokvénába történő) injekciót adtunk, mely 20 millió SB sejtet tartalmazott PBS-ben. A fájdalommentes megölés után a lépeket fertőzésmentes

körülmények között kivettük, és a lépsejteket SP2/0 sejtekkel fuzionáltuk 5:1 arányban (lépsejtek:SP2/0). A fuzionált sejteket szövettényesztő tápközegben mostuk, és HAT szelekciós tápközeget tartalmazó 96 mérőhelyes lemezekre osztottuk szét. A hibridómákat 10-14 nap múlva inhibíciós radioimmunassay-vel szűrtük Coulter B1 antitestet alkalmazva.

Az anti-CD20 antitestet szekretáló hibridek szűrését ismert radioimmunassay módszerekkel hajtottuk végre. Röviden, Coulter B1 anti-CD20 antitestet tisztítottunk Protein A affinitáskromatográfiával. Ötven mikrogramm tisztított antitestet kapcsoltunk ^{125}I -hez rövid oxidációval Iodobeads (Pierce Chemical Co.) jelenlétében a gyártó eljárását követve. A radioaktívan jelölt antitestet szintetikus ámbra gyantán sómentesítettük, és hígítási pufferben tároltuk (PBS, pH=7,4; mely tartalmaz 0,2% zselatint és 0,02% nátrium-azidot és 1,0% BSA-t). A radioaktív jel 10 nanogrammját helyeztük a korábban blokkolt szűrő assay lemez mindegyik mérőhelyére (blokkoló puffer: 10% FBS-t tartalmazó hígítási puffer) a teszt-mérőhelyekről származó 50 μl hibridóma feloldószók 50 μl -ével és 50 μl hígítási pufferben szuszpendált 100 000 SB sejttel együtt. A szuszpenziót egy órán át környezeti hőmérsékleten inkubáltuk. A lemezeket mosópufferrel (PBS, pH=7,4, mely 0,2% zselatint és 0,02% nátrium-azidot tartalmazott) erőteljesen mostuk egy V&P Scientific vákuum-elosztón, és a befogott SB sejteket tartalmazó filteraljakat egy gammaszámlálóba tettük át. A csak HAT tápközeget és jelölt B1 antitestet tartalmazó mérőhelyeket használtuk háttérkontrollként és az azonos, SB sejteket tartalmazó mérőhelyeket alkalmaztuk pozitív kontrollként. A radioaktívan jelölt gátlási

kontrollok a radioaktívan jelölt B1-és a jelöletlen B1 különböző, 2 mg-tól 2 ng-ig terjedő mennyiségét tartalmazták.

2. Áramlásos citometriás vizsgálatok

a. Sejtvonalak

Előzetes áramlásos citometriás vizsgálatokat hajtottunk végre 2B8 hibridóma tenyészetekből származó felülúszókkal. A hibridóma felülúszó száz mikroliterét SB sejtekkel inkubáltuk egy órán át környezeti hőmérsékleten; egy második, 1/400-as hígításban használt antitestet (kecske F(ab')₂ anti-egér IgG; Cappel) adtunk ezután hozzá, és az inkubálást 1 órán át sötétben folytattuk. A sejteket ötször mostuk. A kontrollok a következőkből álltak: olyan sejtek (első és második antitestet nem), melyekből csak az autofluoreszcenciát határoztuk meg, csak második antitest és sejtek a nem specifikus kötés meghatározására, és kereskedelem-ben hozzáférhető fluoreszcein izotiocianát-konjugált B1 (B1-FITC) egy CD20 populációs kontrollként.

Néhány kísérletben a fluoreszceint tisztított 2B8 antitesthez kapcsoltuk az aminocsoportok fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) végzett reakciójával. Röviden, 2B8 antitestet (1,2 mg/ml) inkubáltunk 9,5-ös pH értékű 0,1M nátrium-karbonát pufferben, mely 150-200 µg FITC/mg fehérjét tartalmazott. Az oldatot szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 órán át, és a kapott 2B8-FITC konjugátumot egy Sephadex G-25 oszlopon tisztítottuk. A többi, ezekben a vizsgálatokban használt reagenst, mint például a B1-t és a Leu 16-t fluoreszcein konjugátumként közvetlenül a Coultertől vagy a Becton Dickinsontól vásároltuk meg.

Az analizálandó sejteket összegyűjtöttük, és háromszor 0,2% BSA-t és 0,1% nátrium-azidot tartalmazó PBS-ben mostuk. Az élet-

képességet tripán-kékes kizárással határoztuk meg, az életképességi követelmény >90% volt. A sejtkoncentrációkat 3 millió/ml-re állítottuk be mérőhelyenként 50 µl hozzáadásával a 96 mérőhelyes U-aljú lemezekben. Hozzáadtuk az első antitestet (50 µl) a megfelelő mérőhelyekre, és az elegyet 30 percen - 1 órán át környezeti hőmérsékleten inkubáltuk; ezt követően a sejteket ötször 200 µl/mérőhely 0,2% BSA-t és 0,02 % nátrium-azidot tartalmazó PBS-ben mostuk. A lemezekben lévő sejteket lecentrifugáltuk 1300 RPM-mel 1 percen át egy Sorvall centrifugán, és a felülúszókat a lemezek óvatos „megpöckölésével” eltávolítottuk. A szükséges esetekben második antitestet adtunk hozzá, és további 30 percen - 1 órán át inkubáltuk környezeti hőmérsékleten, sötétben; majd a mérőhelyeket fenti módon mostuk. Végül 200 µl rögzítópuffert (0,15 M nátrium-klorid, mely 1% paraformaldehidet (pH=7,4) tartalmaz) adtunk mindegyik mintához, és a kezelt sejteket 12X75 mm-es csövekbe vittük át az elemzéshez.

b. Jávai makákó majmokból származó teljes vér

A plazma eltávolítása után a sejteket centrifugálással kétszer mostuk, és HBSS-ben újra szuszpendáltuk. Az újraszuszpendált sejtekhez magzati borjúsérumot (2ml) adtunk. Az újraszuszpendált sejtek száz mikroliterét ezután 6 darab 15 ml-es kúpos centrifugacsőbe szétosztottuk. Fluoreszcensen jelölt monoklonális antitesteket adtunk hozzá a következőképpen:

1. cső: egérféle anti-CD2-FITC (AMAC), 2,5 µg/ml; 5 µg;
2. Cső: kecske anti-humán IGM-FITC (Fisher), 2,5 µg/ml; 5 µg;
3. Cső: kecske anti-egér IgG-RPE (Fisher), 2,5 mg/ml, 5 µg;
4. Cső: kecske anti-humán IgM-FITC + kecske anti-egér IgG-RPE

(abszorbeált), 2,5 µg/ml, 5 µg;

5. Cső: anti-humán CD20-FITC (anti-Leu 16, Becton Dickinson),
5 µg;

6. Cső: csak sejtek (autofluoreszcencia)

A jelölt antitesteket és sejteket 2 percig 1500 rpm-nél centrifugáltuk, hogy összekeverjük a sejteket és az antitesteket, és ezután mind a hat mintát jégre tettük, és 30 percen át inkubáltuk. Ezt követően a csöveket kivettük a jégről, és lizis puffert (37°C-ra előmelegítve) adtunk hozzá 12 ml mennyiségben. A mintákat ezt követően 15 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk, 5 percen át 4°C-on 1500 rpm-mel centrifugáltuk, és a felülszókát eltávolítottuk. A sejtpelletet ezután jelölőpufferben (1% BSA-t és 0,05% nátrium-azidot tartalmazó PBS) kétszer mostuk.

Ezt követően a sejteket csővenként 0,5 ml rögzítőpuffer (1% paraformaldehidet tartalmazó 0,15 M nátrium-korid, pH=7,4) hozzáadásával rögzítettük, és Becton Dickinson FACScan készüléken elemeztük autokompenzációt és Calibrite gyöngyökkel történő előkalibrálást alkalmazva. A fluoreszcenciából származó zöld fluoreszcenciát FL1 módban mértük, és a fikocitrinből származó vörös fluoreszcenciát FL2 módban mértük. Az adatokat logaritmikus alakban fejeztük ki. Először az életképes limfocita populációkat azonosítottuk menetirány versus jobb szöget bezáró fényszórással egy pontsor ábrázolású (dot blot) bittérképen. Ezután a teljes limfocitapopulációt izoláltuk az összes egyéb eset kizárásával. Az ezt követő fluoreszcencia mérések csak azokra a specifikus eseményekre világítottak rá, melyek a körülhatárolt területen belül történtek meg.

A nagy dózisos farmakológiai/toxikológiai tanulmányokhoz az elővizsgálati limfocita mennyiségeket minden egyes jávai makákó majomnál meghatároztuk, és alapértékként felhasználtuk.

A T- és B-sejtek százalékát és a T:B arányokat kiszámoltuk, és kimerítési referenciákként használtuk. Az elővizsgálati B-sejt populációt Leu16-tal és anti-humán IgM antitestekkel számoltuk.

Miután a majmokba 2B8-t oltottunk be, amikor a CD20 antigén 2B8-cal telítődött, a B-sejtek százalékát a teljes populációban kecske anti-humán IgM-FITC-et, anti-egér IgG-RPE-t és ezt a két markert tartalmazó kétszeresen festődő populációt alkalmazva becsültük meg. A kétszeresen festődő populációt alkalmaztuk a mennyiségi meghatározáshoz addig, amíg az összes 2B8 ki nem tisztult az állatok perifériás véréből. A T-sejtek százalékát a teljes limfocita populációban anti-CD2-FITC-et alkalmazva becsültük meg. Az adatokat három, minden mintánál 10 000 esetet tartalmazó mérésből átlagoltuk. A megjelölt vérminták mindegyikéből a sejteket ezután értékeltük, kiszámolva a T- és B-sejt szubpopulációt a teljes limfocita populáción belül. Szintén megvizsgáltuk a T:B arányokat. A B-sejtek kimerülését a B-sejtek eredeti B-sejt mennyiségéhez viszonyított százalékos csökkenéseként számoltuk ki mindegyik majomnál.

3. Radioaktív jódozás és a CD20 immunprecipitációja

Százmillió SB sejtet két egyenlő részre osztottunk a ^{125}I -vel és Iodobead-dal (Pierce Chemical Co.) történő felszíni jódozás után. A sejteket centrifugálással többször mostuk, amíg a radioaktivitás mértéke a felülúszóban vissza nem állt a háttér értékre. 100 mikrogramm 2B8 vagy B1 (Coulter Immunology) antitestet

adtunk a jelölt B-sejtek két mintájának egyikéhez. Az antitesteket és az SB sejteket egy éjszakán át inkubáltuk, majd háromszor centrifugálással mostuk, míg az összes nem kötött antitestet el nem távolítottuk. A kötött 2B8-t és B1-t tartalmazó sejtpelleteket ezután lizáltuk, és 1% NP40 detergenst tartalmazó 0,1 M Tris-HCl (pH=8,0) hozzáadásával extraháltuk, majd szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. Az extraktumot egy mikrofugában nagy sebességnél centrifugáltuk 30 percen át, és a felülúszókat új csövekbe tettük át. Mindegyik csőbe Protein A-Sepharose-t (300 µl) adtunk, és a gyantát centrifugálással pelletizáltuk. A protein-A-Sepharose-t ezután 20-szor mostuk, hogy eltávolítsuk a nem specifikusan kötődött jódosított fehérjét. Amikor a gyöngy-felülúszó radioaktivitási arány elérte a 100-as értéket, a pelletet SDS PAGE mintapufferrel kivontuk, és forrássig hevítettük. Miután lehűtöttük, mindegyik extraktum hozzávetőleg 15 000 cpm-jét adtuk egy 10 %-os poliakrilamid gél mérőhelyeire. Egy kis molekulatömegű előfestett standardot (BioRad Inc.) adtunk egy külön mérőhelyre, és ezt használtuk a molekulatömeg megbecslésére. A fehérjéket elektroforézissel feloldottuk, és a gél-t szárítottuk és egy röntgenfilm lapra exponáltuk 24 órán át -70°C-on; ezt követően a filmet előhívtuk és kielemeztük.

4. A 2B8 kötés Scatchard analízise

A tisztított 2B8-t Scatchard analízissel látszólagos affinitásra értékeltük ki. Radioaktívan jelölt 2B8-t állítottunk elő ¹²⁵I-vel végzett reakcióval Iodobeads jelenlétében. A szabad jód eltávolítását követően a radioaktívan jelölt antitestet különböző, 5000 ng/mérőhely-től 35 ng/mérőhelyig terjedő koncentrációkban inkubáltuk két példányban 10 000 SB sejttel. A sejtekhez kö-

tódó antitest mennyiségét a ^{125}I -vel jelölt 2B8 specifikus aktivitásból számoltuk ki. A kötött/szabad antitest arányát a kötött antitest moláris koncentrációjával szemben ábráztuk, és a lát-szólagos affinitási állandót az X és Y tengelymetszetek arányából számoltuk ki.

5. 2B8-MX DTPA előállítása

a. Az MX-DTPA forrása

Bizonyos preklinikai vizsgálatokhoz a 14-es szénnel jelölt 1-izotiocianáto-benzil-3-metil-dietilén-triamin-pentaecetsavat (MX-DTPA) szárított szilárd anyagként a National Institute of Health-ből, Otto Gansowtól szereztük be, és szárított állapotban 4°C -on tároltuk fénytől védve. A kelát törzsoldatait Milli-Q vízben állítottuk elő, és a koncentrációt a radioaktivitás méréssel és a vegyület specifikus aktivitását alkalmazva határoztuk meg. A törzsoldatok általában 2-5 mM koncentrációjúak voltak, és -70°C -on polipropilén csövekben tároltuk. Más vizsgálatokban, MX-DTPA-t dinátrium-sóként a Coulter Immunologytól szereztük be, és -70°C -on tároltuk.

b. Fémmentes körülmények fenntartása

Fémmentes reagensek alkalmazása mellett a reagensekkel végzett összes munkát úgy hajtottuk végre, hogy minimalizáljuk a fémszennyeződés lehetőségét. Amikor lehetséges, polipropilén műanyag tartályokat, mint például lombikokat, főzőpoharakat és mérőhengereket alkalmaztunk. Ezeket Alconox-szal mostuk, és alaposan kiöblítettük Milli-Q vízzel a használat előtt. Továbbá fémmentes pipettahegyeket (BioRad) használtunk a kis mennyiségek pontos kezelésére. A reagensek nagyobb mennyiségeinek kimérésére műanyag szerológiai pipettákat (1-25 ml-es méreteken szerezhető

be) alkalmaztunk. A reakciókat kényelmesen csavaros tetejű polipropilén mikrofuga csövekben (Sardtedt Industries; 1,5 ml befogadóképesség) vagy polipropilén kúpos csövekben (Costar; 15 ml és 50 µl) hajtottuk végre. Amikor dialíziscsővel dolgoztunk, egyszer használatos sebészeti kesztyűt viseltünk, melyet előtte Milli-Q vízzel leöblítettünk.

c. Antitest előállítása

A 2B8 egérféle anti-CD20 antitestet először aszciteszből tisztítottuk Protein A-val és QAE kromatográfiával. A későbbi kísérletekhez a 2B8-t üreges szál bioreaktor felülúszókból tisztítottuk ugyanezt a tisztítási eljárást alkalmazva. Az üreges szál eredetű antitestet a kereskedelmi forgalomba hozatal céljából a 2. példában leírt CHO-eredetű antitesttel helyettesítettük. Az antitestet a konjugációhoz úgy készítettük elő, hogy dialízist vagy többszöri puffercserét alkalmazva fémmentes, 50 mM bicin-NAOH-ba vittük át (pH=8,6), mely 150 mM NaCl-t tartalmazott. Bizonyos vizsgálatokban a puffercserét Centricon 30 (Amicon) spin filtereken (30 000 D MWCO) végzett ismételt ultrafiltráció alkalmazásával hajtottuk végre. Általában 50-2000 µl fehérjét (10 mg/ml) adtunk a szűrőegységhez, és 2 ml bicinpuffert adtunk hozzá. A szűrőt 4°C-on centrifugáltuk egy Sorval SS-34 rotorban 6 000 rpm-nél 45 percig. A retenciós mennyiség hozzávetőleg 50-100 µl volt. Ezt az eljárást kétszer megismételtük ugyanazzal a szűrővel. A retentátumot egy 1,5 ml-es polipropilén csavaros tetejű csőbe tettük, a fehérjére mértük, 10,0 mg/ml koncentrációig hígítottuk, és 4°C-on tároltuk amíg a centrifugáláshoz nem használtuk fel. Bizonyos vizsgálatokban a fehérjét 50 mM nátrium-citrátba (pH=5,5) vittük át, mely 150 mM NaCl-t és

0,05% nátrium-azidot tartalmazott, a fentebb leírt eljárást alkalmazva.

d. Konjugációs eljárás

A 2B8 MX-DTPA-val történő konjugációját polipropilén csövekben hajtottuk végre környezeti hőmérsékleten. Az MX-DTPA fagyasztott törzsoldatait közvetlenül a felhasználás előtt olvasztottuk fel. Jellemzően 50-200 μ l, 10 mg/ml antitestet reagáltatunk a keláttal 4:1 kelát:fehérje molarányban. A reakciókat a kelát-törzsoldat hozzáadásával és élénk keveréssel indítottuk be; hagytuk, hogy a konjugáció egy éjszakán át folytatódjék; általában 14-20 órán át, környezeti hőmérsékleten. A nem reagált kelátot dialízissel vagy ismételt ultraszűréssel eltávolítottuk a konjugátumból a fent leírt módon, 0,05% nátrium-azidot tartalmazó fémmentes normál sóoldatba (0,09%). A fehérjekoncentrációt 10 mg/ml-re állítottuk be, és 4°C-on egy polipropilén csőben tároltuk.

e. A kelátbeépülés meghatározása

A kelátbeépülést szcintillációs számlálással és a tisztított konjugátummal kapott értéket a szén-[14]-jelölt kelát specifikus aktivitásával összehasonlítva határoztuk meg. A későbbi vizsgálatokhoz, melyekben a Coulter Immunologytól kapott nem-radioaktív kelátot alkalmaztunk, a kelátbeépülést úgy határoztuk meg, hogy a konjugátumot a ^{90}Y ismert koncentrációjú és specifikus aktivitású radioaktív hordozó oldatának feleslegével inkubáltuk.

Röviden, egy ismert koncentrációjú ittrium-klorid törzsoldatot készítettünk fémmentes 0,05 N HCl-ben, melyhez hordozómentes ^{90}Y -t (klorid-só) adtunk. Ennek az oldatnak az alikvotját

folyadékszintillációs számlálással analizáltuk, hogy meghatározzuk a reagens pontos specifikus aktivitását. Az ittrium-klorid reagens egy olyan mennyiségét, mely egyenlő a várhatóan az antitesthez kapcsolódó kelátok mólszámának háromszorosával, jellemzően 2 mol/mol antitestet tettünk egy polipropilén csőbe, és a pH-t 4,0-4,5-re állítottuk be 2 M nátrium-acetáttal. Ezután konjugált antitestet adtunk hozzá, és az elegyet 15-30 percig környezeti hőmérsékleten inkubáltuk. A reakciót 20 mM EDTA 1 mM végső koncentrációban való hozzáadásával állítottuk le, és az oldat pH-ját hozzávetőleg 6-ra állítottuk be 2M nátrium-acetáttal.

Ötperces inkubálás után a teljes térfogatot nagyteljesítményű méretkizárásos kromatográfiával tisztítottuk a lentebb leírt módon. Az eluált fehérje-tartalmú frakciókat egyesítettük, a fehérjekoncentrációt meghatároztuk, és egy alikvotot radioaktivitásra mértünk. A kelátbeépülést a ^{90}Y -készítmény specifikus aktivitását és a fehérjekoncentrációt alkalmazva határoztuk meg.

f. A 2B8-MX-DTPA immunreaktivitása

A konjugált 2B8 immunreaktivitását teljes sejtes ELISA-t alkalmazva mértük. Tenyészetből közepes log-fázisú SB sejteket gyűjtöttünk össze centrifugálással, és kétszer 1 X HBSS-ben mostuk. A sejteket $1-2 \times 10^6$ sejt/ml-re hígítottuk HBSS-ben, és 96 mérőhelyes mikrotitráló lemezekbe szétosztottuk 50 000 -100 000 sejt/mérőhely koncentrációban. A lemezeket vákuum alatt 2 órán át szárítottuk 40-45°C-on, hogy a sejteket a műanyaghoz rögzítsük. A lemezeket -20°C-on szárazon tartottuk a felhasználásig. A méréshez a lemezeket környezeti hőmérsékletre felmelegítettük közvetlenül a felhasználás előtt, majd 1% BSA-t tartalmazó 1X

PBS-sel (pH=7,2-7,4) blokkoltuk (2 óra). A mintákat az mérőeljáráshoz 1 X PBS/1% BSA-ban hígítottuk, a lemezekre felvittük és ugyanabban a pufferben sorozathígításokat hajtottunk végre (1:2). Miután a lemezeket 1 órán át környezeti hőmérsékleten inkubáltuk, a lemezeket háromszor 1 X PBS-sel mostuk. A mérőhelyekre második antitestet (kecske anti-egér IgG1-specifikus HRP-konjugátum) (50 µl) adtunk (1:1500-as hígítás 1X PBS/1% BSA-ban), és 1 órán át környezeti hőmérsékleten inkubáltuk. A lemezeket négyszer 1 X PBS-sel mostuk, majd ABTS szubsztrátoldatot (50 mM nátrium-citrát, pH=4,5, mely 0,01% ATBS-t és 0,001% H₂O₂-t tartalmazott) adtunk hozzá. A lemezeket 405 nm-en olvastuk le 15-30 perces inkubálás után. Az assay-k antigén-negatív HSB sejteket tartalmaztak a nem specifikus kötés nyomon követésére. A konjugátum immunreaktivitását az abszorbanciaértékeket a megfelelő hígítási faktoral szemben ábrázolva számoltuk ki, és összehasonlítottuk az ugyanazon a lemezen tesztelt natív antitestet alkalmazva kapott értékekkel (ezek a 100%-os immunreaktivitást képviselik). A titrálási görbe lineáris részén több értéket összehasonlítottunk, és kiszámoltuk az átlagot.

g. A natív 2B8 és a 2B8-MX-DTPA in vitro stabilitása

Az antitest és a konjugátum stabilitásának ehhez a 12-hetes méréséhez a 2B8 antitest és a 2B8-MX-DTPA alikvotjait normál sóoldatban vagy 10 mM glicin-HCl-t (pH=6,8) tartalmazó normál sóoldatban készítettük el. A mintasorozatok két példányát 4°C-on és 30°C-on inkubáltuk, és a mintákat hetente mértük a következő módszereket alkalmazva: SDS-PAGE (redukáló és nem redukáló is), immunreaktivitás teljes-sejt immunoassay-vel, melyhez befogóként SB (antigén-pozitív) vagy HSB (antigén-negatív) sejteket hasz-

náltunk, és izoelektromos fókuszáló gél-elektroforézis (pH érték tartomány: 3-10). Továbbá a konjugátum radioaktív jelölési hatékonyságát is mértük a 4., 8., és 12. héten a konjugátum ^{90}Y -nal történő radioaktív jelölésével, és a termék SDS-PAGE-n végzett analizisével és autoradiográfiás elemzéssel. Végül egy külön vizsgálatban a 2B8-MX-DTPA alikvotjait, melyeket 4°C -on és 30°C -on inkubáltuk 10 héten át, ^{111}In -nel radioaktívan jelöltük, és egy biológiai megoszlási vizsgálatban BALB/c egerekben kiértékeltek a lentebb ismertetett módon.

h. Immunhisztológiai vizsgálatok

Az IMPATH Laboratories-szel immunhisztológiai vizsgálatokat hajtottunk végre mind a natív mind a konjugált (2B8-MX-DTPA) antitestekkel acetonnal rögzített humán szövetmetszeteket alkalmazva. Az antitesteket üreges szál bioreaktor felülúszókból tisztítottuk protein A-n és Q Sepharose-n végzett kromatográfiával. Klinikai minőségű konjugátumot állítottunk elő a Coulter Immunology-tól származó MX-DTPA-t alkalmazva, a fentebb leírt eljárásnak megfelelően.

i. A radioaktívan jelölt 2B8-MX-DTPA in vitro immunreaktivitása

Bizonyos kísérletekhez teljes-sejt ELISA eljárást alkalmaztunk a jelöletlen 2B8-MX-DTPA-nál. A későbbi kísérletekben a ^{111}In -nel és ^{90}Y -nal jelölt konjugátumok (mindegyiket az IDEC Pharmaceuticals-nál vagy alternatív lehetőségként az MPI Pharmacy Services, Inc.-nél készítették) immunreaktivitását Lindmo által leírt teljes-sejt kötési mérőeljárás (3) módosított változatát használva határoztuk meg. Röviden, növekvő koncentrációkban középső log-fázisú antigén-pozitív SB sejteket vagy an-

tigén-negatív HSB sejteket [$20-30 \times 10^6$ sejt/ml hígítási pufferben (PBS (pH=7,4), mely 1% BSA-t 0,1% zselatint és 0,02% nátrium-azidot tartalmaz)] adtunk két példányban a csövek sorozatába. A radioaktívan jelölt konjugátumot 1-5 ng/ml végső antitest-koncentrációra hígítottuk hígítási pufferrel, és 0,35 ml-t adtunk mindegyik csőbe. 75-90 perces inkubálási idő után környezeti hőmérsékleten a sejteket centrifugálással pelletizáltuk, és a felülúszót összegyűjtöttük. A felülúszó frakcióban megmaradó radioaktivitást egy gammaszámlálóval vagy egy szcintillációs számlálóval határoztuk meg. Az adatokat a teljes hozzáadott radioaktivitás osztva a sejthez kapcsolt radioaktivitás hányadosaként ábrázoltuk a sejtszám/cső reciprokéval szemben. Az y tengely metszete így az immunreaktív frakciót képviseli.

j. A radioaktívan jelölt 2B8-MX-DTPA in vitro stabilitása a humán szérumban

A ^{111}In - és ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA in vitro stabilitását úgy határoztuk meg, hogy humán szérumban inkubáltuk 37°C -on 96 órán át. Konjugált antitestet állítottunk elő, és ^{111}In -nel („mix-&-shoot” eljárással) vagy a fent leírt módon ^{90}Y -nal radioaktívan jelöltük. A ^{111}In és ^{90}Y -jelölt konjugátumok koncentrációja 2,5 illetőleg 14,6 mCi/mg volt; a radioaktívan jelölt konjugátumokat 75 mg/ml humán szérumalbumint (HSA) és 1 mM DTPA-t (ittrium-jelölt konjugátum) tartalmazó pufferbe vagy 50 mg/ml HSA-t tartalmazó pufferbe (indiummal jelölt konjugátum) szuszpendáltuk. A radioaktívan jelölt konjugátumokat 1:10 arányban hígítottuk normál humán szérummal (nem hőinaktivált), és alikvotokat helyeztünk fertőzésmentes körülmények között steril zárható csövekbe; ezeket a csöveket ezután 37°C -on inkubáltuk maximum 96 óráig

tartó időtartamig. A kiválasztott időpontokban a mintákat kivettük, és nem redukáló SDS-PAGE-vel 4-20%-os gradiens géleken analízáltuk, melyet autoradiográfia és instant vékonyréteg kromatográfia követett.

k. A klinikailag formulázott ^{111}In -2B8-MX-DTPA in vitro stabilitása

A 2B8-MX-DTPA konjugátumot ^{111}In -nel radioaktívan jelöltük, és HPLC tisztítás nélkül alkalmaztuk („mix-and shoot” eljárás). A radioaktívan jelölt antitestet PBS-ben hígítottuk, és humán szérumalbumint (HSA) adtunk hozzá 50 mg/ml végső koncentrációban. A formulázott radioaktívan jelölt konjugátum specifikus aktivitása 2,2 mCi/mg volt. A formulázott konjugátumot ezt követően 4°C-on inkubáltuk 48 órán át, és az alikvotokat a 0., 24., 48. órában elemeztük nem-redukáló SDS-PAGE-t alkalmazva 4-20%-os gradiens géleken, majd autoradiográfiával, és instant vékonyréteg kromatográfiával. Az immunreaktivitást mindegyik időpontban teljes-sejt szuszpenziós assay-t alkalmazva mértük az 1. fejezetben fentebb leírt módon.

l. A klinikailag formulázott ^{111}In -2B8-MX-DTPA in vitro stabilitása

A 2B8-MX-DTPA konjugátumot ^{90}Y -nal radioaktívan jelöltük, és méretkizárásos kromatográfiával HPLC-n tisztítottuk 1X PBS-t alkalmazva elúciós pufferként. A radioaktívan jelölt konjugátum-frakciókat összegyűjtöttük, és humán szérumalbumint (HSA) és DTPA-t adtunk hozzá 75 mg/ml illetőleg 1 mM végső koncentrációban. A formulázott radioaktívan jelölt konjugátum specifikus aktivitása 14,6 mCi/mg volt. A formulázott konjugátumot ezt követően 4°C-on inkubáltuk 48 órán át, és az alikvotokat a 0., 24.,

48. órában elemeztük nem-redukáló SDS-PAGE-t alkalmazva 4-20%-os gradiens géleken, majd autoradiográfiával, és instant vékonyréteg kromatográfiával. Az immunreaktivitást mindegyik időpontban teljes-sejt szuszpenziós assay-t alkalmazva mértük az 1. fejezetben fentebb leírt módon.

2. Állatokon végzett vizsgálatok

a. Főemlős nagy dózisos farmakológiai/toxikológiai vizsgálat 2B8-t alkalmazva

A 2B8 antitestet egy nagydózisú farmakológiai vizsgálatban értékeltük ki a GLP szabályzásnak megfelelően a White Sands Research Centernél (Vizsgálati szám: 920111). Felnőtt *Macaca fascicularis* (jávai makákó) majmokat használtunk; mindegyik vizsgálati csoport egy nőstényből és egy híméből állt. Antitestet adtunk be intravénás injekcióval 48 óránként, összesen hét injekciót. A vizsgálatban öt csoport volt: I. csoport (sóoldat); II. csoport (0,6 mg/kg); III. csoport (2,5 mg/kg); IV. csoport (10 mg/kg); és V. csoport (10 mg/kg csak a 0. napon).

A vizsgálat megkezdése előtt vért vettünk mind a 10 állattól, és arra használtuk fel, hogy meghatározzuk a reagens-hátttereket és a kezdeti B-sejt populációkat. Az összes ez utáni vérmintát mindegyik antitest-injekciót megelőzően vettük le. A III. és IV. csoportot a 13. napon a teljes boncolás és hisztopatológia előtt fájdalommentesen megöltük.

Az I., II. és V. csoport állataitól a 0., 1., 3., 7., 13., 21., 37. és 52. napon vért vettünk, és hozzávetőleg 5 ml teljes vért vettünk le a heparinnal kezelt csövekbe. A teljes vért 4°C-on tároltuk, és 24 órán belül analizáltuk. Mindegyik állat vérét 2000 rpm-nél 5 percen át centrifugáltuk, és a felülúszó

plazmát a RIA-val végzett szérum 2B8 szintek mérőeljárásához kivettük (lásd a RIA eljárást a specifikus assay módszereknel). A FBL-eket és RBC-ket tartalmazó pelletizált anyagot FCS-ben újra szuszpendáltuk a FACS analízishez.

b. Farmakokinetikai vizsgálatok a 2B8-cal és a 2B8-MX-DTPA-val

A 2B8 átlagos szérum béta féléletidejét jávai makákó majmokban határoztuk meg az V. csoport állatait (fentebb) használva. Kecske anti-egér IgG1-t (Fisher Scientific) hígítottunk 2,0 µg/ml koncentrációra 10 mM borát-pufferben (pH=9,6), és 50 µl-t adtunk egy 96 mérőhelyes lemez mindegyik mérőhelyére. Hagytuk, hogy az antitest a lemezhez kötődjön egy éjszakás 4°C-on történő inkubálással, vagy 2 órán át környezeti hőmérsékleten történő inkubálással. Mindegyik lemezt blokkoltuk 30 percen át környezeti hőmérsékleten 150 µl/mérőhely, 1% BSA-t tartalmazó PBS-sel. A lemezeket desztillált vízzel mostuk, és a szérum- vagy plazmamintákat három példányban vittük fel külön-külön mérőhelyre 1:100 kezdeti hígításnál, melyet 1:2 sorozathígítás követett. Tisztított 2B8-t adtunk az elővérvételi szérumhoz, és standard görbeként való alkalmazáshoz hígítottuk 0,5 mg/ml-rel kezdve; a mintákat 1:100 arányban hígítottuk, majd sorozathígításokat hajtottunk végre úgy, mint a többi mintánál. A lemezeket 1 órán át inkubáltuk környezeti hőmérsékleten, és négyszer mostuk desztillált vízzel. A második reagenst (kecske anti-egér IgG1-HRPO) ezután 1:400-as hígításban adtuk hozzá, és környezeti hőmérsékleten inkubáltuk további egy órán át. A lemezeket újra mostuk desztillált vízben, és 0,1 ml, hidrogén-peroxidot tartalmazó peroxidáz-szubsztrátot adtunk hozzá. Hagytuk, hogy a

szín kialakuljon a reakciótól számított 20 percig; az abszorbanciát ezután 405 nm-en meghatároztuk egy mikrolemez ELISA leolvasót használva. Az eredményeket μg antitest/ml szérum értéként ábrázoltuk.

Továbbá meghatároztuk a 2B8 és a 2B8-MX-DTPA β $t_{1/2}$ értékeit BALB/c egerekben. A nem konjugált 2B8-t -70°C -on 1 X PBS ($\text{pH}=7,4$)/glicerinben lefagyasztottuk, 0,5 mg/ml-re hígítottuk, és sterilre szűrtük. Konjugált antitestet készítettünk szokásos eljárási módokat követve, de szén-[14]-jelölt keláttal; a kelátbeépülés 1,5 mol/mol antitest volt. A tisztított konjugátumot 0,5 mg/ml-re hígítottuk normál sóoldatban (0,9%), sterilre szűrtük, és 4°C -on tároltuk a natív antitesttel a felhasználásig.

Hat-nyolc hetes egereket oltottunk be 100 μl tisztított 2B8 antitesttel 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációnál. Az egerektől ezután szemüreg mögötti punkcióval vért vettünk különböző, 0-264 óra közé eső időpontokban, és a szérumaikat natív és konjugált 2B8 antitest jelenlétére elemeztük teljes sejt enzim-immunoassay-vel, befogóként SB antigén-pozitív B-sejtvonalat alkalmazva. A kapott adatokat a 2B8 vagy 2B8-MX-DTPA koncentrációjaként ábrázoltuk az idő függvényében; ezekből az eredményekből egy lineáris regressziós görbét hoztunk létre, és a meredekséget használtuk a β $t_{1/2}$ értékek meghatározására.

c. A [89]-Y-2B8-MX-DTPA farmakológiai/toxikológiai vizsgálata jávai makákó májokban

Ittrium-[89]-t hordozó 2B8-MX-DTPA-t állítottunk elő a ^{90}Y beépítésére leírt eljárást alkalmazva, kivéve, hogy HPLC tisztítást nem alkalmaztunk. A nem radioaktív, fémet hordozó

konjugátumot 1 x PBS-ben formuláztuk, ami 75 mg/ml HSA-t és 1 mM DTPA-t tartalmazott, és 920611 számú GLP vizsgálatban értékeltük ki a White Sands Research Center-nél. Egy him és egy nőstény majmot tartalmazott mind a négy csoport. Az állatok intravénás injekciót kaptak 48 óránként, összesen 7 injekciót, a következő gyógyszer mennyiségekkel: I. csoport - sóoldat, II. csoport - 0,003 mg/kg; III. csoport - 0,03 mg/kg; és IV. csoport - 0,3 mg/kg. Az állatokat a vizsgálat alatt kiértékeltük, meghatározva a testtömegeket és a hőmérsékleteket, a táplálék- és a vízfogyasztást, kiválasztást, szérumkémiai elemzést, hematológiát, vizelet analízist, és fizikai vizsgálatokat. Az I-IV. csoportok állataitól az infúzió előtt a 0., 2., 7., 10. és 14. napon vért vettünk, és a keringő B-sejtek mennyiségére analizáltuk FACS Analízissel.

d. A radioaktívan jelölt 2B8-MX-DTPA biológiai megoszlása

Egy elővizsgálatban a ^{111}In -nel jelölt 2B8-MX-DTPA-t a szöveti eloszlásra értékeltük ki 6-8 hetes BALB/C egerekben. A radioaktívan jelölt konjugátumokat a klinikai minőségű 2B8-MX-DTPA-t alkalmazva állítottuk elő a fentebb ismertetett „mix-and-shoot” eljárást alkalmazva. A konjugátum specifikus aktivitása 2,3 mCi/mg volt, és a konjugátumot 50 mg/ml HSA-t tartalmazó PBS-ben (pH=7,4) formuláztuk. Az egereknek intravénás injekcióval 100 μl ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA-t (hozzávetőleg 21 mCi) adtunk be, és a három egérből álló csoportokat cervikális diszlokációval fájdalommentesen megöltük a 0., 24., 48. és 72. órában. Miután megöltük őket, a farkat, szívet, tüdőt, májat, vesét, lépét, izmot és combcsontot kivettük, mostuk, lemértük; és vérmintát is vettünk az elemzéshez. Mindegyik mintához kap-

csolódó radioaktivitást gamma-számlálással meghatároztuk, és ezután a beadott dózis/gramm szövet százalékot meghatároztuk. Nem tettünk kísérletet arra, hogy a különböző szervekkel járó vér által hordozott aktivitásmegoszlást ne vegyük számításba. Egy külön eljárásban a 2B8-MX-DTPA alikvotjait inkubáltuk 4°C-on, és 30°C-on 10 héten át radioaktívan jelöltük ^{111}In -nel 2,1 mCi/mg specifikus aktivitásig mindegyik készítménynél. Ezeket a konjugátumokat ezután egerekben végzett biológiai eloszlási vizsgálatokban használtuk fel a fentebb leírt módon.

A dozimetriás meghatározásokhoz a 2B8-MX-DTPA-t ^{111}In -nel radioaktívan jelöltük 2,3 mCi/mg specifikus aktivitásig, és hozzávetőleg 1,1 μCi -t injektáltunk mind a 20 BALB/c egérbe. Ezután öt egérből álló csoportok mindegyikét az 1., 24., 48. és 72. órában fájdalommentesen megöltük, és a szerveiket kivettük, és az elemzéshez kipreparáltuk. Továbbá bőr-, izom- és csontdarabokat vettünk ki, és dolgoztunk fel az elemzéshez; vizeletet és ürüléket is gyűjtöttünk, és a 24-72 órás időpontokban elemeztük.

Hasonló módszert alkalmazva a 2B8-MX-DTPA-t szintén ^{90}Y -nal radioaktívan jelöltük, és a biológiai megoszlását BALB/c egerekben kiértékeltek egy 72 órás időszakon át. A HPLC méretkizárásos kromatográfiával végzett tisztítás után négy, öt egérből álló csoportnak intravénás injekcióban hozzávetőleg 1 μCi klinikailag formulált konjugátumot (specifikus aktivitás: 12,2 mCi/mg) adtunk be, a csoportokat ezután az 1., 24., 48. és 72. órában fájdalommentesen megöltük, és a szerveiket és szöveteiket a fentebb leírt módon kielemeztük. Mindegyik szövetmintához kapcsolódó radioaktivitást meghatároztuk a fékezésési sugárzási

energiát egy gamma szcintillációs számlálóval. Az aktivitási értékeket ezután beadott dózis/gramm szövet százalékként vagy beadott dózis/szerv százalékként fejeztük ki, Míg a szerveket és más szöveteket többször átöblítettük a felületi vér eltávolítására, a szerveket nem áramoltattuk át. Tehát a szerv aktivitási értékekből nem vontuk le a belsőleg kapcsolódó vér által képviselt aktivitási szennyeződést.

e. Az ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA tumorlokalizációja

A radioaktívan jelölt 2B8-MXDTPA lokalizációját Ramos B-sejt tumorokat hordozó tímusz nélküli egerekben határoztuk meg. Hatnyolc hetes tímusz nélküli egerekbe szubkután injekcióval (jobb hátsó horpasz) 0,1 ml, $1,2 \times 10^7$ Ramos tumorsejtet tartalmazó RPMI-1640-t adtunk be, mely tumorsejteket előzőleg tímusz nélküli egerekben való növekedésre adaptáltuk. Tumorok keletkeztek két héten belül, és a tömegük 0,07-1,1 gramm közötti volt. Az egereknek intravénásan 100 μl ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA-t (16,7 mCi) adtunk be, és a három egérből álló csoportokat cervikális diszlokációval fájdalommentesen megöltük a 0., 24., 48. és 72. órában. Miután megöltük, a farkat, szívet, tüdőket, májat, vesét, lépet, izmot, combcsontot és a tumort kivettük, mostuk, lemértük, és egy vérmintát is vettünk az elemzéshez. Gammaszámlálással meghatároztuk mindegyik mintához kapcsolt radioaktivitást, és a százalék beinjektált dózis/gramm szövet értéket meghatároztuk.

3. Dozimetriás számítások

A ^{111}In -nel vagy ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA-val injekciózott BALB/c egereket alkalmazva kapott biológiai megoszlási adatok (1-4. és 5-8. táblázat) felhasználásával a Medical Internal

Radiation Dose (MIRD) Committee of the Society of Nuclear Medicine által kialakított módszert alkalmazva kiszámoltuk egy 70 kg-os betegnek beadott 1,0 mCi dóziséból abszorbeált sugárzási dózis becsült értékeit. A radioaktívan jelölt konjugátumok biológiai féléletidejét a biológiai megoszlási adatokból meghatározott beinjektált dózis/szerv értékekből határoztuk meg mindegyik radioimmun-konjugátumnál. Bizonyos szöveteknél, például a vérnél feltételeztük, hogy a radiokonjugátum biológiai lebomlása egy kétrészes modellt követ, melynél egy exponenciális hanyatlás van ezekben a részekben. Más szövetekben, például a májban az aktivitási szintek durván állandók maradnak a 72 órás biológiai megoszlási vizsgálatban, feltételezve, hogy a biológiai féléletidő nagyon hosszú, és az 1000 órának megfelelő értéket határozzuk meg.

1. táblázat

Aktivitásmegoszlás 1 órával a ^{111}In -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után normál BALB/c egerekben

Átlagértékek $\pm$ SD (standard hiba)

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	1,47 $\pm$ 0,17	40,3 $\pm$ 5,32	58,4 $\pm$ 3,1
Szív	0,087 $\pm$ 0,01	5,88 $\pm$ 0,76	0,51 $\pm$ 0,05
Tüdő (2)	0,149 $\pm$ 0,01	14,2 $\pm$ 1,4	2,10 $\pm$ 0,17
Vese (1)	0,127 $\pm$ 0,02	9,82 $\pm$ 0,86	1,22 $\pm$ 0,12
Máj	1,06 $\pm$ 0,20	10,32 $\pm$ 1,58	10,76 $\pm$ 1,93
Lép	0,090 $\pm$ 0,01	6,94 $\pm$ 1,17	0,61 $\pm$ 0,03
Izom	8,39 $\pm$ 0,98	0,70 $\pm$ 0,25	5,67 $\pm$ 1,35
Csont	3,15 $\pm$ 0,35	2,97 $\pm$ 0,71	9,10 $\pm$ 1,09
Bőr	3,15 $\pm$ 0,35	0,96 $\pm$ 0,29	3,0 $\pm$ 1,12
Gyomor-bél rendsz.	2,58 $\pm$ 0,31	6,10 $\pm$ 2,00	7,80 $\pm$ 1,80
Vizelet			-
Széklet			-
Teljes			99,04 $\pm$ 4,8

Egerek száma = 5

Átlagos tömeg = 20,97 $\pm$ 2,46 g

2. táblázat

Aktivitätsmegoszlás 24 órával a ^{111}In -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után normál BALB/c egerekben

Átlagértékek $\pm$ SD (standard hiba)

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	1,47 $\pm$ 0,07	21,97 $\pm$ 1,87	32,22 $\pm$ 1,35
Szív	0,128 $\pm$ 0,03	4,02 $\pm$ 0,23	0,38 $\pm$ 0,01
Tüdő (2)	0,152 $\pm$ 0,02	7,90 $\pm$ 1,61	1,20 $\pm$ 0,18
Vese (1)	0,128 $\pm$ 0,01	5,94 $\pm$ 0,40	0,76 $\pm$ 0,04
Máj	1,11 $\pm$ 0,10	10,08 $\pm$ 1,83	11,20 $\pm$ 2,23
Lép	0,082 $\pm$ 0,01	5,04 $\pm$ 0,75	0,40 $\pm$ 0,02
Izom	8,41 $\pm$ 0,38	1,24 $\pm$ 0,05	10,44 $\pm$ 0,76
Csont	3,15 $\pm$ 0,14	2,02 $\pm$ 0,33	6,30 $\pm$ 0,81
Bőr	3,15 $\pm$ 0,14	3,75 $\pm$ 0,39	11,77 $\pm$ 1,09
Gyomor-bél rendsz.	2,91 $\pm$ 0,27	4,50 $\pm$ 0,52	6,65 $\pm$ 0,56
Vizelet			0,98
Széklet			2,54
Teljes			87,10 $\pm$ 1,68

Egerek száma = 5

Átlagos tömeg = 21,3 $\pm$ 0,94 g

3. táblázat

Aktivitásmegoszlás 48 órával a ^{111}In -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után normál BALB/c egerekben

Átlagértékek $\pm$ SD (standard hiba)

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	1,45 $\pm$ 0,13	22,41 $\pm$ 3,95	31,90 $\pm$ 2,89
Szív	0,090 $\pm$ 0,01	4,05 $\pm$ 0,94	0,36 $\pm$ 0,06
Tüdő (2)	0,155 $\pm$ 0,02	8,45 $\pm$ 0,53	1,31 $\pm$ 0,19
Vese (1)	0,125 $\pm$ 0,01	6,16 $\pm$ 1,15	0,76 $\pm$ 0,07
Máj	1,040 $\pm$ 0,11	9,41 $\pm$ 2,33	9,84 $\pm$ 3,18
Lép	0,082 $\pm$ 0,01	5,32 $\pm$ 0,71	0,48 $\pm$ 0,11
Izom	8,26 $\pm$ 0,77	1,42 $\pm$ 0,58	11,62 $\pm$ 4,67
Csont	3,10 $\pm$ 0,29	2,08 $\pm$ 0,16	6,41 $\pm$ 0,44
Bőr	3,10 $\pm$ 0,29	3,43 $\pm$ 0,59	10,54 $\pm$ 1,69
Gyomor-bél rendsz.	2,96 $\pm$ 0,20	5,05 $\pm$ 0,63	7,46 $\pm$ 0,60
Vizelet			1,46
Széket			6,41
Teljes			88,49 $\pm$ 6,87

Egerek száma = 5

Átlagos tömeg = 20,65 $\pm$ 1,93 g

4. táblázat

Aktivításmegoszlás 72 órával a ^{111}In -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után normál BALB/c egerekben

Átlagértékek $\pm$ SD (standard hiba)

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	1,52 $\pm$ 0,06	18,97 $\pm$ 1,31	28,51 $\pm$ 2,03
Szív	0,094 $\pm$ 0,01	3,71 $\pm$ 0,31	0,35 $\pm$ 0,04
Tüdő (2)	0,161 $\pm$ 0,01	7,60 $\pm$ 0,30	1,18 $\pm$ 0,09
Vese (1)	0,135 $\pm$ 0,01	5,55 $\pm$ 0,53	0,76 $\pm$ 0,09
Máj	1,11 $\pm$ 0,11	9,90 $\pm$ 1,77	11,00 $\pm$ 2,03
Lép	0,095 $\pm$ 0,01	5,12 $\pm$ 0,75	0,48 $\pm$ 0,04
Izom	8,58 $\pm$ 0,34	1,04 $\pm$ 0,09	8,95 $\pm$ 0,68
Csont	3,22 $\pm$ 0,12	1,73 $\pm$ 0,34	6,04 $\pm$ 0,51
Bőr	3,22 $\pm$ 0,12	3,16 $\pm$ 0,60	10,19 $\pm$ 2,03
Gyomor-bél rendsz.	2,79 $\pm$ 0,19	4,53 $\pm$ 0,83	6,37 $\pm$ 1,38
Vizelet			2,49
Széklet			11,50
Teljes			87,80 $\pm$ 4,79

Egerek száma = 5

Átlagos tömeg = 21,46 $\pm$ 0,84

5. táblázat

Aktivitásmegoszlás 1,0 órával a ^{90}Y -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után normál BALB/c egerekben

Átlagértékek $\pm$ SD (standard hiba)

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	1,27 $\pm$ 0,06	39,23 $\pm$ 2,45	49,77 $\pm$ 1,72
Szív	0,086 $\pm$ 0,01	5,80 $\pm$ 0,84	0,50 $\pm$ 0,09
Tüdő (2)	0,137 $\pm$ 0,01	12,11 $\pm$ 1,08	1,66 $\pm$ 0,17
Vese (1)	0,120 $\pm$ 0,01	10,23 $\pm$ 1,30	1,15 $\pm$ 0,12
Máj	0,921 $\pm$ 0,05	12,12 $\pm$ 1,72	11,17 $\pm$ 1,66
Lép	0,080 $\pm$ 0,01	9,27 $\pm$ 0,46	0,74 $\pm$ 0,07
Izom	7,27 $\pm$ 0,32	0,78 $\pm$ 0,13	5,72 $\pm$ 1,05
Csont	2,73 $\pm$ 0,12	4,35 $\pm$ 0,39	11,89 $\pm$ 1,47
Bőr	2,73 $\pm$ 0,12	2,12 $\pm$ 0,78	5,82 $\pm$ 2,24
Gyomor-bél rendsz.	2,22 $\pm$ 0,06	3,52 $\pm$ 1,12	4,22 $\pm$ 0,84
Vizelet	-	-	-
Széklet	-	-	-
Teljes			94,85 $\pm$ 3,47

Egerek száma = 5

Átlagos tömeg = 18,17 g $\pm$ 0,84 g

6. táblázat

Aktivitásmegoszlás 24 órával a ^{90}Y -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után normál BALB/c egerekben

Átlagértékek $\pm$ SD (standard hiba)

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	1,517 $\pm$ 0,090	8,35 $\pm$ 2,547	12,83 $\pm$ 4,60
Szív	0,092 $\pm$ 0,005	2,63 $\pm$ 0,142	0,240 $\pm$ 0,006
Tüdő (2)	0,141 $\pm$ 0,005	4,56 $\pm$ 0,393	0,644 $\pm$ 0,047
Vese (1)	0,138 $\pm$ 0,007	5,63 $\pm$ 0,222	0,779 $\pm$ 0,040
Máj	0,438 $\pm$ 0,098	5,22 $\pm$ 0,335	2,259 $\pm$ 0,399
Lép	0,081 $\pm$ 0,003	4,23 $\pm$ 0,180	0,345 $\pm$ 0,011
Izom	8,668 $\pm$ 0,514	0,976 $\pm$ 0,164	8,55 $\pm$ 1,945
Csont	3,246 $\pm$ 0,186	1,326 $\pm$ 0,102	4,289 $\pm$ 0,154

Egerek száma = 3

Átlagos tömeg = 21,671 g $\pm$ 1,11 g

7. táblázat

Aktivitásmegoszlás 48 órával a ^{90}Y -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után normál BALB/c egerekben

Átlagértékek $\pm$ SD (standard hiba)

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	$1,33 \pm 0,06$	$17,34 \pm 2,0$	$23,03 \pm 1,95$
Szív	$0,088 \pm 0,01$	$3,56 \pm 0,31$	$0,31 \pm 0,04$
Tüdő (2)	$0,139 \pm 0,01$	$7,54 \pm 0,88$	$1,05 \pm 0,15$
Vese (1)	$0,122 \pm 0,01$	$6,53 \pm 0,42$	$0,79 \pm 0,01$
Máj	$0,968 \pm 0,04$	$9,05 \pm 1,70$	$8,92 \pm 1,57$
Lép	$0,087 \pm 0,01$	$6,52 \pm 1,13$	$0,57 \pm 0,07$
Izom	$7,26 \pm 0,36$	$1,05 \pm 0,18$	$8,01 \pm 1,17$
Csont	$2,86 \pm 0,14$	$3,34 \pm 0,42$	$9,53 \pm 1,08$
Bőr	$2,86 \pm 0,14$	$4,13 \pm 0,76$	$11,75 \pm 1,82$
Gyomor-bél rendsz.	$2,84 \pm 0,19$	$2,74 \pm 0,34$	$3,80 \pm 0,30$
Vizelet	-	-	4,29
Széket	-	-	7,67
Teljes			$79,72 \pm 3,23$

Egerek száma = 5

Átlagos tömeg = $19,07 \text{ g} \pm 0,91 \text{ g}$

8. táblázat

Aktivitätsmegoszlás 72 órával a ^{90}Y -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után normál BALB/c egerekben

Átlagértékek $\pm$ SD (standard hiba)

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	$1,35 \pm 0,02$	$15,40 \pm 1,63$	$20,71 \pm 2,13$
Szív	$0,088 \pm 0,01$	$3,12 \pm 0,24$	$0,28 \pm 0,01$
Tüdő (2)	$0,142 \pm 0,01$	$8,23 \pm 1,05$	$1,17 \pm 0,20$
Vese (1)	$0,123 \pm 0,01$	$6,45 \pm 0,57$	$0,79 \pm 0,07$
Máj	$0,02 \pm 0,06$	$8,39 \pm 1,14$	$8,58 \pm 1,31$
Lép	$0,103 \pm 0,01$	$5,90 \pm 1,19$	$0,57 \pm 0,08$
Izom	$7,68 \pm 0,11$	$1,01 \pm 0,15$	$7,73 \pm 1,05$
Csont	$2,88 \pm 0,05$	$3,20 \pm 0,25$	$9,20 \pm 0,61$
Bőr	$2,88 \pm 0,05$	$3,97 \pm 0,49$	$11,42 \pm 1,36$
Gyomor-bél rendsz.	$2,86 \pm 0,18$	$2,90 \pm 0,65$	$4,06 \pm 0,93$
Vizelet	-	-	3,00
Széklet	-	-	11,08
Teljes			$78,62 \pm 2,63$

Egerek száma = 5

Átlagos tömeg = $19,21 \text{ g} \pm 0,27 \text{ g}$

Hasonló módon más biológiai féléletidő értékeket is meghatároztunk vagy kiszámoltuk az exponenciális csökkenés $t_{1/2}$ értékének kiszámolására szolgáló standard egyenlettel. Miután ezeket az értékeket meghatároztuk, a T_{ue} , T_{e1} , T_{e2} , A_1 , A_2 , és A -nak a változóit, melyeket a 9. és 10. táblázatban soroltunk fel, meghatároztuk mindegyik radioaktívan jelölt konjugátumnál, ezeknek a táblázatoknak a tetején megadott egyenleteket használva (kimenő változók). Ezeket az értékeket, valamint a következő táblázatokban bemutatott értékeket a Symphony spreadsheet-ben (Lotus Development Corp.) leírt programot (MR. Phillip Hagan, MS, Nuclear Medicine Service, VA Medical Center, La Jolla, CA 92161) alkalmazva számoltuk ki.

9. táblázat

BEEMENŐ VÁLTOZÓK

KIMENŐ VÁLTOZÓK

A_0 = beadott dózis T_{0e} = hatásos felvétel feleletideje

T_{e1} = az első komponens tényleges eltűnési feleletideje

T_p = a radionuklid feleletideje

T_{e2} = a második komponens tényleges eltűnési feleletideje

T_n = biológiai felvétel feleletideje

A_1 = az első komponens összesített aktivitása

T_{b1} = az első komp. biológiai eltűnésének feleletideje

A_2 = A második komponens összesített aktivitása

f_1 = az A_0 -nak a T_{b1} biológiai feleletidejével

A = teljes összesített aktivitás

rendelkező frakciója

$T_{0e} = T_0 * T_p / (T_0 + T_p)$ $A_1 = 1,44 * f_1 * A_0 * T_{e1} / (T_{0e} / T_0)$

f_2 = az A_0 -nak a T_{b2} biológiai feleletidejével

$T_{e1} = T_{b1} * T_p / (T_{b1} + T_p)$ $A_2 = 1,44 * f_2 * A_0 * T_{e2}$

rendelkező frakciója

$T_{e2} = T_{b2} * T_p / (T_{b2} + T_p)$ $A = A_1 + A_2$

S = Átlagos dózis/egység összesített aktivitás

Példa: A_1 a májnál $\sim 1,44 * 11,0008 * 1000 * 1000 * 63,2 * 1,00 = 10007,5$ μCi összesített aktivitás

AZ ÖSSZESÍTETT AKTIVITÁS (A) MÉRÉSÉRE HASZNALT BEMENŐ ÉS KIEMENŐ ÉRTÉKEK TÁBLÁZATA

	Tu (óra)	f1	f2	Tb1 (óra)	Tb2 (óra)	Tve (óra)	Tel1 (óra)	Tel2 (óra)	A1 (uci-hr)	A2 (uci-hr)	A (uci-hr)
Mellékvesék	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Hólyg. tart.	2,78E-04	1,000%	0,00%	4	0	2,78E-04	3,8	0,0	54,4	0,0	54
Gyomortart.	2,78E-04	6,650%	0,00%	1,5	0	2,78E-04	3,3	0,0	310,6	0,0	319
Vékonyb. tart	2,78E-04	6,650%	0,00%	3,58	0	2,78E-04	3,3	0,0	310,6	0,0	319
Üli. tart.	2,78E-04	6,650%	0,00%	4,5	0	2,78E-04	4,2	0,0	404,0	0,0	404
Üli. tart.	2,78E-04	6,650%	0,00%	4,2	0	2,78E-04	4,0	0,0	378,6	0,0	379
Vesék	2,78E-04	1,220%	0,00%	35	0	2,78E-04	23,0	0,0	404,8	0,0	405
Máj	2,78E-04	11,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	10007,5	0,0	10008
Pálsk	2,78E-04	2,100%	1,20%	30	1000	2,78E-04	20,8	63,2	627,9	1001,7	1720
Egyéb szerv. (telj.)	2,78E-04	0,000%									
Izom	2,78E-04	10,400%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	9461,7	0,0	9462
Ésírsejv.	2,78E-04	0,000%	0,00%	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Vér	2,78E-04	58,400%	32,22%	15	1000	2,78E-04	12,3	63,2	10319,2	29313,1	39632

	Tu (óra)	F1	F2	Tb1(óra)	Tb2(óra)	Tue(óra)	Tel1(óra)	Tel2(óra)	A1(pci-óra)	A2(pci-óra)	A(pci-óra)
Agy	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Salv	2,78E-04	0,5108	0,388	57	1000	2,78E-04	30,9	63,2	226,9	345,7	573
Petefészék	2,78E-04	0,5108	0,388	57	1000	2,78E-04	30,9	63,2	226,9	345,7	573
Hemipalmirny	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Csontváz(felj.)	2,78E-04	0,0008									
Kortikális cs.	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Thalokul. cs.	2,78E-04	9,1008	6,308	45	1000	2,78E-04	27,0	63,2	3536,8	5731,6	9268
Cs.velő (vörös)	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Cs.velő (sárga)	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Porc	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Bonyt alkostr.	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Bőr	2,78E-04	11,7708	0,008	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	10708,1	0,0	10708
Lép	2,78E-04	0,6108	0,408	39	1000	2,78E-04	24,7	63,2	217,1	363,9	581
Herék	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Rejsmirny	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Teljes test	2,78E-04	0,0008	0,008	1000							

10. táblázat

HEMENŐ VÁLTOZÓK

KIMENŐ VÁLTOZÓK

A_0 = kezdő dózis

$T_{w\text{-hatásos}}$ felvételi felületi dózis

T_p = a radionuklid felületidője

T_{e1} = az első komponens tényleges eltűnési felületidője

T_u = biológiai felvételi felületidője

T_{e2} = a második komponens tényleges eltűnési felületidője

T_{b1} = az első komp. biológiai eltűnés felületidője

A_1 = az első komponens összesített aktivitása

T_{b2} = a második komp. biológiai eltűnés felületidője

A_2 = a második komponens összesített aktivitása

f_1 = az A_0 -nak a T_{b1} biol. felületidőjével rend. frakciója A = teljes összesített aktivitás

f_2 = az A_0 -nak a T_{b2} biol. felületidőjével rend. frakciója $T_{ue} = T_u \cdot T_p / (T_u + T_p)$ $A_1 - 1,44 \cdot f_1 \cdot A_0 \cdot T_{e1} (T_{ue} / T_u)$

S = átlagos dózis/egység összesített aktivitás

$T_{e1} = T_{b1} \cdot T_p / (T_{b1} + T_p)$ $A_2 - 1,44 \cdot f_2 \cdot A_0 \cdot T_{e2}$

$T_{e2} = T_{b2} \cdot T_p / (T_{b2} + T_p)$ $A - A_1 + A_2$

Felida: A_1 a mérőnél $- 1,44 \cdot 9,0008 \cdot 1000 \cdot 1000 \cdot 60,2 \cdot 1,00 = 7795,5$ pCi összesített aktivitás

AZ ÖSSZESÍTETT AKTIVITÁS (A) MÉRÉSÉRE HASZNALT BEMENŐ ÉS KIMENŐ ÉRTÉKEK TÁBLÁZATA

	Tu (óra)	f1	f2	Tb1 (óra)	Tb2 (óra)	Tbe (óra)	Tel1 (óra)	Tel2 (óra)	A1 (µCi-óra)	A2 (µCi-óra)	A (µCi-óra)
Mellekvesék	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Hügyh. tart.	2,78E-04	1,0008	0,008	4	0	2,78E-04	3,8	0,0	54,2	0,0	54
Gyomortart.	2,78E-04	4,2208	0,008	1,5	0	2,78E-04	1,5	0,0	89,1	0,0	89
Vékonyb. tart	2,78E-04	4,2208	0,008	3,58	0	2,78E-04	3,3	0,0	201,7	0,0	202
Old. tart.	2,78E-04	4,2208	0,008	4,5	0	2,78E-04	4,2	0,0	255,5	0,0	255
Old. tart.	2,78E-04	4,220	0,008	4,2	0	2,78E-04	3,9	0,0	239,5	0,0	240
Vese	2,78E-04	1,1508	0,978	70	1000	2,78E-04	33,4	60,2	553,6	753,6	1307
Máj	2,78E-04	9,0908	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	7795,5	0,0	7795
Tüdők	2,78E-04	1,2008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	1039,4	0,0	1039
Egyéb szövet	2,78E-04	0,0008									
(telj.)											
Izom	2,78E-04	8,7208	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	7552,9	0,0	7553
Zsíranyag.	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Vér	2,78E-04	49,7708	25,908	13	1000	2,78E-04	10,8	60,2	7743,9	22433,7	30178

	Tu (óra)	F1	F2	Tb1 (óra)	Tb2 (óra)	Tue (óra)	Tel (óra)	Tel2 (óra)	A1 (pCi-óra)	A2 (pCi-óra)	A (pCi-óra)
Agy	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Szív	2,78E-04	0,5008	0,368	51	1000	2,78E-04	28,4	60,2	204,4	311,8	516
Petefészék	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Hemájmirigy	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Csontvel (vel.)	2,78E-04	0,0008									
Kortikális cs.	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Thyrekli. cs.	2,78E-04	11,8908	9,288	67	1000	2,78E-04	32,7	60,2	5604,4	8038,0	13642
Cs. velő (kérő)	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Cs. velő (sárga)	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Porc	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Égővel alaktör.	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Bőr	2,78E-04	15,6008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	13512,1	0,0	13512
Íz	2,78E-04	0,7608	0,568	60	1000	2,78E-04	31,0	60,2	330,0	485,1	815
Herek	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Rejtőmirigy	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Teljes test	2,78E-04	0,0008	0,008	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0

A 9. és a 10. táblázatból származó teljes összesített aktivitás értékeket (A) és a MIRD Pamphlet 11-ből (11. és 12., és 13. és 14. táblázat) származó S értékeket alkalmazva a felsorolt szöveteknél a radioaktívan jelölt konjugátumok mindegyikénél kiszámoltuk a sugárzás adszorbeált dózis becsült értékeket (15., 16., 17. és 18. táblázatok). A 19. táblázatból származó összes sugárzás dózis becslések meghatározásában az indium-jelölt konjugátumnál egy adott szerv saját dózisát a szomszédos szervekbe vagy szövetekben lévő aktivitás által létrehozott abszorbeált dózissal együtt összegezzük. Mindemellett az ittrium-jelölt konjugátumnak tulajdonítható sugárzás dózis becsült értékek kiszámolásában (20. táblázat) bizonyos értékek hiányoznak a felsorolt szöveteknél (például a mellékveséknél). Ez a kibocsátott 13 részecske rövidebb úthosszának köszönhető az emittált g részecskéhez képest, mely így egy jelentéktelen szomszédos szövetekből származó aktivitásszennyeződést eredményez, valamint az elsődleges biológiai megoszlási adatok hiányának köszönhető ezeknél a szöveteknél.

11. táblázat

5. abszorbeált dózis per egység összesített aktivitás, (rad/UCI-H)

Iridium-[111] Feleletidő 67,44 óra

Források								
Célszervek	Mellék.	Hígyóly.	Belsőszervek			Vese	Máj	Tüdő
			Gym. tart.	Vék.h. tart.	Uti tart.	Li tart.		
Mellékvesék	7,4E-03	5,7E-07	7,3E-06	4,4E-06	2,8E-06	1,3E-06	3,4E-05	1,5E-05
1,6E-06								
Máj	3,6E-07	4,3E-04	7,5E-05	8,0E-06	6,4E-06	2,0E-05	9,3E-07	5,2E-07
1,5E-07								
Csont	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								
Gym. bél r. (gym. fal)	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								
Gym. bél r. (vékonybél)	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								
Gym. bél r. (uli. fal)	2,8E-06	6,9E-06	1,1E-05	8,3E-04	3,3E-04	1,4E-05	8,6E-06	7,5E-06
7,4E-07								
Gym. bél. r. (lii. fal)	7,1E-07	2,2E-05	3,8E-05	2,4E-05	9,5E-06	4,7E-06	2,5E-06	7,3E-07
3,0E-07								
Vese	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								
Máj	1,5E-05	6,3E-07	5,9E-06	5,6E-06	7,8E-07	8,4E-07	1,2E-05	1,3E-04
7,7E-06								
Tüdő	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								
Cs. velő (vörös)	9,4E-06	5,3E-06	4,0E-06	1,1E-05	9,1E-05	1,3E-05	9,6E-05	4,1E-06
4,8E-06								

Forrásszervek										
Célszervek	Mellék.	Helytölt.	Bérendíszter				Vesék	Máj	Tüdők	Más szerv. (izom)
			Gyom.tart.	Vék.b.tart	III.tart.	III.tart.				
Egyéb szerv. (izom)	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
Perifészek	1,8E-06	2,3E-05	1,3E-06	3,3E-05	3,7E-05	6,4E-05	3,6E-05	1,4E-06	3,6E-07	6,3E-06
Hanyóalmirny	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
Bőr	1,8E-06	1,7E-06	1,4E-06	1,4E-06	1,4E-06	1,6E-06	1,8E-06	1,6E-06	1,8E-06	2,5E-06
Lép	2,0E-05	7,6E-07	3,1E-05	4,6E-06	4,2E-06	2,4E-06	2,8E-05	2,8E-05	7,1E-06	4,6E-06
Berek	1,4E-07	1,4E-05	1,8E-07	1,0E-06	9,8E-07	5,9E-06	3,4E-07	2,5E-07	3,8E-08	3,6E-06
Rejssmirny	4,7E-07	1,2E-08	3,5E-07	6,8E-08	7,5E-08	2,7E-08	2,0E-07	6,2E-07	2,6E-06	4,3E-06
Méh (nem terh.)	5,8E-06	4,9E-05	2,4E-06	2,9E-05	1,5E-05	2,1E-05	3,1E-06	1,2E-06	2,8E-07	7,4E-06
Teljes test	6,6E-06	6,2E-06	6,1E-06	7,3E-06	6,8E-06	6,9E-06	6,6E-06	6,6E-06	5,9E-06	5,6E-06

Irodalmi hivatkozás: Mird Pamphlet No. 11, 164. oldal

12. táblázat

8. abszorbeált dózis per egység összesített aktivitás, (rad/UCI-H)

Indium-[111] Feléleridő 67,44 óra

Forrásszervek								
Célszervek	Betefész.	Hasnyálm.	Csontrends.			Bőr	Lép	Herek
			Vörös cs.	kortikalis	trabekul.			
			velő.	csont	csont			
Mellékvesék	1,1E-06	2,6E-05	7,9E-06	3,9E-06	3,9E-05	2,4E-06	2,0E-06	1,4E-07
Hüvely. fal	2,1E-05	4,7E-07	2,4E-06	1,5E-06	1,5E-06	1,6E-06	4,7E-07	1,5E-05
Csont	3,8E-06	3,6E-06	1,2E-05	3,0E-05	2,6E-05	2,9E-06	2,9E-06	2,4E-06
Gyomr.-ból r. (gyom. fal)	2,4E-06	5,9E-05	3,2E-06	1,7E-06	1,1E-06	1,7E-06	3,0E-05	1,5E-07
Gyomr.-ból r. (vékonyból)	3,8E-05	5,5E-06	7,9E-06	2,3E-06	2,3E-06	1,5E-06	4,2E-06	1,2E-06
Gyomr.-ból r. (uli. fal)	3,7E-05	6,6E-06	6,4E-06	2,2E-06	2,2E-06	1,4E-06	3,8E-06	1,1E-06
Gyomr.-ból r. (lii. fal)	4,8E-05	1,7E-06	9,0E-06	3,2E-06	3,2E-06	1,5E-06	1,9E-06	8,3E-06
Veseek	2,9E-06	1,9E-05	6,8E-06	2,7E-06	2,7E-06	2,0E-06	2,8E-05	1,7E-07
Máj	1,7E-06	1,3E-05	2,9E-06	2,0E-06	2,0E-06	1,7E-06	3,0E-06	1,2E-07
Műtök	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

Forrásszervek										
	Petevész.	Hastűzlm.	Csontrends.			Bőr	Ízép	Herek	Pajzsmir.	Teljes test
			Vörös cs.	kortikális	trakeul.					
Os. velő.			velő.	csont	csont					
Os. velő (vörös)	1,3E-05	6,6E-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
Égőv szőr. (ízom)	6,3E-06	5,7E-06	3,8E-06	3,2E-06	3,2E-06	2,5E-06	4,6E-06	3,6E-06	4,3E-06	5,6E-06
Petefészkek	1,0E-02	1,0E-06	7,7E-06	2,2E-06	2,2E-06	1,4E-06	1,7E-06	0,0E+00	2,5E-08	7,0E-06
Hastűzlmirigy	1,5E-06	1,6E-03	4,9E-06	3,1E-06	3,1E-06	1,7E-06	6,1E-05	2,1E-07	3,0E-07	7,8E-06
Bőr	1,4E-06	1,3E-06	2,0E-06	2,3E-06	2,3E-06	3,7E-05	1,5E-06	4,9E-06	2,5E-06	3,7E-06
Ízép	1,6E-06	6,2E-05	2,7E-06	2,0E-06	2,0E-06	1,7E-06	9,1E-04	8,9E-08	3,5E-07	6,8E-06
Herek	0,0E+00	2,1E-07	1,0E-06	1,5E-06	1,9E-06	3,4E-06	2,0E-07	3,6E-03	3,3E-09	4,9E-06
Pajzsmirigy	2,5E-08	4,5E-07	2,2E-06	2,4E-06	2,8E-06	2,4E-06	3,4E-07	3,3E-09	5,8E-03	5,2E-06
Méh (nem teljes)	6,5E-05	1,9E-06	6,7E-06	1,4E-06	1,8E-06	1,2E-06	1,2E-06	0,0E+00	2,4E-08	7,8E-06
Teljes test	7,7E-06	7,5E-06	6,4E-06	5,9E-06	5,9E-06	3,8E-06	6,6E-06	5,6E-06	5,3E-06	5,8E-06

Iródelmi hivatkozás: Mird Pamphlet No. 11, 165. oldal

13. táblázat

5. abszorbeált dózis per egység összesített aktivitás, (rad/UCI-H)

Ittrium-[90] Féléletidő 64 óra

Forrásszervek										
Célszervek	Mellék.	Higyhóly.	Belsőrendszer				Veseék	Máj	Nyakék	Más szerv. (izom)
			Gyom. tart.	Vék.b. tart.	Uti. tart.	Uti. tart.				
Mellékvesék	1,4E-01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Higyh. fal	0,0	5,0E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Csont	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gyom-bél r. (gyom. fal)	0,0	0,0	4,0E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gyom-bél r. (vékonybél)	0,0	0,0	0,0	2,5E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gyom-bél r. (uli. fal)	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gyom-bél r. (lii. fal)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4E-03	0,0	0,0	0,0	0,0
Veseék	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,4E-03	0,0	0,0	0,0
Máj	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1E-03	0,0	0,0
Nyakék	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0E-03	0,0
Cs.velő (vörös)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Forrásszervek										
Célszervek	Mellékv.	Hüvely.	Bérendszer				Vese	Máj	Tüdő	Más szerv. (izom)
			Gym.tart.	Vék.b.tart.	Uti.	Li.				
		tart.			tart.	tart.				
Egyéb szerv. (izom)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1E-05
Perifászervek	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Hastálmirigy	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bőr	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lég	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Herek	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dajsmirigy	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Méh (nem terh.)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Teljes test	2,8E-05	3,2E-06	8,5E-05	2,3E-05	1,4E-05	1,7E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05

Irodalmi hivatkozás: Mird Pamphlet No.11, 144. oldal

一、
 二、
 三、
 四、
 五、
 六、
 七、
 八、
 九、
 十、

S. abszorbeált dózis per egység összesírt aktivitás, (rad/UCI-H)

Ittium-190
Faleleido
64 ora

[illegible]

Forrásszervek

Célszervek	Reféssz.	Hastűlín.	Csontvázszerv			Bőr	Lép	Herek	Pajzsmir.	Tályes test
			Vörös cs. velő.	Kortikális csont	trabek. csont					
(3. velő (vörös)	0,0	0,0	8,6E-04	3,3E-05	5,7E-04	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Égész szor. (izom)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Refésszerv	1,8E-01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Hastűlínirány	0,0	2,0E-02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Bőr	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6E-04	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Lép	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1E-02	0,0	0,0	2,8E-05
Herek	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,7E-02	0,0	2,8E-05
Pajzsmirány	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,9E-02	2,8E-05
Méh (nem testes)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Tályes test	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05	2,8E-05

Irodalmi hivatkozás: Mird Pamphlet No.11, 145. oldal

5. 1991-1992

SUGARZAS-ABERDEEN DOGS (HAD = A * S)

INDEXED
SERIALIZED
67, 44 ORA

Forrás: Zalai

Forrásszervek										
	Melléklet	Hozzájárulás	Belső rendszer				Vessék	Véj	Tűzök	Más szerv. (12x6)
			Gyom. tart.	Véj. b. tart	Uti tart.	Uti tart.				
Célszervek		tart.								
Mellékletek	0,0E+00	3,1E-05	1,0E-03	1,4E-03	1,1E-03	4,9E-04	1,4E-04	1,5E-01	1,3E-01	2,4E-01
Hozzájárulás fal	0,0E+00	2,4E-02	1,1E-04	2,5E-03	2,6E-03	7,6E-03	3,8E-04	5,2E-03	2,6E-04	2,7E-04
Gyom. tart. r. (gyom. tart.)	0,0E+00	4,7E-04	1,1E-03	6,7E-03	2,2E-02	1,1E-02	3,5E-03	5,0E-02	1,0E-02	2,4E-01
Gyom. tart. r. (uti. tart.)	0,0E+00	3,8E-04	1,5E-03	2,6E-02	1,3E-01	5,3E-03	3,5E-03	7,5E-02	1,3E-03	2,5E-01
Gyom. tart. r. (111. tart.)	0,0E+00	1,2E-03	5,3E-04	7,6E-03	3,8E-03	1,8E-03	1,0E-01	7,3E-03	5,2E-04	2,6E-01
Vessék	0,0E+00	4,6E-05	1,5E-03	2,5E-03	3,4E-03	1,1E-03	2,1E-01	1,2E-01	4,6E-03	2,2E-01
Véj	0,0E+00	3,4E-05	8,3E-04	1,8E-03	3,2E-03	3,2E-04	4,9E-03	1,3E+00	1,3E-02	1,7E-01
Tűzök	0,0E+00	4,5E-06	7,3E-04	2,4E-04	3,4E-04	9,8E-05	1,0E-05	7,8E-02	2,4E-01	2,1E-01
Egyéb szervek										
Tűz	0,0E+0,0	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
Tűzszervek	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

Forrásszervek										
	Mellék.	Hozzájár.	Béltérítve			Veseék	Máj	Tüdők	Más szerv. (izom)	
			Gyom. tart.	Vér. b. tart.	III. tart.					
Célszervek		tart.								
Vér	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
Agy	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
Szív	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
Belsőszervek	0,0E+00	1,3E-03	1,8E-04	1,1E-02	1,5E-02	2,4E-02	1,5E-03	1,4E-02	6,2E-04	2,8E-01
Hemájánirigy	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
Csontrendszer										
Kötőszövet	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
Tracheális csont	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
Csontvelő (vörös)	0,0E+00	2,9E-04	5,6E-04	3,5E-03	3,7E-03	4,6E-03	3,9E-03	4,1E-02	8,3E-03	2,6E-01
Csontvelő (sárga)	0,0E+00	2,9E-04	5,6E-04	3,5E-03	3,7E-03	4,6E-03	3,9E-03	4,1E-02	8,3E-03	2,6E-01
Porc	0,0E+00	1,3E-04	3,2E-04	1,0E-03	1,2E-03	1,6E-03	1,5E-03	2,9E-03	6,5E-03	1,6E-01
Egyéb alkotórészek	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
Lég	0,0E+00	4,1E-05	4,4E-03	1,5E-03	1,7E-03	9,1E-04	1,1E-02	2,8E-02	1,2E-02	2,3E-01
Bőr	0,0E+00	7,6E-04	2,5E-05	3,2E-04	4,0E-04	2,2E-03	1,4E-04	2,5E-03	6,7E-05	1,8E-01

Forrásszervek										
Célszervek	Mellék.	Híjítóly.	Béltérdezer				Veeék	Máj	Tveák	Más szov.
			tart.	Gyom. tart.	Vér.b. tart.	Uli tart.				
Pajsmúriy	0,0E+00	6,5E+07	4,9E-05	2,2E-05	3,0E-05	1,0E-05	8,1E-05	6,2E-03	4,5E-03	2,1E-01
Mén (nem tartas)	0,0E+00	3,4E-04	8,6-03	2,3E-03	2,7E-03	2,6E-03	2,7E-03	6,6E-02	1,0E-02	3,7E-01
Teljes test	0,0E+00	2,7E-03	3,4E-04	9,2E-03	6,1E-03	8,0E-03	1,3E-03	1,2E-02	4,8E-04	2,8E-01

Irodalmi hivatkozás: Mird Pamphlet No.11, 164. oldal

16. táblázat

SUGÁRZÁS-ABSORBEÁLT DÓZIS (RAD = A * S)

INDIUM-111] FÉLÉLETIDŐ 67,44 ÓRA

Röntgenszervek								
Csőszervek	Petérfesz.	Hanyólm.	Csontrendszer			Bőr	Ízq	Herek
			Vörös cs.	kontinális trabekul.				
			velő	csont	csont			
Mellérmesék	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,6E-02	2,6E-02	1,2E-02	0,0E+00
Hanyólyag fal	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,4E-02	1,7E-02	2,7E-04	0,0E+00
Gyom-bél r. (gyom. fal)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,6E-02	1,9E-02	1,7E-02	0,0E+00
Gyom-bél r. (vékonyb.)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,1E-02	1,6E-02	2,4E-03	0,0E+00
Gyom-bél r. (vli fal)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,0E+00	1,5E-02	2,2E-03	0,0E+00	0,0E+00
Gyom-bél r. (lii. fal)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,9E-02	1,6E-02	1,3E-03	0,0E+00
Veseék	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,5E-02	2,1E-02	1,6E-02	0,0E+00
Méj	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,9E-02	1,8E-02	1,7E-03	0,0E+00
Thyrik	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,8E-02	2,0E-02	4,0E-03	0,0E+00
Egyéb szervek								

Forrásszervek										
Célsszervek	Pefész.	Hasyálm.	Csontrendszer			Bőr	Táp	Herek	Pajzsmit.	Tajjes
			Vörös cs. velő	kortikális csont	trabekul. csont					
										test
Izom	0,0E+0 0	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Zajszövet	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
Vér	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
Agy	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Szív	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-03	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Petefészek	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
Hasyálmirigy	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,9E+02	1,9E-02	3,5E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Csontrendszer										
Kortikális csont	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
Trabekuláris csont	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
Csontvelő (vörös)	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
Csontvelő (sárga)	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
Porc	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

Forrásszervek								
Célszervek	Retrofesz.	Hasonyalm.	Csontrendszer			Bőr	Lép	Herek
			Város cs.	kortikális csont	trabekul.			
			való	csont	csont			test
Égőfél alkotórészek	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,4E-01	3,1E-02	1,7E-03	0,0E+00
Bőr	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,1E-02	4,0E-01	8,7E-04	0,0E+00
Lép	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,9E-02	1,8E-02	5,3E-01	0,0E+00
Herek	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,8E-02	3,6E-02	1,2E-04	0,0E+00
Pajzsmirig	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,6E-02	2,6E-02	2,0E-04	0,0E+00
Méh (nem testies)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,7E-02	0,0E+00	7,0E-04	0,0E+00
Teljes test	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	5,5E-02	4,1E-02	3,8E-03	0,0E+00

17. táblázat

SUGÁRZÁS-ABSORBEÁLT DOZIS (RAD = A * S)

ITERIUM-190] FÉLFÉNYIDŐ 64 ÓRA

Forrásszervek										
Célszervek	Mellék.	Hígyóköly.	Béltörőrszer				Vesék	Máj	Nyakék	Egyéb
			Gym. tart.	Vék.b. tart.	Uti. tart.	Ili. tart.				
Mellékvesék	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
Hígyókölyeg fal	0,0E+00	2,7E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Gym.bél r. (gym. fal)	0,0E+00	0,0E+00	3,6E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Gym.bél r. (vékonyb.fal)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	5,0E+01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Gym.bél r. (uli. fal)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,1E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Gym.bél r. (Ili. fal)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,8E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Vesék	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	8,4E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Máj	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	8,6E+00	0,0E+00	0,0E+00
Nyakék	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,1E+00	0,0E+00
Egyéb szervek										
Törm	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	2,7E+00

Forrásszervek										
	Kellék.	Helytől.	Bérendszet				Vessék	Kéj	Tízék	Egyéb
			Gym.tart.	Vék.b.tart	Üli.tart.	Üli.tart.				
Célszervek		tart.								szöv.
Zsírsvövet	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	2,7E+00
Vér	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	2,7E+00
Agy	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	2,7E+00
Szív	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	2,7E+00
Beférőszek	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
Hasnyálmirigy	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
Csontrendszer										
Kartilágás csont	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
Tracheáláris csont	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
Csontvelő (vörös)	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
Csontvelő (sárga)	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
Porc	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
Egyéb alkotórészek	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
Bőr	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

Forrásszervek										
Célszervek	Vallékv.	Hígyfóly.	Bélnszerve				Vesék	Máj	Tívkék	Egység
			Gym. tart.	Vél.b. tart.	Uti tart.	Idi tart.				
Lép	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
Herék	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
Bejssmlírvy	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
Mét (nem tartas)	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
Rejss test	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

18. táblázat

SUGÁRZÁS-ABSZORBÁLT DÓZIS (RAD = A * S)

ITTRION-[90] FÉLELEPIDŐ 64,00 ÓRA

Forrásszervek								
Élőszervek	Retezfész.	Hagyalm.	Csontrendszer.			Bőr	Lép	Herek
			Yonis cs.	kortikális	trabek.			
			velő.	csont	csont			
Mellékvesék	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Belsőh. fal	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Gyomr-bél r. (gyom. fal)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Gyomr-bél r. (vékonyb.)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Gyomr-bél r. (uli fal)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Gyomr-bél r. (III. fal)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Veseek	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Méj	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Tüdők	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Egyéb szervek								

Forrászerek								
Célszerek	Pétefer.	Hasyrál.	Csontváz.			Bőr	Táp	Herek
			Varrs cs. velő.	kortikális csont	trabek. csont			
Izm	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Zsírzsövet	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Vér	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Agy	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Szív	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Petéeféslek	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Hasyrártígy	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Csontvázszerv								
Kortikális csont	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,1E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Trabekuláris csont	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,1E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Csontvelő (vörös)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	7,8E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Csontvelő (sárga)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	7,8E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Barc	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,1E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Forrásszervek										
Célszervek	Petefész.	Hagyalm.	Csontkeresz.			Bőr	Lép	Herék	Pajzsmitr.	Teljes test
			Vörös cs.	Kortikális	trabek.					
			velő.	csont	csont					
Égővő alkotórészek	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,1E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Bőr	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
Lép	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
Herék	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
Pajzsmitr.	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
Néh (nem testes)	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
Teljes test	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

19. táblázat

Sugárzás dozimetriás becslések, melyek egy „átlagos” emberben (70 kg) egységesen szétosztatott indium-[111]-gyel jelölt 2B8-MX beadásából származnak, és az injekció beadása után 72 óra elteltével mért állati megoszlási adatokon alapulnak

Aktivitás mennyisége =		1000 μ Ci/beteg dózis	
	RAD		RAD
Mellékvesék	0,493	Petefészkek	0,387
Húgyhólyagfal	0,348	Hasnyálmirigy	0,362
Gyomorfal	0,412	Csontváz	
Vékonybél	0,434	Kort. csont	0,474
Ul. bélfal	0,533	trab. csont	0,474
Ll. bélfal	0,505	Csontvelő (vörös)	0,602
Vesék	0,625	Csontvelő (sárga)	0,602
Máj	1,533	Porc	0,474
Tüdők	0,582	Egyéb alkotórészek	0,474
Egyéb szövetek		Bőr	0,564
Izom		Lép	0,854
Zsírszövet		Herék	0,239
Vér		Pajzsmirigy	0,276
Agy		Méh (nem terhes)	0,473
Szív		Teljes test	0,417

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

A számításokat egy Spreadsheet Template in Symphony (Lotus Development Corporation) segítségével hajtottuk végre, melyet Phillip L. Hagan alkotott meg (MS Nuclear Medicine Service, VA Hospital San Diego, CA 92161).

19. táblázat

Sugárzás dozimetriás becslések, melyek egy „átlagos” emberben (70 kg) egységesen szétoszlatott ittrium-[90]-nel jelölt 2B8-MX beadásából származnak, és az injekció beadása után 72 óra elteltével mért állati megoszlási adatokon alapulnak

Aktivitás mennyisége =		1000 μ Ci/beteg dózis	
	RAD		RAD
Mellékvesék	0,000	Petefészkek	0,000
Húgyhólyagfal	0,271	Hasnyálmirigy	0,000
Gyomorfal	0,356	Csontváz	
Vékonybél	0,504	Kortikális csont	3,138
Ul. bélfal	1,150	Trabekuláris csont	3,138
Ll. bélfal	1,772	Csontvelő (vörös)	7,776
Vesék	8,366	Csontvelő (sárga)	7,776
Máj	8,575	Porc	3,138
Tüdők	2,079	Egyéb alkotórészek	3,318
Egyéb szövetek		Bőr	10,269
Izom	2,716	Lép	8,965
Zsírszövet	2,716	Herék	0,000
Vér	2,716	Pajzsmirigy	0,000
Agy	2,716	Méh (nem terhes)	0,304
Szív	2,716	Teljes test	1,854

Hivatkozás: MIRD J. of Nucl. Med./Suppl. 1, 2/68

„A Schema for Absorbed-dose Calculation for Biologically Distributed Radionuclides”

A számításokat egy Spreadsheet Template in Symphony (Lotus Development Corporation) segítségével hajtottuk végre, melyet Phillip L. Hagan alkotott meg (MS Nuclear Medicine Service, VA Hospital San Diego, CA 92161).

II. Eredmények

A. In vitro vizsgálatok a 2B8-cal és a 2B8-MX-DTPA-val

1. A 2B8 anti-CD20 antitest előállítása és jellemzése

Az összesen kilenc fúzió három olyan antitesteket termelő hibridómát eredményezett, melyek hatásosan versengtek a radioaktívan jelölt Coulter B1 antitesttel. Mindegyik esetben a hibridómát egy 24 mérőhelyes lemezre szélesztettük. Az első kettő, 3. és 4. fúzióból izolált antitestet izotípusát meghatároztuk, és mindkettőről megállapítottuk, hogy IgM. A harmadik antitestről, melyet az 5. fúzió termelt, és 2B8-nak neveztük el, meghatároztuk, hogy IgG1 kappa izotípusú, és ezt választottuk ki a további vizsgálatokhoz. A 2B8.H11 klónt szaporítottuk, és a hosszan tartó tároláshoz folyékony nitrogénbe helyeztük. A 2B8.H11-t szubklónoztuk, hogy előállítsuk a 2B8.H11.G3-t, és ismét szubklónoztuk, hogy létrehozzuk a 2B8.H11.G3.G9 klónt. Ezt a klónt szaporítottuk a további vizsgálatokhoz, és az antitestet protein A affinitás kromatográfiával tisztítottuk.

A jelöletlen 2B8, B1 és Leu 16-t és radioaktívan jelölt Coulter B1-t alkalmazó kompetíciós mérőeljárásokkal kimutattuk, hogy a 2B8 hatásosabban volt képes meggátolni a B1 kötődését a CD20-hoz, mint az azonos koncentrációjú B1 vagy Leu 16 (1. ábra). Hasonló eredményeket kaptunk (adatokat nem mutatunk be) a FITC-konjugált 2B8-t, a natív B1-t és az UPC-10 és S-003 irreleváns antitesteket (IgG 2a illetve 1 izotípusok) alkalmazó kompetíciós mérőeljárásban.

A 2B8 és B1 antitestek közvetlen kötődését a CD20 antigénhez CD20-pozitív SB sejteket és CD20-negatív HSB sejteket alkalmazó FACS analízissel hasonlítottuk össze. A 2. ábrán bemutatott

eredmények azt mutatják, hogy az antitestek hasonló mennyiségénél a B1 helyett inkább a 2B8 kötődött az SB sejtekhez. Nem figyeltünk meg szignifikáns kötődést az irreleváns antitesteknél. Csak háttér fluoreszcenciát figyeltünk meg mindegyik HSB sejtekkel alkalmazott reagensnél. Ezek az eredmények igazolják a 2B8 CD20 antigénnel való kölcsönhatásának specifitását, és azt sugallják, hogy lehetséges, hogy a 2B8-nak nagyobb az affinitása a sejtfelszíni antigén iránt, mint a B1-nek.

Abból a célból, hogy meghatározzuk a 2B8 látszólagos affinitását, a tisztított antitestet ^{125}I -vel radioaktívan jelöltük, és a jelölt antitestet növekvő koncentrációban antigén-pozitív SB sejtekkel inkubáltuk; a sejthez kapcsolódó radioaktivitást egy egyórás inkubációs időszak után határoztuk meg (3. ábra). Az eredmények azt mutatják, hogy a 2B8 antitest a CD20 antigénhez egy $4,3 \times 10^{-9}$ M látszólagos affinitási konstanssal kötődik.

A humán normál perifériás vér limfocitákkal végzett áramlásos citometriás vizsgálatok azt jelezték, hogy a 2B8 specifikus a B-sejtekre, és nem reagál más limfocita típusokkal (például T-sejtekkel, monocitákkal, makrofágokkal). A FITC-jelölt 2B8-t összehasonlítottuk a B1-FITC-cel és a Leu 16-FITC-cel a humán limfocitáknak ugyanazt a populációját alkalmazva. Az eredmények, melyeket a 21. táblázatban mutatunk be, azt jelzik, hogy a 2B8 a perifériás vér limfocitáknak hozzávetőleg 14 százalékaival reagál, szemben a Leu 16-tal, mely hozzávetőleg 12%-kal reagál, és szemben a B1-gyel, mely hozzávetőleg 11%-kal reagál. Egy másik limfocita marker (CD-19) alapján a limfocita populáció 11 és 14 százalék között volt. Végezetül, amikor humán perifériás vér limfocitákat inkubáltunk a 2B8-cal és vagy a B1-gyel vagy a Leu

16-tal, és CD19 markerrel (Becton/Dickinson) kontrasztfestettük, a B-limfociták kétszeresen festődött populációja 9% volt a 2B8-cal, és 10 % volt a B1-gyel vagy Leu 16-tal. Ezek az eredmények e reagensek hasonlóságát igazolják.

21. táblázat

A 2B8 humán perifériás vér limfocitákhoz való kötődésének
összehasonlítása más B- és T-limfocita-specifikus reagensekkel

Antitest-marker

A. Egyszeres festés **CD45-tel szűrt limfociták százaléka**

Semmi (autofluoreszcencia)	0
B1-FITC (Coulter Immunology, IgG2a,k)	11
Leu 16-FITC (Becton Dickinson, IgG1,k)	12
2B8-FITC (EDEC, IgG1,k)	14
B72.3-FITC (IgG1k irreleváns kontroll)	4
anti-CD4-FITC (Coulter Immunology)	37
anti-CD3-FITC (Becton-Dickinson)	59
anti-CD19-RPE (Becton Dickinson)	11
anti-CD19-FITC (Becton Dickinson)	14

B. Kettős festés:

B1-FITC/anti CD19-RPE	10
Leu 16-FITC/anti CD19-RPE	10
2B8 FITC/anti CD19-RPE	9
anti-CD19 FITC/anti CD19-RPE	13
B1-FITC/anti Hu Ig RPE	10
2B8-FITC/anti Hu Ig RPE	10
Leucogate Simultest	99

A radioaktívan jelölt sejtes CD20 antigén 2B8-cal vagy B1-gyel végzett immunprecipitációja hozzávetőleg 33 és 35 kDa molekulatömegű megkülönböztethetetlen kettős fehérje precipitációját eredményezte (adatokat nem mutatunk be).

2. A 2B8-MX-DTPA előállítása és jellemzése

A 2B8-MX-DTPA konjugátumot úgy állítottuk elő, hogy az antitestet az izotiocianáto-benzil-3-metil-dietilén-triamin-pentaecetsav 4:1 arányú moláris feleslegével reagáltattuk (4). Jellemzően 1-2 mól MX-DTPA kelátot vittünk be a 2B8 antitest egy móljára nézve. Ahogy a 4. ábrán bemutatott eredmények mutatják, a 2B8-MX-DTPA konjugátum nem mutatott látható immunreaktivitáscsökkenést, szemben a natív 2B8-cal, míg a natív és konjugált 2B8 antitest is látszólag azonos B1 inhibíciós profilt fejezett ki; az IC50 érték a 2B8-nál és a 2B8-MX-DTPA-nál hozzávetőleg 3 µg/ml illetőleg 4 volt. Ezeket az eredményeket ¹²⁵I-jelölt B1 antitest alkalmazásával kaptuk egy teljes sejt radioimmunoassayvel, melyet SB-sejteket alkalmazva hajtottuk végre. Hasonló eredményeket kaptunk a 2B8-at vagy 2B8-MX-DTPA-t alkalmazva a ¹²⁵I-jelölt 2B8 SB sejtekhez való kötődésének inhibitoraként, és a 2B8 és MX-STPA konjugátuma is gátolta a ¹²⁵I-2B8 SB sejthez való kötődését hozzávetőleg 3-4 µl/ml koncentrációnál (adatokat nem mutatunk be).

A natív 2B8 antitest és a 2B8-MX-DTPA konjugátum in vitro stabilitásának mérésére a mintákat normál sóoldatban vagy 10 mM glicin-HCl-t tartalmazó normál sóoldatban (pH=6,8) inkubáltuk 4°C-on és 30°C-on 12 héten át, és az alikvotokat hetenként kiértékeltek a következő mérőeljárásokat alkalmazva: immunreaktivitás mérése teljes sejt enzimmunoassay-vel, SDS-PAGE redukáló és

nem redukáló körülmények között, és izoelektromos fókuszáló gél elektroforézis. Míg az immunreaktivitási assay-k nem mutattak ki az antitestminták antigénfelismerésében csökkenést egyik inkubációs hőmérsékleten sem (5. ábra), az antitest izoelektromos fókuszálási tartománya (pH=7,30-8,40 a 0. héten), mely 4°C-on stabil volt, 0,2 pH egység csökkenést mutatott 30°C-on a hatodik hét után (22. táblázat). Ez az eredmény azonban nem egyértelmű, mivel ez az assay kísérleti hibájának határán áll.

22. táblázat

2B8/2B8-MX-DTPA PI összefoglalás

Hét	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	7,21-8,13	7,20-8,27	7,27-8,27	7,20-8,12	5,85-8,27	5,85-8,27	5,85-8,27	5,85-7,95
7	7,39-8,32	7,17-8,32	7,35-8,25	7,17-8,47	6,02-8,25		5,95-8,32	5,95-8,32
8	7,33-8,29	7,26-8,36	7,40-8,36		5,86-8,36	5,86-8,36	5,86-8,36	5,86-8,21
9	7,49-8,53	7,26-8,45	7,41-8,45	7,34-8,30	5,93-8,45	5,93-8,45	5,93-8,45	5,93-8,23
10	7,26-8,27	7,19-8,27	7,26-8,27	7,19-8,27	5,95-8,35	5,95-8,35	5,88-8,35	5,95-8,13
11	7,40-8,27	7,18-8,27	7,40-8,35	7,18-8,13	5,93-8,35	5,93-8,27	5,93-8,27	5,93-8,13
12	7,26-8,18	7,04-8,18	7,26-8,18	7,19-8,11	7,19-8,26	5,90-8,18	5,90-8,26	5,90-8,18

A natív 2B8 és 2B8-MX-DTPA mintáit eltérő pufferekben formuláztuk, és vagy 40 vagy 30°C-on inkubáltuk 12 héten át. Ezalatt az időszak alatt különböző assay-eket hajtottunk végre, ezek közé tartoztak az izoelektromos pont meghatározások. A fentebb bemutatott értékek a natív és a konjugált antitest izoelektromos pont tartományát mutatják be, mely antitesteket mindegyik hőmérsékleten mindegyik készítményben, és a tizenkét hét mindegyikében inkubáltuk a stabilitási vizsgálat alatt.

A fejléc feliratait: 2B8 4 SAL: 4°C-on sóoldatban inkubált 2B8; 2B8 30 SAL: 30°C-on sóoldatban inkubált 2B8; 2B8 4 GLY: 4°C-on 10 mM glicint tartalmazó normál sóoldatban inkubált 2B8; 2B8 30 GLY: 30°C-on 10 mM glicint tartalmazó normál sóoldatban inkubált 2B8; 2B8-MX 4 SAL: 4°C-on sóoldatban inkubált 2B8-MX-DTPA (konjugátum); 2B8-MX 30 SAL: 30°C-on sóoldatban inkubált konjugátum; 2B8-MX 4 GLY: 4°C-on 10 mM glicint tartalmazó normál sóoldatban inkubált konjugátum; 2B8-MX 30 GLY: 30°C-on 10 mM glicint tartalmazó normál sóoldatban inkubált konjugátum.

Végezetül, nem redukáló SDS-PAGE-t alkalmazva 30°C-on az antitestminták nagy molekulatömegű aggregátumokat mutattak egy hét múlva (23. táblázat).

A gélek denzitometriás analízise azt mutatta, hogy az aggregátumok a minták 8-17%-ában mutatkoznak. (23. táblázat). Minde mellett, amikor ezeket a mintákat redukáló SDS-PAGE-vel elemeztük, nem találtuk meg a nagy molekulatömegű típus bizonyítékát, mely az antitest aggregátumok 30°C-on történő képződését sejteti. Az immunreaktivitás csökkenése megint nem volt megfigyelhető.

23. táblázat

A 2B8 in vitro stabilitása

A: A nem redukáló SDS gélek denzitometriás vizsgálata

Minta	Százalék		
	Nagy molekulatömegű	Monomer	Kis molekulatömegű
Referencia	0	100,00	0
12 hét/4°C/sóoldat	0	95,42	4,58 *
12 hét/4°C/glicin	0	100,00	0
12 hét/30°C/sóoldat	7,63	83,34	9,03
12 hét/30°C/glicin	16,70	72,11	11,18

B. Redukáló SDS-gélek denzitometriás vizsgálatai

Minta	Százalék		
	Nagy molekulatömegű	Monomer	Kis molekulatömegű
Referencia	0	100,00	0
12 hét/30°C/sóoldat	0	100,00	0
12 hét/30°C/glicin	0	10,00	0

Ezalatt a stabilitási vizsgálat alatt a 4°C-on és 30°C-on inkubált 2B8-MX-DTPA mintáit is teszteltük a radioaktív fém beépülésére ^{90}Y -t alkalmazva. A mintákat a 4., 8. és 12 héten mértük a 90%-nál nagyobb ^{90}Y -ra, tekintet nélkül az inkubációs hőmérsékletre.

Végül egy különálló vizsgálatban a 4°C-on és 30°C-on 10 héten át inkubált 2B8-MX-DTPA alikvotjait radioaktívan jelöltük ^{111}In -nel, és a szöveti biológiai megoszlást BALB/c egerekben vizsgáltuk meg. Mindkét inkubációs hőmérsékletnél az előállított konjugátum hasonló biológiai megoszlást mutatott (adatokat nem mutatunk be). Sőt a kapott adatok hasonlóak voltak azokhoz a bi-

ológiai megoszlási adatokhoz, melyeket BALB/c egerekben 4°C-on tárolt ^{111}In -jelölt konjugátumokat alkalmazva kaptunk (lásd lentebb).

Úgy találtuk, hogy a radioaktív jelölési eljárás a ^{111}In -nél és az ^{90}Y -nál is reprodukálható volt. Jellemzően az ^{111}In -nél >95% és az ^{90}Y -nál >90% beépülést kaptunk. A ^{111}In - és ^{90}Y -jelölt konjugátumok specifikus aktivitása szokásosan 2-3 mCi/mg antitest illetőleg 10-15 mCi/mg antitest tartományba esett. A ^{111}In - és ^{90}Y radioaktív jelölési eljárás kezdeti kifejlesztésekor a komplexbe nem vitt radioizotópokat eltávolítottuk a radioaktívan jelölt 2B8-DTPA-ból HPLC gélpermeációs kromatográfiát alkalmazva. A későbbi kísérletekben az indium-jelölt konjugátum HPLC tisztítását kihagytuk, mivel igen nagy radioaktivitás-beépülést kaptunk ezzel az izotóppal (>95%).

A 2B8-MX-DTPA ^{111}In - és ^{90}Y -jelölt készítményeinek az immunreaktivitását Lindmo eljárásával (3) elemeztük. A ^{111}In -nel jelölt 2B8-MXDTPA-ról úgy találtuk, hogy 100%-osan immunreaktív (6. ábra), és a ^{90}Y -jelölt konjugátum esetében 60%-os immunreaktivitást határoztunk meg (adatokat nem mutatunk be).

3. A ^{111}In - és ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA jellemzése

A ^{90}Y -jelölt konjugátummal végzett elővizsgálatok bebizonyították, hogy jelentős antitest-lebomlás és az immunreaktivitás elvesztése fordul elő 10 mCi/mg antitestnél nagyobb specifikus aktivitásnál. Ezért egy készítményt fejlesztettünk ki, hogy minimálisra csökkentsük a radiolízis hatásait. Bár számos kis molekulatömegű szabadgyökös mentesítőanyagot értékeltünk ki és hatásosnak találtunk, a humán szérumalbumin (HSA) nagy koncentrá-

ciói voltak a leghatásosabbak az antitest épségének és immunreaktivitásának megőrzésében (7-9. ábra).

A ^{90}Y -jelölt antitestet 75 mg/ml HSA-t tartalmazó 1 X PBS-ben (pH=7,4) formuláztuk; dietilén-triamin-pentaecetsavat (DTPA) is adtunk hozzá 1 mM végkoncentrációban, hogy biztosítsuk, hogy valamennyi ^{90}Y , mely az antitestről elveszhetett, keláttá alakuljon. A 2B8-MX-DTPA degradációját, mely 14,6 mCi/mg specifikus aktivitásig radioaktívan jelölt, a 0. és 48. órában kiértékeltük SDS-PAGE-t és autoradiográfiát alkalmazva. A 8. és 9. ábra azt mutatja, hogy a radioaktívan jelölt antitest nem mutat szignifikáns lebomlást egy 48 órás időszakon át, amikor 4°C-on inkubáltuk. Az instant vékonyréteg kromatográfiát alkalmazó analízis azt mutatta, hogy az ^{90}Y -veszteség kevesebb mint 2% a 48 órás inkubálás alatt (24. táblázat). Az immunreaktivitás szintén viszonylag állandó, 60% (24. táblázat).

24. táblázat

Klinikailag formulázott ^{90}Y -2B8-MX-DTPA stabilitása

Idő (óra 4°C-on)	Százalék konjugátumhoz kapcsolt radioaktivitás	Százalék immunreaktivitás
0	97,2	62
24	96,2	60
48	96,2	60

A radioaktívan jelölt konjugátumot (14,6 mCi/mg specifikus aktivitás) PBS-ben (pH=7,4) formuláztunk, mely 75 mg/ml humán szérum albumint és 1 mM DTPA-t tartalmazott, és az alikvotokat 4°C-on inkubáltuk. A konjugátum stabilitását a bemutatott időpontokban SDS-PAGE-vel és autoradiográfiával, instant vékonyréteg kromatográfiával és teljes sejt kötési assay-vel analizál-

tuk. Az eredmények azt mutatják, hogy a radioaktív fém hozzávetőleg 96%-a konjugátumhoz kapcsolódva marad 48 óra múlva 4°C-on, és az antitest immunreaktivitása állandó, hozzávetőleg 60% maradt.

Formulálási vizsgálatokat is végrehajtottunk a ^{111}In -jelölt konjugátummal; a specifikus aktivitás 2,2 mCi/mg volt. A radioaktívan jelölt antitestet 50 mg/ml HSA-t tartalmazó 1 X PBS-ben (pH=7,4) értékeltük ki. A 10. ábra az autoradiogramok fényképeit mutatja a 0. időpillanatban és 48. órás inkubálási mintáknál; az autoradiogramok denzitometriás analízise azt jelzi, hogy a radioaktívan jelölt antitest nem bomlik le a vizsgálat folyamán (11., 12. ábra.: A minták instant vékonyréteg kromatográfiás analízise igazolta, hogy nem volt ^{111}In -veszteség (25. táblázat); sőt az immunreaktivitás hozzávetőleg 100 %-ban fennmaradt (25. táblázat).

25. táblázat

Klinikailag formulázott ^{111}In -2B8-MX-DTPA stabilitása

Idő (óra 4°C-on)	Százalék konjugátumhoz kapcsolt radioaktivitás	Százalék immunreaktivitás
0	94,0	105
24	96,5	104
48	96,0	100

A radioaktívan jelölt konjugátumot (2,2 mCi/mg specifikus aktivitás) PBS-ben (pH=7,4) formuláztunk, mely 50 mg/ml humán szérum albumint tartalmazott, és az alikvotokat 4°C-on inkubáltuk. A konjugátum stabilitását a bemutatott időpontokban SDS-PAGE-vel és autoradiográfiával, azonnali vékonyréteg kromatográfiával és teljes sejt kötési assay-vel analizáltuk. Az eredmények azt mu-

tatják, hogy a radioaktív fém hozzávetőleg 96% a konjugátumhoz kapcsolódva marad 48 óra múlva 4 °C-on, és az antitest immunreaktivitása konstans, hozzávetőleg 100 % maradt.

Amikor egy ^{90}Y -nal 14,6 mCi/mg specifikus aktivitásig radioaktívan jelölt 2B8-MX-DTPA egy klinikailag formulált készítményét inkubáltuk 96 órán át 37°C-on humán szérumban, és nem-redukáló SDS-PAGE-vel és autoradiográfiával analizáltuk, a radioizotóp kevesebb, mint 4%-a veszett el az inkubációs idő alatt. Az autogrammok denzitometriás vizsgálatai a 0. időpontban és a 96. órában azt mutatták, hogy a radioaktívan jelölt konjugátum nem bomlott le szignifikánsan (13-15. ábra). Ezeket a 0. időpont szerinti és a 96 órás minták analitikai vékonyréteg kromatográfiás analízise igazolta (26. táblázat). Összegezve ezeket az eredményeket, feltételezhető, hogy az ittrium-jelölt konjugátum stabil az ebben a vizsgálatban használt körülmények között. Hasonló eredményeket kaptunk a ^{111}In -nel jelölt 2B8-MX-DTPA konjugátummal (16-18. ábra).

26. táblázat: A humán szérumban 96 órán át 37°C-on inkubált ^{90}Y -2B8-MX-DTPA analitikai vékonyréteg kromatográfiás analízise

Idő (óra 37°C-on)	Százalék konjugátumhoz kapcsolt radioaktivitás
0	95,1
24	95,2
48	93,2
72	92,0
96	91,4

A ^{90}Y -2B8-MX-DTPA-t (14,6 mCi/mg specifikus aktivitás) tartalmazó humán szérummintákat a bemutatott időpontokban elemeztük

a minták 1:20-as hígításának 1 µl-ét azonnali vékonyréteg kromatográfiás csíkokra pöttyezve; a mintákat három példányban elemeztük. A kromatográfiás csíkokat úgy fejlesztettük ki, hogy a kromatográfiát metanol:vízben (1:1, tf/tf) lévő 10% ammónium-acetátban végeztük, szárítottuk, és keresztbe félbevágtuk. Mindegyik csík alsó és felső feléhez kapcsolt radioaktivitást ezután meghatároztuk, és a százalékos konjugátumhoz kapcsolódó radioaktivitást kiszámoltuk. (A szabad radioaktív fém az oldószerfronttal mozog, míg a fehérjéhez kapcsolt radioaktivitás a kiindulási ponton maradt. A konjugátumhoz kapcsolódott radioaktivitás meghatározásának átlagát mutatjuk be.

B. Állatokon végzett vizsgálatok

1. Nagy dózisú farmakológiai/toxicitási vizsgálatok a 2B8-cal és a 2B8-MX-DTPA-val

Egy White Sands Research Centerben végrehajtott GLP vizsgálatban (vizsgálati szám: 920111), jávai makákó majmoknak intravénás injekcióban különböző dózisú 2B8-t adtunk be. Mindenegyik újabb injekció előtt vérmintát vettünk, és a vért a limfocita populációk áramlásos citometriás kiértékeléséhez feldolgoztuk (27. táblázat).

27. táblázat

Áramlásos citometriával meghatározott főemlős B-sejt populációk 2B8 anti-CD20 egér monoklonális antitest infúziója után

Állat száma	Dózis	Nap	B-sejtek ^{a,b}	% kimerülés
I. csoport				
452	sóoldat	0	20,1	0
		1	18,3	9
		7	21,6	0
		13	14,6	27
		38	15,5	23
		52	18,6	7
424	sóoldat	0	12,4	0
		1	11,6	6
		7	11,2	10
		13	8,4	32
		38	7,7	38
		52	13,1	0
II. csoport				
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
804	0,6 mg/kg	0	17,6	0
		1	8,3	53
		7	6,1	65
		13	6,6	62
		38	5,1	71
		52	5,2	68
III. csop.				
701	2,5 mg/kg	0	21,6	0
		1	10,7	50
Állat száma	Dózis	Nap	B-sejtek ^{a,b}	% kimerülés
		7	3,0	86

		13	10,7	50
754	2,5 mg/kg	0	19,9	0
		1	11,2	44
		7	10,5	47
		13	9,0	55
IV. csop.				
782	10 mg/kg	0	15,9	0
		1	3,0	81
		7	3,5	78
		13	6,5	59
164	10 mg/kg	0	17,7	0
		1	8,4	47
		7	7,9	50
		13	7,7	42
V. csoport				
705	10 mg/kg	0	17,2	0
		1	5,2	70
		7	1,3	69
		13	8,2	52
		38	17,1	1
		52	13,3	22
716	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

^a Az össz limfociták százaléka

^b anti-egér IGG-RPE + anti-humán IG-FITC kétszeresen festő marker reagensekkel mért B-sejt populáció (az anti-egér IgG RPE a CD20-szal blokkolt 2B8-t és az anti-humán IgG FITC a majom B-sejtfelszíni Ig-t mutatja ki).

Az I-IV. csoport állatai minden 48. órában, összesen hétszer kaptak injekciót; Az V. csoportba tartozó állatok egyszer, a 0.

napon kaptak injekciót. A III. és IV. csoport állatait a 14. napon fájdalommentesen megöltük.

Nem jegyeztünk fel a 2B8 anti-CD20 antitest beadásához kapcsolódó szignifikáns farmakotoxikus hatást semilyen, a vizsgálat alatt vagy után értékelt klinikai paraméternél sem. Hasonlóan semmilyen abnormalitást sem figyeltünk meg a III. és IV. csoport állataiból kapott különböző hisztopatológiai minták elemzése során.

A vizsgálat 14 napon át tartott, és az állatokat a vizsgálat alatt a következő kategóriákban értékeltük: klinikai megfigyelések, testtömegek, testhőmérséklet, táplálék és víz-felvétel; bélsárkiürítés, szérum-vegyelemzés, hematológia, vizeletanalízis és fizikai vizsgálatok. Továbbá az állatoktól mindegyik csoportban vért vettünk a 0., 1., 7. és 13. napon, és a vért a szérum-antitestek (2B8) mennyiségére és a T- és B-sejtek mennyiségére kielemeztük. A 13. napon a III. és IV. csoportba tartozó állatokat fájdalommentesen megöltük, és a kiválasztott szöveteket mintapreparációt követő fénymikroszkópos vizsgálattal megvizsgáltuk. A kiértékelt szövetek a következők voltak: szív, lép, máj, vese, tüdő, agykéreg, gerincvelő, nyirokcsomó, gyomor, ileum, vastagbél, vázizom, here/petefészek, hasnyálmirigy, és csontvelő.

Amikor a kezelt állatokból származó vért a keringő T- és B-sejtek mennyiségére elemeztük ki, a II-V. csoportba tartozó állatok >50% keringő B-sejt veszteséget mutattak a 13. napig (19. ábra); az antitest beadása nem volt hatással a T-sejt mennyiségére (adatokat nem mutatunk be). Az összes 2B8-t kapó csoport a B-sejtek telítődését és a plazmában az antitestek nagy mennyisé-

gét mutatta (nem mutatjuk be). Az V. csoportba tartozó állatok, melyek a B8 egyszeri 10,0 mg/kg-os dózisát kapták, szintén csökkenést mutattak a keringő B-sejtek mennyiségében, mely azonos volt a más csoportokba tartozó állatoknál megfigyelttel.

Az I., II. és V. csoportokba tartozó állatokat 52 napon át vizsgáltuk (20. ábra). B sejtek mennyisége a normálisnál 70%-nál nagyobb mennyiségre tért vissza a 38. napra, kivéve egy állatot a II csoportban (PRO804) és egy állatot az V. csoportban (PRO716). A keringő B-sejtek mennyisége ezekben az állatokban a normális mennyiség hozzávetőleg 40%-a maradt 52 nap után.

E mellett a vizsgálat mellett a ^{89}Y -2B8-MX-DTPA farmakotoxikus hatásait is mértük jávai makákó majmokban a White Sands Research Centernél végrehajtott GLP vizsgálatban (Vizsgálat száma: 920611). Klinikai minőségű konjugátumot nem radioaktív ^{89}Y -nal telítettük. Az ittrium-hordozó konjugátumot 75 mg/ml humán szérumalbumint és 1mM DTPA-t (klinikai készítmény) tartalmazó PBS-ben (pH=6,8) formuláztuk, és intravénásan adtuk be a Módszerek fejezetben leírtak szerint.

Ahogy a 21. ábrán lévő eredmények mutatják, a ^{89}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA-nak kicsi hatása van, ha egyáltalán van, a keringő B-sejtekre ezekben az állatokban, függetlenül a beadott dózistól. Továbbá a limfociták általános kimerülésén (20-43 %) kívül semmilyen szignifikáns abnormalitást nem találtunk semelyik becsült klinikai paraméterben, ide értve a szérum vegyelemzését, vizeletanalízist testtömegeket és hőmérsékleteket.

2. Farmakokinetikai vizsgálatok a 2B8-cal és a 2B8-MX-DTPA-

val

Ahogy fentebb leírtuk, az V. csoportba tartozó állatok egyetlen 10,0 mg/kg 2B8 dózist kaptak. Az adatok lineáris regressziós analízise azt sugallják, hogy a natív antitest kiürült ezeknek a majmoknak a keringéséből hozzávetőleg 4,5 napos β $t_{1/2}$ -s értékkel. Egy hasonló vizsgálatban BALB/c egereket alkalmazva a β $t_{1/2}$ -s értéket lineáris regressziós analízissel meghatároztuk a natív és a konjugált 21B8-ra is (nem mutatjuk be), ami 8,75 nap volt (22. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a 2B8 konjugációnak nincs hatása a BALB/c egerekből való kiürülésre.

3. Biológiai megoszlási és tumorlokalizációs vizsgálatok radioaktívan jelölt 2B8-MX-DTPA-val

A fentebb leírt előzetes biológiai megoszlási kísérletekre építve (2d. fejezet), konjugált 2B8-t ^{111}In -nel jelöltük 2,3 mCi/mg specifikus aktivitásig, és durván 1,1 μCi -t oltottunk be húsz BALB/c egér mindegyikébe, hogy meghatározzuk a radioaktívan jelölt anyag biológiai megoszlását. Ezt követően öt egérből álló csoportok mindegyikét az 1., 24., 48. és 72. órában fájdalommentesen megöltük, és a szerveiket és a bőr, izom és csont egy részét kivettük, és az elemzéshez feldolgoztuk. Továbbá 24-72 órás időpontokban vizeletet és ürüléket gyűjtöttünk össze, és elemeztük. A radioaktivitás mértéke a vérben az első órában mért a 40,3 % beadott dózis/gramm-ról a 72. órára 18,9%-ra esett vissza (1-4. táblázat; 23. ábra). A szív, vese, izom és lép értékei 0,7-9,8 % tartományban maradtak a kísérlet folyamán. A tüdőkben található radioaktivitás mértéke az 1 órás 14,2%-ról a 72. órára 7,6%-ra csökkent; hasonló módon a megfelelő májba injektált dózis/gramm érték 10,3% és 9,9% volt. Ezeket az adatokat alkalmaz-

tuk a ^{111}In -2B8-MX-DTPA sugárzás abszorbeált dózis becslések meghatározására (19. ábra).

A 12,2 mCi/mg antitest specifikus aktivitású ^{90}Y -jelölt konjugátum biológiai megoszlását BALB/c egerekben értékeltük ki. 90%-nál nagyobb radioaktív beépülést kaptunk, és a radioaktívan jelölt antitestet HPLC-vel tisztítottuk. A radioaktivitás szöveti lerakódását kiértékeltek a fő szervekben, és a bőrben, csontban, és a vizeletben és a bélsárban 72 órán át, és százalékos beinjektált dózis/szövet értéként fejeztük ki. Az 5-8. táblázatban és a 24. ábrán bemutatott eredmények azt mutatják, hogy míg a vérhez kapcsolt radioaktivitás mértéke hozzávetőleg az 1. óránál mért 39,2 % injektált dózis/grammról 15,4%-ra csökken 72 óra múlva; a farokhoz, szívhez, izomhoz és léphez kapcsolódó radioaktivitás mértéke közel állandó 10,2%, vagy kevesebb a kísérlet alatt. Lényeges, hogy a csonthoz kapcsolódó radioaktivitás az egy óra múlva mért 4,4% beadott dózis/gramm-tól 3,2%-ig változott a 72. órára. Összességében ezek az eredmények azt sejtetik, hogy kevés szabad ittrium kapcsolódik a konjugátumhoz, és ez a kevés szabad radioaktív fém szabadult fel a vizsgálat folyamán. Ezeket az adatokat alkalmaztuk a sugárzás abszorbeált dózis becsült értékek meghatározására a ^{90}Y -2B8-MX-DTPA-nál (20. táblázat).

A tumorlokalizációs vizsgálatoknál a 2B8-MX-DTPA-t elkészítettük, és ^{111}In -nel radioaktívan jelöltük 2,7 mCi/mg specifikus aktivitásig. A jelölt konjugátum száz mikroliterét (hozzávetőleg 24 μCi) oltottuk ezután 12 timusz nélküli egér mindegyikébe, melyek Ramos B-sejt tumorokat hordoztak. A tumorok tömege 0,1-1,0 gramm között változott. Az injekció utáni 0., 24., 48. és 72.

órában 50 μ l vért vettünk szemüreg mögötti punkcióval, az egereket cervikális diszlokációval fájdalommentesen megöltük, és a farkat, szívet, tüdőt, májat, vesét, lépét, izmot, combcsontot és tumort kivettük. Miután előkészítettük és lemértük a szöveteket, mindegyik szövetfajtához kapcsolódó radioaktivitást egy gamma számlálót alkalmazva meghatároztuk, és az értékeket százalék beoltott dózis/gramm értéként fejeztük ki.

Az eredmények (25. ábra) azt mutatják, hogy ^{111}In -2B8-MX-DTPA tumor koncentrációi egyenletesen nőnek a kísérlet elejétől a végéig. A beoltott dózis harminc százaléka a tumorban halmozódik fel 72 óra múlva. A vérszintek ezzel szemben, a kísérlet alatt a 0. időpont szerinti 30% feletti értékről a 72. órára 13%-ra csökkent. Az összes más szövet (kivéve az izmot) a beinjektált dózis/gramm 1,3-6%-át tartalmazta a kísérlet végére; az izomszövet hozzávetőleg a beinjektált dózis/gramm 13%-át tartalmazta.

C. Dozimetria

Az összesített dozimetriás adatok, melyek a normál BALB/c egerekből származó biológiai megoszlási vizsgálatokból származtak, és a 19. és 20. táblázatban mutatjuk be az indiummal illetőleg ittriummal jelölt konjugátumok esetében, összhangban állnak a szakirodalomban megtalálható adatokkal mCi beoltott dózisonként összehasonlítva (5), és azt sejtetik, hogy a 2B8 ittriummal és indiummal jelölt konjugátumai is biztonságosan kiértékelhetők a limfómás betegekben a klinikai hatékonyságra.

D. Toxikológia

1. 2B8: Egydózisos általános biztonsági teszt

Egereknek és tengeri malacoknak egyetlen intraperitoneális 2B8 dózist (0,5 ml illetőleg 5,0 ml) adtunk be, és hét napon át

megfigyeltük őket. A toxicitásnak szemmel látható tüneteit nem figyeltük meg.

2. 2B8 és 2B8-MX-DTPA: Immunhisztológiai vizsgálatok humán szövetekkel

A 2B8 egér monoklonális antitest szöveti reaktivitását különböző humán szövet 32 acetonnal rögzített paneljét alkalmazva becsültuk meg. A 2B8 antitest az anti-CD20 antigénnel reagál, mely szöveti megoszlásának nagyon korlátozott mintázata van, a nyirokszöveteknek csak egy kicsi, hematopoietikus eredetű csoportjában figyelhető meg.

A nyirokcsomóban immunreaktivitást figyeltünk meg érett kéri B-limfociták populációjában valamint a germinális központok proliferáló sejtjeiben. Szintén pozitív reaktivitást figyeltünk meg a perifériás vérben a mandulák B-sejt területein, a lép fehér velőállományában, és a timuszban található velőállományi limfociták 40-70%-ában. Szintén pozitív reaktivitást figyeltünk meg a vastag bél lamina propriajában (Peyer plakkok follikulusaiban). Végezetül különböző szervek, így a húgyhólyag, mell, tüdő, méh, nyelőcső, tüdő, fültőmirigy, prosztatata, vékonybél és gyomor támasztószövetében lévő sejtek szintén pozitívak voltak a 2B8 antitestre.

Az összes egyedülálló epiteliális sejtet valamint a réteges epitéliumokat és a különböző szervek pikkelyes epitéliumát nem találtuk reaktívnak. Hasonló módon nem figyeltünk meg reaktivitást a neuroektodermális sejtekkel, ide tartoznak az agyban, gerincvelőben és perifériás idegekben lévő neuroektodermális sejtek. A mezenchimális elemeket, úgymint a váz és szájizomsejteket, fibroblasztokat, endoteliális sejteket és a

polimorfonukleáris gyulladásos sejteket szintén negatívnak találtuk.

A 2B8-MX-DTPA konjugátum szöveti reaktivitását tizenhat humán szövetből álló panelt alkalmazva értékeltük ki, melyet acetonnal rögzítettünk. Ahogy korábban azt a natív antitesttel kimutattuk, a 2B8-MX-DTPA konjugátum felismerte a CD20 antigént, ami a biológiai megoszlás igen korlátozott mintázatát mutatta, csak a nyirokeredetű sejtek egy kis csoportjában volt megfigyelhető. A nyirokcsomóban immunreaktivitást figyeltünk meg a B-sejt populációban. Erős reaktivitást találtunk a lép fehér velőállományában és a csecsemőmirigy velőállományi limfocitáiban. Szintén immunreaktivitást figyeltünk meg a húgyhólyag, szív, vastagbél, máj, tüdő és méh szétszórt limfocitáiban, és ez az ezekben a szövetekben lévő gyulladásos sejtek jelenlétének tulajdonítható. Ahogy a natív antitestnél leírtuk (fentebb), nem figyeltünk meg reaktivitást a neuroektodermális sejtekkel vagy a mezenchimális elemekkel.

III. Tárgyalás

A 2B8 egér monoklonális anti-CD-20 antitest, melyet egy ugyanilyen elnevezésű klónnal termeltettünk, affinitással rendelkezik a B-sejt CD20 antigénnel szemben, és ez magasabb lehet mint a B1 antitestnél megfigyelt, melyet ismert CD20 antigénspecifitású antitestek kompetíciójával és Scatchard analízissel határoztunk meg. Továbbá az immunprecipitációs adatok azt sejtetik, hogy a 2B8-cal kicsapott antigén ugyanaz, mint a B1-gyel kicsapott antigén, mivel mindkettő antitest egy 33 és 35 kD-os relatív molekulatömegű dublettet csap ki. A 2B8 antitest specifitásának citofluorográfiás analízise a perifériás vér

limfocitáknál igazolta, hogy az antitest specifikusan reagál a B-sejtekkel, és nem mutatható ki reaktivitás a limfociták T-sejtjeivel vagy más sejttípusaival. Végezetül az előzetes stabilitási adatok alapján feltételezhető, hogy az antitest 30°C-on 12 héten át stabil az immunreaktivitás csökkenése nélkül.

Amikor a 2B8 antitestet metil-benzil-dietilén-triamin-pentaecetsavhoz (MX-DTPA) konjugáltuk, gyakorlatilag nem figyeltünk meg immunreaktivitás-csökkenést a natív antitesthez képest. Továbbá a konjugátumnak ^{111}In -nel vagy ^{90}Y -nal való radioaktív jelölése 100% illetőleg 60% immunreaktivitással rendelkező jelölt konjugátumokat hozott létre. A humán szérumban 96 órán át 37°C-on inkubált ^{111}In - vagy ^{90}Y -jelölt konjugátumok stabilitási vizsgálatai a radioaktív fém elhanyagolható veszteségét mutatták a vizsgálat során, mely alapján feltételezhető, hogy a konjugátumok stabilak lesznek, amikor klinikailag alkalmazzák majd őket.

A tímusz nélküli egerekben végzett tumorlokalizációs vizsgálatok egy indiummal jelölt 2B8-MX-DTPA készítményt alkalmazva igazolta, hogy a konjugátum növekvő mennyisége kötődik a tumorsejtekhez a kísérlet időtartama alatt anélkül, hogy a többi szövetnél a szokásostól eltérő felhalmozódás megfigyelhető lett volna. Sőt, a biológiai megoszlásból származó dozimetriás értékek összhangban álltak a szakirodalomban publikált adatokkal. Végezetül a natív és a konjugált antitestekkel végzett humán szöveti keresztreaktivitási vizsgálatok azt mutatták, hogy az antitestek mindegyike egy olyan antigént ismer fel, mely nagyon korlátozott szöveti megoszlású, és a nyirokszövetekben csak egy kis csoporttal reagál, melyek közé a hematopoetikus eredetű sej-

tek tartoznak. Összességében ezek az eredmények azt sugallják, hogy a konjugáció nem változtatja meg az antitest szövetspecifitását, és hogy a radioaktívan jelölt konjugátumok stabilak *in vivo*, és felismerik a timusz nélküli egerekben létrehozott tumorok felszínén jelenlévő CD20 antigént.

Amikor 2B8-t használtunk egy nagydózisú farmakológiai/toxikológiai vizsgálatokban, a termelt antitest nem hozott létre szignifikáns farmakotoxikus hatást egyik mért paraméternél, sem a vizsgálat alatt, sem utána. Hasonló módon nem jegyeztünk fel rendellenességet a fénymikroszkóppal megvizsgált különböző hisztopatológiai minták elemzése során. Meglepő módon az alkalmazott antitest összes dózisa a keringő B-sejtek feltűnő kimerülését okozta. A keringő B-sejt mennyisége azonban durván a normális szintre tér vissza, amikor az antitest beadását abbahagyjuk. A majmok egydózisos csoportjában (V. csoport) a natív antitest a keringésből egy hozzávetőleg 4,5 napos látszólagos β $t_{1/2}$ értékkel ürült ki. Megjósolható módon, amikor ezt a farmakokinetikai vizsgálatot BALB/c egerekben hajtottuk végre, a 2B8 antitest egy 8,75 napos β $t_{1/2}$ értékkel ürült ki. Így együttesen ezek az adatok alapján feltételezhető, hogy a natív antitest is hasonló klinikai hatást biztosít, amikor járulékos anyagként a radioaktívan jelölt konjugátumhoz adjuk.

Általánosságban az adataink azt jelzik, hogy a nagy affinitású 2B8 antitest és MX-DTPA konjugátuma a humán szöveti reaktivitás korlátozott mintázatát fejezi ki. Mindemellett a főemlősökben a natív antitest nem toxikus, és a B-sejtek átmeneti kiürülését okozza; azonban ha egyszer az antitest kiürült a keringésből, a B-sejt mennyisége meglehetősen gyorsan visszatér. Továbbá

az indiummal és ittriummal jelölt 2B8-MX-DTPA konjugátumok stabilnak tűnnek *in vitro*, nem mutatják a radioaktív fém csökkenését a meghosszabbodott inkubálás alatt a humán szérumban. Végezetül a ^{90}Y - vagy ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA biológiai megoszlásából származó sugárdózisbecslései a BALB/c egerekben mCi injektált dózisonként egyezik a humán klinikai vizsgálatokból származó dózisbecslésekkel, melyekhez ezekkel az izotópokkal radioaktívan jelölt, konjugált anti-idiotípus antitesteket alkalmaztunk.

IV. A „Mix -4-shoot” radioaktív jelölő eljárás preklinikai kifejlesztésének összefoglalása ^{90}Y -2B8-MX DTPA előállítására

A. Bevezetés

Egy ^{90}Y -jelölt egér monoklonális anti-CD20 antitestet (2B8) értékeltünk ki egy I. fázisú klinikai kísérletben egy súlyosbodó B-sejt limfóma kezelésére. Az ittrium-jelölt antitest előállítására alkalmazott eredeti eljárás egy nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) lépést használt a nem fehérjéhez kötött radioizotóp eltávolítására a formulázás előtt és a betegeknek való beadás előtt. Sajnos ez az eljárás nagyon időigényes, mely azt eredményezi, hogy az antitest hosszabb ideig van kitéve a radioizotópnak védetlen állapotban. Ez az antitest megnövekedett radiolízisét eredményezi, melyet az immunreaktivitás csökkenése kísér. Továbbá az eljárás fárasztó volta nehézzé teszi, hogy egynél több adagot készítsünk el naponta a radioaktív gyógyszer-gyártásban. Az eljárás egyszerűsítését elősegítené, ha a NIPi Pharmacy Services radioaktív gyógyszer-gyártásának alternatíváaként a megvalósítás klinikai körülmények között történne.

Következésképpen egy javított radioaktív jelölő eljárást fejlesztettünk ki, melyre „mix-and-shoot” eljárásnéven hivatkozunk, mellyel kikerülhető a HPLC tisztítás szükségessége, míg megmarad a magas radioaktivitás beépülés, és a jó immunreaktivitás. Egekben végzett *in vitro* stabilitási vizsgálatok valamint biológiai megoszlási vizsgálatok kimutatták, hogy a „mix-&-shoot” eljárást alkalmazva készített radioaktívan jelölt antitest összehasonlítható az elterjedt HPLC eljárást alkalmazva létrehozott anyaggal. Ennek a preklinikai vizsgálatnak az eredményei azt jelzik, hogy ez az új „mix-&-shoot” eljárást alkalmazhatjuk klinikai kísérletekben való használatra alkalmas ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA előállítására.

B. Anyagok és módszerek

Anyagok

1. Sejtek

Az SB és HSB (CD20-negatív) humán limfoblaszt sejtvonalakat az American Type Culture Collectiontól szereztük be, és 10 % magzati borjúsérumot tartalmazó RPMI-1640-ben tartottuk fenn, melyet glutaminnal egészítettük ki.

2. Antitestek

A 2B8 antitestet a Manufacturing Department tisztította üreges szál bioreaktor felülűszóból a korábban az IND-ben (BB-IND 4850/4851) leírt protokollt alkalmazva.

3. További reagensek

Az ittrium-[90]-kloridot az Amershamtól szereztük be. Az összes többi reagenst a lentebb hivatkozott irodalmi helyeken leírt forrásokból szereztük be. A radioaktív jelölési eljáráshoz használt reagenseket kezeltük, hogy eltávolítsuk a szennyező ne-

hézfém ionokat, melyek kompetícióba léphetnének a radioizotópokkal a radioaktív jelölési eljárás alatt (lásd a Módszerek fejezetet). A reagenseket GMP körülmények között az IDEC Gyártási Osztálya készítette el az igazolt Batch Production Records-ot követve.

Módszerek

1. 2B8-D4X-DTPA előállítása

Klinikai minőségű MX-DTPA-t szereztünk be vízben oldott dinátriumsóként a Coulter Immunology-tól, és -70°C -on tároltuk. A konjugátumot (2B8-MX-DTPA) a Gyártási osztály készítette el. A konjugátum két különböző tételét használtuk ezekben a vizsgálatokban; mindkettőt normál sóoldatban 10 mg/ml koncentrációban biztosítottuk. A konjugátumokat steril 2 ml-es polipropilén fecskendőbe töltöttük, és $2-8^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

2. A fémmentes körülmények fenntartása

A reagensekkel végzett összes tevékenységet úgy hajtottuk végre, hogy minimálisra csökkentsük a fémszennyezések lehetőségét. Polipropilén és polisztrén műanyag tárolóedényeket, úgy mint lombikokat, főzőpoharakat és mérőhengereket használtunk. Ezeket Alconox-szal mostuk, és a használat előtt alaposan kiöblítettük Milli-Q vízzel vagy öblítővízzel (Water for Irrigation, WFIr). Fémmentes pipettahegyeket (BioRad) alkalmaztunk a kis mennyiségek pontos kezelésére. A reagensek nagyobb mennyiségeinél steril, műanyag szerológiai pipettákkal dolgoztunk. A reakciókat kényelmesen 1,8 ml-es csavaros tetejű, polipropilén mikrofugacsővekben hajtottuk végre.

3. A radioaktivitás beépülésének meghatározása

A radioaktivitás beépülését instant vékonyréteg kromatográfiával (ITCL) határoztuk meg három példányban a SOP SP-13-008 szerint. Általánosságban, az eljárás a következő volt: a radioaktívan jelölt konjugátumot 1:20 arányban 1 mM DTPA-t vagy 5 mM EDTA-t tartalmazó 1 x PBS-ben hígítottuk, majd 1 ml-t 1 x 5 cm-es ITLC SG papírcsík (Gelman Sciences) egyik végétől 1,5 cm-re cseppentettünk. A papírt metanol:víz elegyében (1:1; tf/tf) lévő 10%-os ammónium acetáttal hívtuk elő. A csíkot szárítottuk, keresztbe kettévágtuk, és mindegyik darabhoz kapcsolt radioaktivitást szcintillációs számlálással meghatároztuk. A csík alsó feléhez kapcsolódó radioaktivitást (fehérjéhez kapcsolt radioaktivitást) a felső és alsó fél értékének összeadásából meghatározott teljes radioaktivitás százalékaként fejeztük ki.

4. „Mix-&-shoot” eljárás ittrium-[90]-jelölt 2B8-M-DTPA-hoz

Az antititesteket az Amershamtól beszerezett, 0,04 M HCl-ben lévő, hordozótól mentes ^{90}Y -kloriddal radioaktívan jelöltük. A radioizotóp egy alikvotját (10-20 mCi/mg antitest) egy polipropilén csőbe vittük át, és 0,02-szeres térfogatú fémentes 2M-os nátrium-acetátot adtunk hozzá, hogy az oldat pH-ját 3,6-ra állítsuk be. 2B8-NaDTPA-t (0,3 mg; 10,0 mg/ml normál sóoldatban) adtunk hozzá azonnal, és az oldatot óvatosan kevertük. Az oldat pH-ját pH papírral ellenőriztük, hogy biztosan a pH érték 3,8-4,1 legyen, és 5 percig inkubáltuk. A reakciót úgy állítottuk le, hogy az elegyet egy különálló, 75 mg/ml humán szérumalbumint (HSA) és 2mM dietilén-triamin-pentaecetsavat (DTPA) tartalmazó 1xPBS-t tartalmazó polipropilén csőbe vittük át, és óvatosan összekevertük. A radioaktívan jelölt antitestet 2-8°C-on tároltuk.

A specifikus aktivitást úgy határoztuk meg, hogy a radioaktívan jelölt konjugátum megfelelő alikvotjának radioaktivitását mértük. Ezt az értéket a számláló hatékonyságával korrigáltuk, a konjugátum fehérjekoncentrációjához viszonyítva, melyet 280 nm-en az abszorbanciával határoztuk meg, és mCi/mg fehérje értéként fejeztük ki.

5. Az ittrium-[90]-2B8-MX-DTPA in vitro immunreaktivitása

A ^{90}Y -jelölt konjugátum immunreaktivitását SOP#SP13-009-t alkalmazva határoztuk meg a Lindmo által leírt teljes sejt kötési assay módosított változata alapján. A log fázis koncentrációit növelve CD20-pozitív SBB sejteket vagy CD20-negatív HSB sejteket adtunk két sorozatban 1,5 ml-es polipropilén csőbe; a sejtek végső térfogata 0,40 ml volt. A radioaktívan jelölt konjugátumot 1-2,5 ng/l végső antitestkoncentrációra hígítottuk, és 0,35 ml-t adtunk mindegyik csőbe. 90 perces inkubálás után a sejteket centrifugálással pelletizáltuk, és a felülúszót összegyűjtöttük. A felülúszó frakcióban megmaradó radioaktivitást egy szcintillációs számlálóval határoztuk meg.

Az adatokat az összes bevitt radioaktivitás per a sejt-kapcsolt radioaktivitás hányadosként ábrázoljuk a sejtszám/cső reciprokanak függvényében. Az y-tengelymetszet az immunreaktív frakciót képviseli.

6. A klinikailag formulázott ittrium-[90]-2B8-MX-DTPA in vitro stabilitása

A 2B8-MX-DTPA konjugátumot ^{90}Y -nal radioaktívan jelöltük, és úgy formuláztuk, ahogy a „Mix-&-shoot” eljárásban fentebb leírtuk. A radioaktív konjugátum két tételét készítettük el; az egyik tételt a radioaktív beépülés stabilitásának mérésére, és a

másik tételt az immunreaktivitás fennmaradásának mérésére alkalmaztuk. A készítménnyé alakított konjugátumokat 4°C-on 48 órán át inkubáltuk, és az alikvotokat a 0., 24., és 48. órában kielemeztük nem redukáló SDS-PAGE-t és autoradiográfiát alkalmazva. Mindegyik időpontban az immunreaktivitást a fentebb leírt mérő-eljárást alkalmazva határoztuk meg.

7. Az ittrium-[90]-2B8-MX-DTPA in vitro stabilitása humán szérumban

A ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA stabilitását úgy mértük, hogy humán szérumban inkubáltuk 37°C-on 72 órán át. A konjugált antitestet ittrium-[90]-nel radioaktívan jelöltük, és a fentebb leírt módon formuláztuk. A radioaktívan jelölt konjugátumot 1:10 arányban normál humán szérummal (nincs hővel inaktiválva) hígítottuk, és az alikvotokat műanyag csövekben inkubáltuk 37°C-on. A kiválasztott időpontokban a mintákat kivettük, és nem redukáló SDS-PAGE-vel és autoradiográfiával analizáltuk.

8. Az ittrium-[90]-2B8-MX-DTPA biológiai megoszlása

Az ittrium-[90]-nel jelölt 2B8-MX-DTPA-t szöveti megoszlásra vizsgáltuk 8-10 hetes BALB/c egerekben. A radioaktívan jelölt konjugátumot a fentebb leírt módon készítettük el és formuláztuk. Az egereknek intravénás injekcióban 5mCi ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA-t adtunk, és öt egérből álló csoportokat az 1., 24., 48. és 72. órában fájdalommentesen megöltük. Miután elpusztítottuk őket, a farkat, szívet, tüdőt, májat, vesét, lépét, izmot, és combcsontot kivettük, mostuk, lemértük; és vér- és bőrmintát is vettünk az elemzéshez. Mindegyik mintához kapcsolódó radioaktivitást a fékezési sugárzás gamma-számlálóval történő mérésével

meghatároztuk, és a százalék beadott dózis/gramm szövet értéket és a százalék beadott dózis per szerv értéket meghatároztuk.

9. Dozimetria

A ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA-val beoltott egereket alkalmazva kapott biológiai megoszlási adatokat használtuk fel egy 70 kg-os betegnek beadott 1,0 mCi dóziséból abszorbeálódott sugárdózis becsült értékeinek kiszámítására. A becsléseket a Society of Nuclear Medicine Medical Internal Radiation Dose (MIRD) Committee által elfogadott módszerek szerint hajtottuk végre. Ezeket a számításokat Philip Hagan úr végezte el (Nuclear Medicine Service, VA Medical Center, LA Jolla, CA 92161).

10. Az ittrium-[90]-2B8-MX-DTPA klinikai dózisainak előállítására szolgáló eljárás validációja

[Irodalmi hivatkozás: R&D beszámoló, címe: „Validation of „Mix-and Shoot” radiolabeling Protocol for the Preparation of Clinical Doses of ^{90}Y -2B8-MX-DTPA”; P. Chinn; 1994. április 22.].

C. Eredmények

1. Ittrium-[90]-jelölt 2B8-MX DTPA előállítása „Mix-&Shoot” eljárással

Az 2B8-MX-DTPA-val és ^{90}Y -nal végzett radioaktív jelölés kinetikájának értékelésére szolgáló előkísérletek azt mutatták, hogy pH=3,6-4,0-nál a radioizotóp 95%-a épült be 5-10 perces reakcióidő alatt. Ennek a radioaktivitás-beépülésnek ($95,7\% \pm 1,7\%$) a reprodukálhatóságát ezután egy scale-up eljárás validációs vizsgálatában igazoltuk [Irodalmi hivatkozás: R&D beszámoló, címe: „Validation of „Mix-and Shoot” radiolabeling Protocol for the Preparation of Clinical Doses of ^{90}Y -2B8-MX-DTPA”; P. Chinn; 1994. április 22.]. A ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA előállítása ezzel a

„mix-&-shoot” eljárással egy olyan terméket eredményezett, mely összehasonlítható a HPLC eljárással előállítottal (lásd a BB-IND 4850/4851). Úgy találtuk, hogy a radioaktív jelölési eljárás jellemzően 10-15 mCi/mg antitest közötti specifikus aktivitással reprodukálható.

Az ezzel az eljárással készített ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA immunreaktivitása jellemzően nagyobb, mint 70%, összehasonlítva HPLC eljárásnál a validációs meneteknél megfigyelt 55-60 %-kal (26. ábra). Ez az eltérés valószínűleg a radiolízis lecsökkent hatásának köszönhető, melyet a „mix-&-shoot” eljárással járó lecsökkent inkubációs idő okoz. Ez az eredmény jellemző volt, és ahogy lentebb tárgyaltuk, a radioaktívan jelölt konjugátum klinikai dózisainak előállítására szolgáló scale-up eljárás validációs meneteire reprezentatív volt.

2. Az ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA in vitro stabilitása

A HPLC eljárást alkalmazva előállított nem védett ^{90}Y -jelölt antitestkonjugátummal végzett előzetes kísérletek azt igazolták, hogy a radiolízis jelentős antitestlebomlást és az immunreaktivitás elvesztését okozza. Ezért egy készítménypuffert fejlesztettünk ki, hogy a radiolízis hatásait minimálisra csökkentsük. Kimutattuk, hogy a humán szérumalbumin (HSA) hatásos az radiolízis miatti antitestlebomlás minimalizálásában. Egy becslést végeztünk a „mix-&-shoot” módszerrel előállított radioaktívan jelölt konjugátummal, hogy igazoljuk a készítmény hatásosságát a radiolízis minimálisra csökkentésében. A 14,5 mCi/mg antitest specifikus aktivitásig radioaktívan jelölt ^{90}Y -jelölt antitestet 75 mg/ml HSA-t és 1 mM DTPA-t tartalmazó 1 X PBS-ben formuláltuk. A 2B8-MX-DTPA konjugátum lebomlását a 0.,

24., 48. órában értékeltük ki SDS-PAGE-t és autoradiográfiát alkalmazva. A 2., 3., 4. ábrák azt mutatják, hogy a radioaktívan jelölt konjugátum nem mutat szignifikáns lebomlást egy 48 órás időszakon át, amikor 4°C-on inkubáljuk. Az instant vékonyréteg kromatográfiás analízis azt mutatta, hogy nem volt ^{90}Y veszteség a 48 órás inkubálás alatt; ezeket az eredményeket alátámasztotta az SDS-PAGE/autoradiográfiás analízis (28. táblázat). Az immunreaktivitás is viszonylag állandó volt, >88% (29. táblázat).

28. táblázat: A „Mix-&Shoot” ^{90}Y -2B8-MX-DTPA stabilitása humán szérumalbumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben

	A konjugátummal asszociált radioaktivitás százaléka	
Idő (óra)	ITCL	SDS/PAGE
0	92,9	96,0
24	95,5	95,4
48	91,3	94,6

29. táblázat

A „Mix-&Shoot” ^{90}Y -2B8-MX-DTPA immunreaktivitása humán szérum albumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben

Idő (óra 4°C-on)	Százalék immunreaktivitás
0	87,9
24	88,5
48	90,4

Egy klinikailag formulázott, 15,7 mCi/mg specifikus aktivitású ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA-t 72 órán át 37°C-on inkubáltunk. A nem redukáló SDS-PAGE-vel és autoradiográfiával elemezett minták azt

mutatták, hogy nincs radioizotóp veszteség az inkubációs idő alatt (30. táblázat). A 0. és 72. órában mért autoradiogrammok denzitometriás letapogatása azt jelezte, hogy a radioaktívan jelölt konjugátum jelentősen nem bomlott le (31. és 32. ábrák).

Ezeket az eredményeket alátámasztották a vékonyréteg-kromatográfiás elemzések (30. táblázat). Meg kell jegyeznünk, hogy a radioaktivitás beépülése az ebben a vizsgálatban alkalmazott antitestnél kisebb volt, mint amit a jelölési eljárás validációs vizsgálataiban kaptunk. Ennek az alacsonyabb radioaktivitás-beépülésnek az volt az oka, hogy a radioaktívan jelölt antitestnek ehhez az elkészítéséhez a ^{90}Y -klorid használt adagja gyengébb minőségű volt. A kisebb radioaktivitás-beépülési érték nem változtatja meg azt a következtetésünket, hogy a „mix-&-shoot” eljárással előállított ittriummal jelölt konjugátum stabil ezek között az inkubációs körülmények között.

30. táblázat: A humán szérumban inkubált ^{90}Y -2B8-MX-DTPA

konjugátum stabilitása

Idő (óra 37°C-on)	Százalék konjugátumhoz kapcsolt radioaktivitás	
0	85,7	88,8
24	76,4	90,0
72	87,6	88,7

A ^{90}Y -2B8-MX-DTPA-t (specifikus aktivitása 15,7 mCi/mg) tartalmazó humán szérummintákat nem fehérje-kötött ^{90}Y -re elemeztük a bemutatott időpontokban instant vékonyréteg kromatográfiás csíkokat és SDS-PAGE/autoradiográfiát alkalmazva.

3. Ittrium-[^{90}Y]-2B8-MX-DTPA-val végzett biológiai megoszlási vizsgálatok

Az ^{90}Y -jelölt konjugátum biológiai megoszlását, melynek a specifikus aktivitása 11,5 mCi/mg antitest és a radioaktivitás-beépülés >95%-nál, BALB/c egerekben értékeltük ki. A radioaktivitás felhalmozódását a szövetekben a fő szervekre, bőrre, izomra, csontra, vizeletre és bélsárra 72 óra múlva értékeltük ki, és százalék beoltott dózis/g szövet értékben és százalék beadott dózis/szerv értékben fejeztük ki. A 31-34. táblázatban és a 33. ábrán bemutatott eredmények azt mutatják, hogy a vérhez kapcsolódó radioaktivitás mennyisége az 1 óra múlva mért hozzávetőleg 43% beinjektált dózis/gram (% ID/g) mennyiségről hozzávetőleg 16%-ra csökken 72 óra múlva; a 24. órában és később, a szívhez, veséhez és léphez kapcsolt radioaktivitás mértéke meglehetősen állandó, 4-8%. A tüdőnél és a szívnél az egy óra múlva mért radioaktivitás 10-12%-ról a 72. órára 8-10%-ra csökkent. A bőrnél a radioaktivitás viszonylag állandó, hozzávetőleg 3% a 24. órától a 72. óráig. A gyomor-bél-rendszerben a radioaktivitás állandó, 0,5-1% volt a 24. órától a 72. óráig. A radioaktivitás az izomnál hozzávetőleg 6% a vizsgálat egész során. A combcsont általi radioaktivitás felvétel kevesebb, mint 4% az összes időpontban, ami azt jelzi, hogy a szabad ittrium mennyisége a konjugátum-készítményben jelentéktelen volt, és kevés szabad radioaktív fém szabadult fel a vizsgálat alatt.

31. táblázat: Az aktivitás megoszlása egy órával a normál BALB/c egereknek beadott ^{90}Y -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után

Átlagértékek $\pm$ SD

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	1,37 $\pm$ 0,053	42,74 $\pm$,078	58,52 $\pm$ 1,74
Szív	0,101 $\pm$ 0,01	8,03 $\pm$ 3,33	0,82 $\pm$ 0,37
Tüdő (2)	0,126 $\pm$ 0,01	12,44 $\pm$ 0,94	1,56 $\pm$ 0,05
Vese (1)	0,129 $\pm$ 0,01	7,81 $\pm$ 1,24	0,997 $\pm$ 0,10
Máj	0,899 $\pm$ 0,07	10,08 $\pm$ 1,28	9,01 $\pm$ 0,52
Lép	0,077 $\pm$ 0,004	10,74 $\pm$ 0,96	0,823 $\pm$ 0,04
Izom	7,83 $\pm$ 0,28	0,44 $\pm$ 0,08	3,43 $\pm$ 0,51
Csont	2,94 $\pm$ 0,11	3,44 $\pm$ 0,57	10,11 $\pm$ 1,80
Bőr	2,94 $\pm$ 0,11	1,46 $\pm$ 0,58	4,24 $\pm$ 1,57
Gyomor-bél r.	2,33 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,19	2,36 $\pm$ 0,35
Vizelet	-	-	-
Bélsár	-	-	-
		Összesen	94,66 $\pm$ 3,47

Egerek száma = 3

Átlagos tömeg = 19,58 g $\pm$ 0,71 g

32. táblázat

Az aktivitás megoszlása 24 órával a normál BALB/c egereknek beadott ^{90}Y -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után

Átlagértékek $\pm$ SD

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	1,55 $\pm$ 0,12	19,77 $\pm$ 2,42	30,77 $\pm$ 6,04
Szív	0,105 $\pm$ 0,01	4,44 $\pm$ 0,55	0,47 $\pm$ 0,08
Tüdő (2)	0,127 $\pm$ 0,02	8,78 $\pm$ 1,61	1,11 $\pm$ 0,21
Vese (1)	0,139 $\pm$ 0,01	5,02 $\pm$ 0,52	0,69 $\pm$ 0,05
Máj	0,966 $\pm$ 0,09	8,62 $\pm$ 2,73	8,20 $\pm$ 1,97
Lép	0,83 $\pm$ 0,01	6,75 $\pm$ 1,27	0,55 $\pm$ 0,064
Izom	8,83 $\pm$ 0,69	0,692 $\pm$ 0,01	6,12 $\pm$ 0,52
Csont	3,31 $\pm$ 0,26	2,24 $\pm$ 0,31	7,47 $\pm$ 1,53
Bőr	3,31 $\pm$ 0,26	3,33 $\pm$ 0,76	10,88 $\pm$ 1,76
Gyomor-bél r.	2,89 $\pm$ 0,43	0,73 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,05
Vizelet	-	-	2,31
Bélsár	-	-	1,23
		Összesen	73,52 $\pm$ 6,18%

Egerek száma = 3

Átlagos tömeg = 22,09 $\pm$ 1,73 g

33. táblázat

Az aktivitás megoszlása 48 órával a normál BALB/c egereknek
beadott ^{90}Y -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után

Átlagértékek $\pm$ SD

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	1,50 $\pm$ 0,14	14,97 $\pm$ 5,77	22,53 $\pm$ 8,48
Szív	0,104 $\pm$ 0,01	3,99 $\pm$ 1,43	0,415 $\pm$ 0,16
Tüdő (2)	0,122 $\pm$ 0,02	8,41 $\pm$ 1,57	1,04 $\pm$ 0,31
Vese (1)	0,124 $\pm$ 0,01	3,99 $\pm$ 1,62	0,49 $\pm$ 0,19
Máj	0,966 $\pm$ 0,13	6,12 $\pm$ 3,21	5,69 $\pm$ 2,25
Lép	0,079 $\pm$ 0,01	6,05 $\pm$ 2,38	0,46 $\pm$ 0,16
Izom	8,59 $\pm$ 0,82	0,54 $\pm$ 0,19	4,67 $\pm$ 1,67
Csont	3,22 $\pm$ 0,31	2,07 $\pm$ 0,84	6,65 $\pm$ 2,56
Bőr	3,22 $\pm$ 0,31	2,30 $\pm$ 0,70	7,34 $\pm$ 1,95
Gyomor-bél r.	2,63 $\pm$ 0,40	0,652 $\pm$ 0,30	1,67 $\pm$ 0,64
Vizelet	-	-	2,83
Bélsár	-	-	2,06
		Összesen	57,28 $\pm$ 17,60%

Egerek száma = 3

Átlagos tömeg = 21,48 $\pm$ 2,05 g

34. táblázat

Az aktivitás megoszlása 72 órával a normál BALB/c egereknek beadott ^{90}Y -2B8-MX-DTPA intravénás injekciója után

Átlagértékek $\pm$ SD

Minta	Szerv tömege gramm	% ID/gramm	% ID/szerv
Vér	1,45 $\pm$ 0,07	15,87 $\pm$ 4,81	23,14 $\pm$ 7,26
Szív	0,093 $\pm$ 0,01	4,16 $\pm$ 1,27	0,392 $\pm$ 0,13
Tüdő (2)	0,123 $\pm$ 0,02	10,67 $\pm$ 3,79	1,30 $\pm$ 0,45
Vese (1)	0,123 $\pm$ 0,01	4,79 $\pm$ 1,03	0,596 $\pm$ 0,16
Máj	0,876 $\pm$ 0,07	7,26 $\pm$ 1,79	6,39 $\pm$ 1,76
Lép	0,081 $\pm$ 0,01	7,37 $\pm$ 2,34	0,584 $\pm$ 0,16
Izom	8,30 $\pm$ 0,39	0,67 $\pm$ 0,13	5,58 $\pm$ 1,22
Csont	3,11 $\pm$ 0,15	2,58 $\pm$ 0,51	8,05 $\pm$ 1,76
Bőr	3,11 $\pm$ 0,15	3,09 $\pm$ 0,82	9,66 $\pm$ 2,680
Gyomor-bél r.	2,59 $\pm$ 0,20	0,79 $\pm$ 0,18	2,05 $\pm$ 0,53
Vizelet	-	-	3,56
Bélsár	-	-	2,82
		Összesen	65,47 $\pm$ 14,0

Egerek száma = 3

Átlagos tömeg = 20,76 $\pm$ 0,97 g

4. Dozimetria

A sugárzás-abszorbeált dózisokat egy átlagos 70 kg-os ember-nél, melyet a ^{90}Y -jelölt konjugátumra egér biológiai megoszlási adatokat alkalmazva (% ID/szerv értékek a 31-34. táblázatokban) számoltuk ki, a 35. táblázatban mutatjuk be. Ezek az eredmények összevethetők a korábban HPLC radioaktivitási jelölési eljárást alkalmazva előállított ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA-t alkalmazva kapott eredményekkel.

35. táblázat

Egy átlagos emberben egyenletesen eloszlaltott ittrium-[90]-jelölt 2B8-MX beadásából származó, és az állati megoszlási adatokon alapuló sugárzás dozimetriás becslések az injekció után 72 órával

Aktivitás mennyisége =		1000 μ Ci/beteg dózis	
	RADS		RADS
mellékvesék	0,534	petefészkek	0,534
húgyhólyagfal	0,534	hasnyálmirigy	0,534
gyomorfal	0,534	csontváz	
vékonybél	1,158	kortikális csont	1,466
ul. bélfal	1,657	trabekuláris csont	1,466
ll. bélfal	2,380	csontvelő (vörös)	4,452
vesék	7,015	csontvelő (sárga)	2,096
máj	7,149	porc	1,466
tüdők	2,157	más alkotórészek	1,466
más szövetek		bőr	6,603
izom	2,646	lép	4,973
zsírszövet	2,646	herék	0,534
vér	2,646	pajzsmirigy	0,534
agy	2,112	méh (nem terhes)	0,767
szív	2,646	teljes test	1,755

Ref: Mird J., Nucl. Med./Suppl. 1. 2/68, A Schema for Absorbed-dose calculation for Biologically Distributed Radionuclides

A számításokat Spreadsheet Template in Symphony (Lotus Development Corporation) alkalmazásával hajtottuk végre, és Philip L. Hagan M.S. (Nuclear Medicine Service, VA Hospital, San Diego, CA, 92161) hajtotta végre.

5. Ittrium-[90]-2B8-MX-DTPA klinikai dózisainak előállítására
szolgáló eljárás validációja

Összesen tíz validációs tételt készítettünk az MPI Pharmacy Services, Inc.-nél. Mindegyik tétel tesztelésének eredményeit a 36. táblázatban foglaltuk össze. Mindegyik tesztteredmény átlagértékét kiszámoltuk, és a standard hibákat a megfelelő helyen jelezzük. A különböző jelölési idők miatt az eljárás variabilitásának becslésére az 1-8. számú tételt egy 10 perces jelölési időt alkalmazva, a 9. és 10. számú tételt egy 5 perces reakcióidőt alkalmazva állítottuk elő. A tíz validációs tétel teszt-eredményei alapján a forgalomba hozatali előírásokat meghatároztuk. A forgalomba hozatali előírásokat a 37. táblázatban foglaltuk össze.

36. ábra

„Mix-i-Shoot”-ot alkalmazva előállított ⁹⁰Y-jelölt Z88-MX-DTPA tíz validációs tételeének vizsgálati eredményei

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	átlag
% immunreaktivitás	72,8	93,3	71,7	70,2	60,6	68,2	79,5	72,4	88,2	68,5	74,5 ± 9,8
endotoxin (Eu/ml)	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,25	<0,25	<0,25	<0,125	<0,125	<0,162 ± 0,06
% radioakt. beépülés	97,5	97,0	93,5	96,0	94,7	94,9	95,9	96,5	97,5	93,5	95,7 ± 1,4
antitest konc. (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
radioaktivitás (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
specifikus aktivitás	10,0	12,0	11,2	9,8	11,3	13,0	11,3	11,1	11,5	10,7	11,2 ± 0,9

37. táblázat

„Mix-&-Shoot” eljárást alkalmazva előállított ^{90}Y -jelölt 2B8-

MX-DTPA forgalomba hozatali előírásai

Teszt	Előírás	Eljárás
Immunreaktivitás	$\geq 60\%$	RIA
Endotoxin	5 EU/ml	LAL
Radioaktív jel beépülés	$\geq 90\%$	ITLC
Antitest-koncentráció	0,075-0,0150 mg/ml	
Radioaktivitás konc.1	$\geq 6,0$ mCi/ml	dóziskalibráció
Specifikus aktivitás1	$\geq 9,0$ mCi/mg antitest	A_{280} /dóziskalib.
Teljes fiola radioakt.1	$\geq 6,0$ mCi	dóziskalibráció
pH	6,0-8,0	pH papír
teljes fehérje konc.	65-85 mg/ml	A_{280}
sterilitás vizsg.	megfelelő	CFR 610.12

1 (0. időpont szerinti kalibrálás)

D. Eredmények megvitatása

Az eredeti radioaktív jelölési eljárás a ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA előállítására egy különösen fárasztó és időigényes HPLC tisztítási lépést használ a fehérjéhez nem kötött ^{90}Y eltávolítására a készítményből. Abból a célból, hogy egyszerűsítsük ezt az eljárást, és alkalmassá tegyük a klinikai helyen történő alkalmazásra, a kísérletek arra irányultak, hogy megszüntessük a HPLC lépést, ennek érdekében egy „mix-&-shot”-nak nevezett eljárást hajtottunk végre. A cél az volt, hogy megállapítsuk azokat a radioaktivitási jelölési körülményeket, melyek az izotóp nagyon nagy mértékű radioaktivitás beépülését eredményezi a konjugátumba, ezáltal elkerülve a tisztítási lépés szükségességét. Felfedeztük, hogy >95% radioaktivitás-beépülés érhető el pH=3,6-on öt-tíz perces inkubálással. Ennek az eljárásnak egy további előnye az immunreaktivitás megnövekedett fennmaradása (>70%), mely valószínűleg annak köszönhető, hogy rövidebb az az idő, ameddig az antitestet a nagy energiájú radioizotópnak ki van téve a humán szérumalbumin hozzáadása előtt, mely védelmet nyújt a radiolízissel szemben. Az immunreaktivitás fennmaradása nagyobb, mint amit a HPLC módszert alkalmazva korábban megfigyeltek.

A „mix-&-shoot” eljárást alkalmazva előállított és készítménypufferben (75 mg/ml humán szérumalbumint és 1 mM DTPA-t tartalmazó 1 X PBS) inkubált ^{90}Y -jelölt konjugátummal végzett stabilitási vizsgálatok azt mutatják, hogy nincs radioizotóp veszteség, és az immunreaktivitás teljesen megmarad. A humán szérummal 72 órán át 37°C-on végzett stabilitási vizsgálatok szintén minimális radioizotóp veszteséget jeleztek. Ezek a sta-

bilitási eredmények összevethetőek azokkal az eredményekkel, melyeket a HPLC eljárást alkalmazva kaptunk a radioaktívan jelölt konjugátummal.

A biológiai megoszlási vizsgálat olyan BALB/c egerekben, melyhez „mix-&-shoot” eljárással előállított ^{90}Y -jelölt konjugátumot alkalmaztunk, nem mutatott a szokásostól eltérő szöveti felhalmozódást. Ezeknek az eredményeknek az alapján feltelezhető, hogy a radioaktívan jelölt antitest nem változik meg annyira jelentősen, hogy drámai hatással lenne az antitest *in vivo* jellemzőire. Szintűgy, ezek az eredmények hasonlóak azokhoz az eredményekhez, melyeket korábban a radioaktív jelöléshez HPLC eljárást alkalmazva előállított radioaktívan jelölt konjugátummal kaptunk (lásd BB-IND 4850/4851).

Egy „átlagos” 70 kg-os ember esetében a biológiai megoszlási adatokból számított dozimetriás becslések összhangban állnak azokkal az eredményekkel, melyeket a HPLC eljárást alkalmazva kaptunk a radioaktívan jelölt konjugátumokkal (lásd BB-IND 4850/4851). Továbbá a dozimetriás adatok összevethetőek azokkal az eredményekkel, melyeket egy jelenleg folyó klinikai kísérletbe tartozó betegeknél kaptunk (1315. számú IDEC vizsgálat), ha az eredményeket beadott dózis mCi-nként összehasonlítjuk. Ebben a vizsgálatban hat betegnél az átlagérték ($\text{rad} \pm \text{SD}$) a teljes testnél $1,40 \pm 0,57$, a szívnél $10,50 \pm 4,68$, a májnál $9,89 \pm 3,91$ és a lépénél $9,75 \pm 6,00$ volt.

Mielőtt a „mix-&-shoot” jelölési eljárást klinikai minőségű ^{90}Y -2B8-MX-DTPA előállításához kidolgoztuk volna, szükség volt az eljárás reprodukálhatóságának vizsgálatára. Tehát tíz validációs tételt hoztunk létre a ^{90}Y -klorid különböző tételeit alkalmazva.

Az előállított tíz tételnél a „mix-&-shoot” eljárást alkalmazva kapott immunreaktivitási értékek 60,6-93,3% között voltak, az átlag 74,5%, és a középérték 72,1% volt. Az immunreaktivitásnak az ilyen mértékű fennmaradása szignifikánsan jobb, mint a korábban a használatos HPLC módszert alkalmazva kapott 60%-os érték (54,9-65,1% között; átlaga 60,2 %). Az átlagos radioaktivitás beépülés a tíz tételnél 95,7% volt (93,5-97,5% között). Ez az érték összevethető azzal az értékkel, melyet korábban a HPLC módszernél láttunk (91,7-93,7% közötti tartomány, és az átlag 93,1%). Úgy szintén az endotoxinra kapott eredmények, a koncentráció, radioaktivitás koncentráció, specifikus aktivitás, teljes fiola radioaktivitás, teljes fehérjekoncentráció, pH, és a sterilitás összevethető volt a tíz tételnél. Összességében, ezek az eredmények a „mix-&-shoot” eljárás reprodukálhatóságát igazolták. Továbbá 5 és 10 perces reakciókkal kiértékeltek az eljárás különböző jelölési időknél köszönhető variabilitását. Mivel nem volt szignifikáns különbség a két reakcióidőnél, úgy határoztunk, hogy a rövidebb inkubációs időt fogjuk használni a végleges eljárásban.

E. Összefoglalás

A ⁹⁰Y-jelölt 2B8-MX-DTPA klinikai dózisainak előállítására kifejlesztettünk egy jelölési eljárást, amit „mix-&-shoot” eljárásnak nevezünk, mellyel elkerülhető a jelenleg alkalmazott nagyteljesítményű folyadék kromatográfiás (HPLC) lépés a nem fehérje-kötött radioizotóp eltávolítására. Az egyszerűsített eljárás kiiktatja ezt a fáradságos tisztítási lépést, míg fenntartja a radioizotóp nagymértékű beépülését (> 90%), és az immunreaktivitás jobb fennmaradását (> 70%) biztosítja. A radio-

izotóp fennmaradása és az immunreaktivitás alapján úgy találtuk, hogy a klinikailag formulázott radioaktívan jelölt konjugátum stabil *in vitro*, amikor 4°C-on 48 órán át inkubáljuk, továbbá a radioaktívan jelölt konjugátum stabil, amikor humán szérumban 37°C-on 72 órán át inkubáljuk. A BALB/c egerekben végzett biológiai megoszlási vizsgálatok azt igazolták, hogy nincs a szokot-tól eltérő felhalmozódás, ide értve a csontot is. Egy „átlagos” 70 kg-os embernél a sugárzás adszorbeált dózisok becsült értékei összehasonlíthatóak voltak azokkal az értékekkel, melyeket a ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA-t egy jelenleg folyó klinikai kísérletben alkalmazva kaptunk. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményei azt mutatták, hogy a „mix-&-shoot” eljárást alkalmazva előállított ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA összehasonlítható azokkal az eredményekkel, melyeket a hagyományos HPLC eljárásokat alkalmazva kaptunk. A klinikai minőségű radioaktívan jelölt konjugátum előállítására alkalmazott scale-up eljárás validációja azt mutatta, hogy az eljárás reprodukálható volt, és a termék összehasonlítható az-zal, melyet a jelenlegi HPLC eljárást alkalmazva állítottunk elő. Ezeknek az előzetes vizsgálatoknak az eredményei azt jel-zik, hogy ez az új „mix-&-shoot” eljárás a klinikai kísérletek-ben használható ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA előállítására alkalmazha-tó.

Az előnyös megvalósítási módok részletes leírása

1. példa: Radioaktivitás-beépülés - Készletek és mérőeljárá-sok

I. Összefoglalás

A találmány egyik célja az volt, hogy radioaktivitási jelölé-si készleteket tervezzünk a ^{111}In - és ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA elő-

állítására (In2B8 illetőleg Y2B8), és megállapítsuk a forgalombahozatali előírásokat a klinikai termékekénél. A radioaktív jelölési készlet eljárások reprodukálhatók a radioaktív beépülés és az antigén-pozitív SB sejtek kötése tekintetében, és jelzi a radioaktív jelölési készlet alkalmasságát a klinikai kísérletekben való alkalmazásra. Javasoljuk, hogy az In2B8 és Y2B8 radioaktivitás beépülés és a kötődés forgalombahozatali előírását $\geq 95\%$ -ban illetőleg $\geq 70\%$ -ban határozzuk meg.

II. Bevezetés

Egy ^{90}Y -jelölt egér monoklonális anti-CD20 antitestet (Y2B8) jelenleg értékelnek ki a súlyosbodó B-sejt limfóma kezelésére. Az ittrium izotópnak hiányzik a gamma-komponense, mely ezt az elemet alkalmatlanná teszi a leképző rendszereknél való alkalmazásra. Tehát a ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA-t (In2B8) fogjuk alkalmazni a tumor elhelyezkedésének vizsgálatára és dozimetriára a betegekben, mielőtt vagy miután azokat ittriummal jelölt terapeutikummal kezeljük. Az Y2B8 és In2B8 előállítására jelenleg alkalmazott eljárásokkal, melyeket „mix-&-shoot” eljárásoknak nevezünk, klinikai vizsgálatokra alkalmas radioaktívan jelölt antitesteket állítunk elő. Mindemellett a jelölési folyamat egyszerűsítése elősegíti a klinikai körülmények közötti dózis-előállítást.

Az új radioaktív jelölési készlet előnyösen négy alkotórészt tartalmaz: 1) 2 mg/ml 2B8-MX-DTPA-t kis fémtartalmú normál sóoldatban 2) a radioizotóp oldatot a megfelelő jelölési pH-ra beállító 50 mM nátrium-acetátot 3) készítménypuffert (1X PBS, pH=7,4, mely 7,5% humán szérumalbumint és 1 mM DTPA-t tartal-

maz), 4) üres 10 ml-es üvegcsövet (reakciócső). Az összes komponens a sterilitásra és a pirogén-mentességre teszteltük.

Ez az ismertetés összefoglalja ennek a radioaktív jelölési készletnek a validációját, mely készlet egyszerű és könnyen használható, és ami 95% radioaktivitás beépülési értékkel és az antigén-pozitív sejtekhez való kötés elfogadható fennmaradásával rendelkező radioaktívan jelölt antitesteket eredményez. A forgalombahozatalt vizsgáló előírásokat javasolunk a klinikai termékekhez.

III. Anyagok és módszerek a radioaktivitás beépítéséhez

A. A radioaktív jelölési készletben lévő reagensek

1. 2B8-MX-DTPA, IDEC; 082395RM2 számú tétel
2. 50 mM nátrium-acetát, kis fémtartalmú, IDEC, 082395RM3. számú tétel
3. Készítménypuffer =7,5 % (tömeg/térfogat) humán szérum albumint és 1 mM DTPA-t tartalmazó 1x PBS, pH=7,4), IDEC, 082395RMI számú tétel)
4. reakciócső, 10 ml-es, IDEC

B. Anyagok és eszközök

1. Biodex Tec-Control Radioincorporation Készlet, katalógus-szám: 151-770
2. kesztyű: pormentes
3. Steril polipropilén fecskendők
4. Steril fecskendőtűk
5. kis zárható csövek; 1,5 ml

C. Módszerek

1. Y2B8 és In2B8 elkészítése radioaktív jelölő készlettel

A készletreagenseket elkészítettük, és üveg terelőlemezes fiolákba töltöttük. Az I. típusú boroszilikát fiolákat (2 vagy 10 ml-es) injekcióhoz való steril vízzel (WFI) kiöblítettük, és a feltöltés előtt autoklávoztuk. Butilkaucsuk terelőlemezeket öblítettünk steril WFI-vel, és használat előtt autoklávoztuk. A reagenseket manuálisan megtöltöttük, és egy Class 100 szobába összegyűjtöttük, és USP módszereket alkalmazva pirogenitásra és sterilitásra leteszteltük.

a. In2B8 előállítása

További reagensek:

1. Indium-[111]: kloridsó, hordozómentes, HCl-ben

Előírások:

1. Mindegyik lépést előnyösen fertőzésmentes módszereket alkalmazva végezzük.
2. A radioaktív jelölő készlet komponenseit hagyni kell, hogy szobahőmérsékletűvé váljanak a használat előtt.
3. A végterméket a betegnek a lentebb leírt 9. lépés után 8 órán belül be kell adni.

In2B8 radioaktív jelölő eljárás

1. A reakciócsőbe adandó $^{111}\text{InCl}_3$ mennyiségét a következőképpen számoltuk ki:

- a. Radioaktivitás koncentráció mCi/ml-ben a radioaktív jelölés időpontjában:

C_0 = Radioaktivitás koncentráció a kalibrálás időpontjában
(lásd a gyártó Analízis tanúsítványát)

Δt = időbeli változás (pozitív szám kalibrálás után, negatív szám a kalibrálás előtt).

Radioaktivitás koncentráció a jelölés időpontjában =

$$C_0 / e0,0103(\Delta t)$$

b. A reakciócsőbe adandó InCl_3 térfogata:

5,5 mCi / radioaktivitás konc = a reakciócsőbe adandó mennyiség a jelöléskor

2. A reakciócsőbe adandó 50 mM nátrium-acetát mennyiségét a következőképpen számoltuk ki:

A hozzáadott $^{111}\text{InCl}_3$ mennyisége (1b lépés) X (1,2) = a hozzáadandó 50 mM nátrium-acetát mennyisége

3. A reakciócső terelőlemezeit és 50 mM nátrium-acetátos fiolát alkohollal letöröltük. Egy 1 cc fecskendőt alkalmazva az 50 mM nátrium-acetát mennyiségét (2. lépés) a reakciócsőbe tettük át.

4. A $^{111}\text{InCl}_3$ -forrás terelőlemezét alkohollal letöröltük. A fiolát egy steril 0,2 μm -es szűrővel töltött tűvel csapoltuk meg. Egy steril 1 cc fecskendőt alkalmazva az InCl_3 kívánt mennyiségét (1b. lépés) átvittük a reakciócsőbe. A fiola tartalmát összekevertük többször megforgatva.

5. A 2B8-MX-DTPA fiola terelőlemezét alkohollal letöröltük. Egy 1 cc-s fecskendőt alkalmazva 1,0 ml 2B8-MX-DTPA-t vittünk át lassan a reakciócsőbe. A csövet összekevertük többször megforgatva.

6. A reakciót 30 perc $\pm$ 5 percig hagytuk lejátszódni környezeti hőmérsékleten.

7. A reakcióelegy teljes térfogatát úgy számoltuk ki, hogy összeadtuk a hozzáadott $^{111}\text{InCl}_3$ mennyiségét (4. lépés) a hozzáadott 50 mM nátrium-acetát mennyiségét (3. lépés) és a hozzáadott 2B8-MX-DTPA mennyiségét (5. lépés).

8. A reakciócsőbe adandó készítménypuffer mennyiségét, ahhoz, hogy 10 ml végtérfogatot kapjunk, úgy számoltuk ki, hogy 10-ből kivontuk a 7. lépésben kiszámolt teljes mennyiséget.

9. A készítménypufferes fiolát alkohollal letöröltük, és a fiolát megcsapoltuk. A készítménypuffer viszkozitása miatt a reakciócsövet egy 0,2 µl-es fecskendőfilterrel töltött tűt alkalmazva csapoltuk meg. Egy megfelelő méretű tűvel ellátott 10 cc steril fecskendőt alkalmazva a készítménypuffer 8. lépésben kiszámított mennyiségét vittük át a reakciócsőbe. A csapolótűt eltávolítottuk a reakciócsőből, és a csövet többször megforgatva összekevertük (végtermék). Ezt a csövet legalább 5 percig inkubáltuk a „Radioaktivitás beépülési mérőeljárás” elvégzése előtt. Az oldat színe sárga volt, és a cső tele volt, igazolva hogy a készítménypuffert hozzáadtuk.

10. A végtermék teljes radioaktivitását megfelelő, ^{111}In -mérésre beállított berendezéssel mértük.

11. A végterméket a „Kötési mérőeljárás”-hoz és a „Radioaktivitás beépülés mérőeljárás”-hoz azonnal 2-8°C-ra helyeztük.

b. Y2B8 előállítás

További reagensek:

1. Ittrium-[90]: kloridsó , hordozómentes, HCl-ben

Előírások:

1. Mindegyik lépést fertőzésmentes módszereket alkalmazva kell elvégezni.
2. A radioaktív jelölő készlet komponenseit hagyni kell, hogy szobahőmérsékletűvé váljanak a használat előtt.
3. A végterméket a betegnek a lentebb leírt 9. lépés után 8 órán belül be kell adni.

Y2B8 radioaktív jelölő eljárás:

1. A reakciócsőbe adandó $^{90}\text{YCl}_3$ mennyiségét a következőképpen számoltuk ki:

a. Radioaktivitás koncentráció mCi/ml-ben a radioaktív jelölés időpontjában:

C_0 = Radioaktivitás koncentráció a kalibrálás időpontjában
(lásd a gyártó Analízis tanúsítványát)

Δt = időbeli változás (pozitív szám kalibrálás után, negatív szám a kalibrálás előtt).

Radioaktivitás koncentráció a jelölés időpontjában =

$$C_0 / e^{0,0108(\Delta t)}$$

b. A reakciócsőbe adandó $^{90}\text{YCl}_3$ térfogata:

45 mCi / radioaktivitás konc. a jelöléskor = a reakciócsőbe adandó mennyiség

2. A reakciócsőbe adandó 50 mM nátrium-acetát mennyiségét a következőképpen számoltuk ki:

a. 0,040 M HCl-ben lévő $^{90}\text{YCl}_3$ -nél (Amersham):

$^{90}\text{YCl}_3$ mennyisége (1b lépés) $\times$ (0,8) = a hozzáadandó 50 mM nátrium-acetát mennyisége

b. 0,050 M HCl-ben lévő $^{90}\text{YCl}_3$ -nél (Nordion):

$^{90}\text{YCl}_3$ mennyisége (1b lépés) $\times$ (1,0) = a hozzáadandó 50 mM nátrium-acetát mennyisége

3. A reakciócső terelőlemezeit és nátrium-acetátos fiolát alkohollal letöröltük. Egy 1 cc-s fecskendőt alkalmazva az 50 mM nátrium-acetát (2. lépés) számított mennyiségét (1a. vagy 1b. lépés) a reakciócsőbe tettük át. A cső tartalmát többször megforgatva összerázzuk.

4. A $^{90}\text{YCl}_3$ forrás terelőlemezét alkohollal letöröltük. A fiolát egy steril 0,2 μm -es szűrővel töltött tüvel csapoltuk meg. Egy steril 1 cc fecskendőt alkalmazva az InCl_3 kívánt mennyiségét (1b. lépés) átvittük a reakciócsőbe. A fiola tartalmát összekevertük többször megforgatva.

5. A 2B8-MX-DTPA fiola terelőlemezét alkohollal letöröltük. Egy 3 cc-s fecskendőt alkalmazva 1,5 ml 2B8-MX-DTPA-t vittünk át a reakciócsőbe. A csövet összekevertük többször megforgatva.

6. A reakcióelegy teljes térfogatát úgy számoltuk ki, hogy összeadtuk a hozzáadott Y-90-klorid mennyiségét (4. lépés) a hozzáadott 50 mM nátrium-acetát mennyiségét (3. lépés) és a hozzáadott 2B8-MX-DTPA mennyiségét (5. lépés).

7. A reakciócsőbe adandó készítménypuffer mennyiségét, ahhoz, hogy 10 ml végtérfogatot kapjunk, úgy számoltuk ki, hogy 10-ből kivontuk a 6. lépésben kiszámolt teljes mennyiséget.

8. A készítménypufferes fiolát alkohollal letöröltük, és a fiolát megcsapoltuk. A készítménypuffer viszkozitása miatt a reakciócsövet egy 0,20 μl -es fecskendőfilterrel töltött tűt alkalmazva csapoltuk meg. Egy megfelelő méretű tüvel ellátott 10 cc steril fecskendőt alkalmazva, a készítménypuffer 7. lépésben kiszámított mennyiségét vittük át a reakciócsőbe. A csapolótűt eltávolítottuk a reakciócsőből, és a csövet többször megforgatva összekevertük (végtermék). Ezt a csövet legalább 5 percig inkubáltuk a „Radioaktivitás beépülési mérőeljárás” elvégzése előtt. Az oldat színe sárga volt, és a cső tele volt, igazolva hogy a készítménypuffert hozzáadtuk.

9. A végtermék teljes radioaktivitását megfelelő, ^{111}In -mérésre beállított berendezéssel mértük.

10. A végterméket azonnal 2-8°C-on tároltuk, amíg a betegnek való beadáshoz nincs szükség rá.

11. Az immunreaktivitás tesztelése:

Egy 1 ml-es fecskendőt alkalmazva 0,1 ml-t kivettünk a reakciócsőből. és egy külön 1,5 ml-es csavaros tetejű csőbe vittük át. A csövet rögtön 2-8°C-ra helyeztük a „Kötési mérőeljárás”-hoz és a „Radioaktivitás beépülési mérőeljárás”-hoz.

A radioaktív jelölési készlet eljárások validációját az IDEC Pharmaceuticals-nál (San Diego, CA), MD Anderson Health Center-nél (Houston, TX), a Mayo Clinic-nél (Rochester, MN), és a City of Hope-nél (Duarte, Ca) hajtottuk végre. Az összes készletkomponenst, ide értve a klinikai minőségű 2B8-MX-DTPA-t, az IDEC Pharmaceutical készítette el GMP körülmények (A Szövetségi Előírások kódjának megfelelő gyártási körülmények) között, és meghatároztuk, hogy steril és pirogén-mentes-e.

A radioaktívan jelölt antitesteket 7,5% (tömeg/térfogat) humán szérumalbuminnal (HSA, klinikai minőségű, Baxter-Hyland) és 1 mM DTPA-t tartalmazó 1 X PBS-ben formuláltuk. Minden egyes validációs tételnél a végrehajtott kibocsátási teszt eredményeit lentebb ismertetjük. Öt operátorral az In2B8-nál és az Y2B8-nál is hat validációs tételt készítettünk. Ezeket a tételeket a következőképpen jelöltük meg, és a következő berendezésnél hajtottuk végre a vizsgálatot:

In2B8:

1. számú tétel: IDEC Pharmaceutical
2. számú tétel: IDEC Pharmaceutical
3. számú tétel: IDEC Pharmaceutical
4. számú tétel: MD Anderson Health Central

- 5. számú tétel: Mayo Clinic
- 6. számú tétel: City of Hope

Y2B8:

- 1. számú tétel: IDEC Pharmaceutical
- 2. számú tétel: IDEC Pharmaceutical
- 3. számú tétel: IDEC Pharmaceutical
- 4. számú tétel: MD Anderson Health Central
- 5. számú tétel: Mayo Clinic
- 6. számú tétel: City of Hope

2. Liofilizált SB és HSB sejtek előállítása

Az SB (CD20-pozitív) és HSB (CD20-negatív) humán sejtvonalakat az American Type Culture Collection-tól szereztük be, és T-lombikokban tenyésztettük 10 % magzati borjúsérumot tartalmazó és 2% glutaminnal kiegészített RPMI-1640-t alkalmazva. A tenyészeteket 37°C-on és 5% CO₂-ben tartottuk fenn. A sejtek jellemzően minden második nap kettéosztódtak, és 0,5-2,5 x 10⁶ sejt/ml-nél és >80% életképességnél gyűjtöttük össze őket. A sejtkoncentrációkat egy hemocitómétert alkalmazva határoztuk meg, és az életképességet tripán-kékes kizárással határoztuk meg.

A sejteket környezeti hőmérsékleten 0,5-2 x 10⁶ sejt/ml sejtsűrűségnél centrifugálással összegyűjtöttük (1300 rpm egy Sorvall centrifugában), és kétszer 1 X HBSS-ben mostuk. A pelletizált sejteket 50 x 10⁶ sejt/ml koncentrációig 1% (tömeg/térf.) marha szérumalbumint (BSA) és 10% (tömeg/térf.) mannitot tartalmazó 1 X HBSS-be (liofilizáló puffer) újrasszuszpendáltuk, 0,5 ml-t 1,5 ml-es, o-alakú tömítőgyűrűkkel rendelkező polipropilén mikrofugacsövekbe osztottunk szét, és -70°C-on tároltuk, és 30-60 millitorr-on egy éjszakán át liofilizáltuk. A

liofilizált sejteket tartalmazó csöveket 2-8°C-on szárítva tároltuk, és a mérőeljárásokhoz steril vízben állítottuk helyre. A sejteket tartalmazó csöveket mikrofugacsövekben szárítószerrel együtt tároltuk.

3. Analitikai mérőeljárások

Az In2B8 és Y2B8 validációs tételeinek tesztelésére használt analitikai eljárásokat ismertetjük a továbbiakban. A következő mérőeljárásokat hajtottuk végre mindegyik validációs tételnél:

1. Kötési mérőeljárás liofilizált SB sejteket alkalmazva
2. Y2B8/in2B8 radioaktivitás-beépülési mérőeljárás Biodex Készletet alkalmazva

a. Kötési mérőeljárások

Mindegyik operátor mérte a százalékos kötést az In2B8-nál illetőleg a Y2B8-nál liofilizált CD20-pozitív SB sejteket alkalmazva a következő eljárások szerint. Ezek a mérőeljárások gyors és határos módszerét biztosítják annak igazolására, hogy a radioaktívan jelölt antitest még felismeri antigénként a CD20-t. A CD20-negatív HSB sejteket klinikai környezetben is kiértékeltek. Liofilizált sejteket készítettünk, és a fenti "Liofilizált SB és HSB sejtek készítése" módszer szerinti állítottuk elő, és tároltuk.

1. In2B8 kötési mérőeljárás

További reagensek:

1. Indium-[111]-2B8-MX-DTPA
2. Liofilizált SB sejtek; három, 25×10^6 sejt/cső mennyiséget tartalmazó csövek.
3. Liofilizált HSB sejtek; három, 25×10^6 sejt/cső mennyiséget tartalmazó csövek.

4. Steril víz az öblítéshez, vagy steril víz az injekcióhoz

5. Hígítási puffer (1% Marha szérum albumint (BSA) , és 0,02% nátrium-azidot tartalmazó 1 X PBS-ben (pH=7,2-7,4), 0,2 µm-es vágási értékű szűrőn átszűrve és szobahőmérsékleten tárolva.

6. Üveg vagy műanyag csövek a radioaktivitás mérésére.

Eljárás:

Mérőeljárás beállítása (Nem radioaktív rész)

1. Három cső liofilizált SB és HSB sejtet kaptunk.
2. 0,50 ml mennyiségű SWFI-t (injekcióhoz szolgáló steril víz) adtunk mindegyik csőbe, és a csöveket vortexeltük amíg homogen szuszpenziót nem kaptunk.
3. Négy üres 1,5 ml-es mikrofugacső. A csövek közül háromba 0,50 ml hígítási puffert adtunk, melyek sejtek nélküli kontrollokat képviselték.
4. A másik 1,5 ml-es mikrofugacsőbe 0,99 ml hígítási puffert adtunk; ezt a csövet 1:100 arányban jelöltük.
5. Egy tetővel rendelkező 50 ml-es steril polipropilén csövet vettünk, és 10 ml hígítási puffert tettünk a csőbe.

Mérőeljárás beállítása (Radioaktív rész)

1. 2-8°C-on tárolt, radioaktívan jelölt antitestet vettünk.
2. Egy P20-szal 0,01 ml mennyiséget kiszívtunk, és 1,5 ml-es mikrofugacsőbe tettünk, mely 0,99 ml hígítási puffert (1:100-as hígítás) tartalmazott. A hegyet leöblítettük és a csövet óvatosan vortexeltük, hogy összekeverjük.
3. Az 1:100-as hígítási csőből P200-as pipettával 0,20 ml-t kiszívtunk, és 10 ml hígítási puffert tartalmazó kúpos csőbe tettük. A csövet alaposan összekevertük.

Mérővizsgálati eljárás

1. A hígított In2B8-MX-DTPA 0,50 ml mennyiségét adtuk az összes csőhöz.
2. A kupakokat erősen becsavartuk az összes csövön, és a csöveket 60 percen át folyamatosan kevertük.
3. 60 perc környezeti hőmérsékleten történő inkubálás után az összes csövet 5 percig minimum 2000 g-nél centrifugáltuk.
4. Mindegyik felülúszó 0,75 ml-es mennyiségét a számlálókészüléknek megfelelő csövekbe vittük át.
5. A csövekben lévő radioaktivitást egy gammaszámlálóval számoltuk, a háttérhez beállítva.

ii. Y2B8 kötési mérőeljárás

További reagensek:

1. $^{90}\text{Y2B8-MX-DTPA}$
2. Liofilizált SB sejtek
3. Steril víz az öblítéshez, vagy steril víz az injekcióhoz
4. Hígítási puffer (1% Marha szérum albumint (BSA) , és 0,02% nátrium-azidot tartalmazó 1 X PBS (pH=7,2-7,4) .

Eljárás:

Radioaktívan jelölt antitest minta készítése:

1. 2-8°C-on tárolt, radioaktívan jelölt antitestet vettünk.
2. Egy P20-as pipettával 10 µl mennyiséget kiszívtunk, és 1,5 ml-es mikrofugacsőbe tettünk, mely 990 µl hígítási puffert (1:100-as hígítás) tartalmazott. A hegyet leöblítettük és a csövet óvatosan vortexeltük.
3. Egy 50 ml-es, kupakos steril polipropilén csövet vettünk, és 10 ml hígítási puffert tettünk a csőbe egy 10 ml-es szerológiai pipettát alkalmazva.

4. Az 1:100-as hígítási csőből P200-as pipettával 35 µl-t kiszívtunk, és 10 ml hígítási puffert tartalmazó kúpos csőbe tettük. A csövet alaposan összekevertük.

Liofilizált sejt-preparátum

1. Három, liofilizált SB sejtet tartalmazó csövet vettünk.
2. 0,5 ml SWFI-t tettünk mindegyik csőbe, és a csöveket addig vortexeltük, míg egysejt-szuszpenziókat nem kaptunk.
3. Három üres 1,5 ml-es mikrofugacsövet vettünk elő, a három csőbe 0,5 ml hígítási puffert adtunk, melyek sejtek nélküli kontrollokat képviselték.

Mérővizsgálati eljárás

1. A hígított $^{90}\text{Y}2\text{B8-MX-DTPA}$ 0,5 ml mennyiségét adtuk az összes csőhöz.
2. A csöveket a végükkel felfelé egy keverőre helyeztük 45 percre, miután megbizonyosodtunk arról, hogy a kupakokat erősen becsavartuk.
3. 45 perc környezeti hőmérsékleten történő inkubálás után a sejteket 5 percig tartó mikrocentrifugálással pelletizáltuk.
4. A felülúszó 0,8 ml-es mennyiségét szcintillációs csövekbe vittük át.
5. Mindegyik csőbe szcintillációs koktélt tettünk.
6. A csövekben lévő radioaktivitást egy szcintillációs számlálóval számoltuk, a háttérhez beállítva.

b. Radioaktivitás-beépülési mérőeljárás

A százalékos radioaktivitás beépülést instant vékonyréteg kromatográfiával (ITLC) határoztuk meg Biodex Tec-Control Radiochromatographic Kitet alkalmazva a következő eljárás szerint:

További anyagok és felszerelés:

1. ^{111}In - vagy ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA
2. Csövek a radioaktív TLC csíkok számlálására
3. Olló
4. Steril fecskendő, 1 cc
5. Steril tűk, 26G
6. Gamma-számláló vagy szcintillációs számláló
7. Pipetta

Eljárás:

1. Először el kell olvasni a teljes Biodex Működési kézikönyvet.
2. Mindegyik radioaktívan jelölt mintát három példányban teszteltük a készlet használati útmutatója szerint; csövenként egy csíkot hívtunk elő.
3. A radioaktívan jelölt minta kromatográfiás csíkra történő pöttyözéséhez, egy pipettát alkalmaztunk, hogy 1 μl -t csepegtünk az eredeti sávra. Alternatív lehetőségként egy steril 1 cc fecskendőhöz kapcsolt 26G-s tűből kiadagolt kis cseppet pöttyintettünk.
4. Mindegyik darabot az aktivitásra kiértékeltek egy megfelelő számlálót, azaz a ^{111}In -nél egy gammaszámlálót, és a ^{90}Y -nál egy szcintillációs számlálót alkalmazva, a háttérhez beállítva.
5. Követtük a radioaktívan jelölt antitest százalékanak kiszámolására szolgáló Biodex útmutatót.

IV. Eredmények

Az In2B8 vagy Y2B8 mindegyik validációs tételének tesztelési eredményeit a 38. és 39. táblázatban összegezzük.

38. táblázat: Forgalombahozatali mérőeljárás eredményei az Y2B8 validációjánál

Tételszám	% radioaktivitás beépülés	% kötés
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

Átlag = 98,8

Átlag: 82,3

Standard hiba = 1,24

Standard hiba = 3,4

% CV = 1,25 %

CV = 4,2 %

39. táblázat: Forgalombahozatali mérőeljárás eredményei az In2B8 validációjánál

Tételszám	% radioaktivitás beépülés	% kötés
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

Átlag = 99,0

Átlag = 85,2

Standard hiba = 0,43

Standard hiba = 2,06

% CV = 0,45 %

CV = 2,42 %

V. Elemzés és következtetések

A jelenleg használatos radioaktivitási jelölési eljárások egyszerűsítésére az In2B8-nál és az Y2B8-nál, egy négykomponensű készletet fejlesztettünk ki. A nátrium-acetát koncentrációját 50

mM-ra és a 2B8-MX-DTPA koncentrációját 2 mg/ml-re csökkentettük, hogy lehetővé tegyük a pontos mennyiségátvitelt fecskendőket alkalmazva. Az összes készletkomponenst előnyösen üveg terelőlemez fiolákba töltöttük, és az IDEC sterilítésra és pirogenitásra letesztelte ezeket, mielőtt forgalomba hozta, így nincs szükség arra, hogy ezeket a teszteket a klinikai környezetben elvégezzük. Helyben az összes reagenssel végzett műveletet steril fecskendőket és csöveket alkalmazva hajtjuk végre. Ezért a radiofarmakológiai környezetben szokásosan megtalálható fertőzésmentes körülmények betartása biztosítja, hogy a radioaktívan jelölt és formulázott antitestek alkalmasak legyenek arra, hogy a betegeknek beadjuk.

Az In2B8-nál és Y2B8-nál a radioaktív jelölési eljárások reprodukálhatóságát és stabilitását több validációs mérés végrehajtásával értékeltük ki mindegyik radioizotóp különböző tételeit alkalmazva. Az előállított In2B8 hat validációs tételénél a kötés 82,1%-tól 86,8%-ig terjedt, az átlag 85,1 % volt; a radioaktivitás beépülési érték hozzávetőleg 99% volt (98,3%-tól 99,4%-ig terjedt). Az előállított Y2B8 hat validációs tételénél a kapott százalékos kötés 78,6%-tól 87,0%-ig terjedt, az átlag 82,3% volt. A radioaktivitási beépülési érték az Y2B8-nál átlagosan 98,8% volt (96,3%-tól 99,5%-ig terjedt). Összességében ezek az eredmények igazolják a radioaktív jelölési készlet eljárások reprodukálhatóságát és stabilitását az In2B8-nál és az Y2B8-nál is. Ezeknek a validációs eredményeknek az alapján javasolt, hogy a radioaktivitás beépülés és kötés forgalomba hozatali előírását $\geq 95\%$ -ban illetőleg $\geq 70\%$ -ban határozzuk meg az In2B8-nál és az Y2B8-nál is.

Továbbá mivel az alkalmazás könnyebbé vált, és csökkent a hibalehetőség az előállítás alatt, javasoljuk, hogy liofilizált CD20-pozitív sejteket alkalmazó százalékos kötést és radioaktivitás-beépülést használjunk az In2B8 és Y2B8 forgalomba hozatali tesztelésére a klinikai körülmények között.*

Összefoglalva, ezek az eredmények együttesen azt jelzik, hogy a radioaktív jelölő készletet alkalmazva előállított In2B8 és Y2B8 alkalmasak arra, hogy klinikai körülmények között használjuk fel azokat. Továbbá mindkét radioaktívan jelölt antitestnél, forgalomba hozatali előírásokat határozzunk meg öt különböző operátor által végzett több validációs mérés eredményére támaszkodva.

2. példa Radioaktivitás beépülés és kötődés - Készletek és mérőeljárások

I. Összefoglalás

A 2B8 jelű egér anti-CD20 monoklonális antitestet CHO sejtekben klónoztuk, hogy egy erősen expresszáló sejtvonalat kapjunk. A CHO-eredetű antitest CD20-pozitív humán sejtekkel szembeni specifikusságát FACS analizissel és kompetitív kötéssel igazoltuk. Jelentéktelen kötődést figyeltünk meg a humán T-sejtekkel szemben. Az antitest CD20-pozitív sejtekkel szembeni affinitását $1,3 \times 10^{-10}$ M értéként határoztuk meg egy kompetitív kötési mérőeljárást alkalmazva. Az antitestet MX-DTPA kelátképző szerrel reagáltattuk, hogy egy konjugátumot, a 2B8-MX-DTPA-t hozzuk létre, az immunreaktivitás jelentéktelen vesztesége mellett (az affinitási érték $4,4 \times 10^{-10}$ M volt). A ^{111}In radioaktív beépülésének mérésével meghatározva a kelátképző optimális konjugációját nyolcórás reakció után értük le. A radioaktív jelölési eljárások-

kat a 2B8-MX-DTPA-nál a ^{90}Y vagy az ^{111}In esetében a pH és az inkubációs idő tekintetében optimalizáltuk, hogy maximális radioaktív beépülést ($\geq 95\%$) és az immunreaktivitás fennmaradását ($\geq 70\%$) biztosítsuk. Az In2B8-nál és az Y2B8-nál, melyeket CHO-eredetű 2B8-MX-DTPA-t alkalmazva állítottunk elő, forgalombahozatali előírásokat javasoltunk a radioaktivitás beépülésére ($\geq 95\%$) és a liofilizált és helyreállított CD20-pozitív humán sejtek kötésére ($\geq 70\%$). Együttesen ezek az eredmények azt jelzik, hogy a CHO-eredetű 2B8-MX-DTPA alkalmas a klinikai kísérletekben való felhasználásra.

II. Bevezetés

A korábban alkalmazott 2B8 antitestet üreges szál bioreaktorokban termeltük. Hogy lecsökkentsük ennek az antitestnek a gyártási költségeit, CHO sejtekben klónoztuk, és fejeztük ki, hogy egy erősen expresszázó termelő sejtvonalat kapjunk. Ez a példa a CHO-eredetű 2B8 antitestnek, a konjugált antitestnek (2B8-MX-DTPA) és a klinikai radioaktív jelölési készlet eljárásait alkalmazva elkészített ^{90}Y - és ^{111}In -jelölt antitesttermékek *in vitro* jellemzésének eredményeit írja le.

III. Anyagok és módszerek

A. Reagensek

Az SB (CD20-pozitív) és HSB (CD20-negatív) humán sejtvonalakat az American Type Culture Collectiontól szereztük be, és T-lombikokban tenyésztettük 10 % magzati borjúsérumot tartalmazó és 2% glutaminnal kiegészített RPMI-1640-t alkalmazva. A tenyészeteket 37°C -on és 5% CO_2 -ben tartottuk fenn. A sejtek jellemzően minden második nap kettéosztódtak, és $0,5\text{--}2,5 \times 10^6$ sejt/ml-nél és $>80\%$ életképességnél arattuk le. A sejtkoncentrációkat

egy hemacitometert alkalmazva határoztuk meg, és az életképességet tripán-kékes kizárással határoztuk meg.

A sejt sarzsokra vonatkozó specifikus információkat a 1553. számú jegyzetfüzetbe és a Ron Morena által írt „Sejttaktivitási jegyzőkönyv 1995 & 1996” című iratgyűjtőbe írtuk fel.

CHO-eredetű 2B8-t állítottunk elő GMP körülmények között IDEC gyártó berendezésben. Az antitestet kis fémtartalmú normál sóoldatban formuláztuk 11,5 mg/ml koncentrációban. Az antitestekről SDS-PAGE-vel megállapítottuk, hogy homogének. 2B8-MX-DTPA-t állítottunk elő a PSBR-043 szerinti GMP körülmények között CHO-eredetű 2B8-ből, és kis fémtartalmú sóoldatban 2 mg/ml koncentrációban formuláztuk (tételszámok: 0165A és 0165B).

A gyógyszerminőségű ^{111}In -kloridot az Amershamtól (U.K.) vagy a Cyclotron Products Inc.-től (Coral Gables, FL) vásároltuk. Az ittrium[90]-kloridot az Amershamtól (U.K.), Nordion International-tól (Kanatta, Kanada) vagy a Pacific Northwest National Laboratory-tól (Richland, WA) szereztük be. A GMP szerint előállított MX-DTPA-t a Hauser Chemicaltől (Boulder, Co) szereztük be. A klinikai minőségű kalcium-trinátrium-dietilén-triamin-pentaecetsavat (DTPA) a Heyltől (Berlin, Németország) szereztük be. A TAG-NHS-t az IGEN Inc.-től (Rockville, MD) vásároltuk. Egérféle anti-CD19 gyöngyöket vásároltunk a Dynal Inc.-től (Lake Success, NY).

Kecske anti-egér FITC-jelölt F(ab')_2 -t a Jackson Immuno Research-től vásároltunk.

A szennyező nehézfémek eltávolítását igénylő reagenseket adagként Chelex 100-zal (BioRad Industries) vagy Chelating Sepharose-zal (Pharmacia) kezeltük, az oldatokat egy oszlopon

átesztve. A kis fémtartalmú törzsoldatokat öblítésre szolgáló steril vízzel (SWFIr) hígítottuk. Az oldatokat steril műanyag tárolóedényekben tartottuk.

További, a specifikus módszerekhez való reagenseket írunk le lentebb.

B. Anyagok és felszerelés

1. Origen Analizáló; IGEN Inc. Modellszám: 1100-1000; IDEC Szám: 1492
2. Top-Count szcintillációs számláló; Packard, Modellszám: A9912; IDEC szám: 1329
3. Gamma-számláló, Isodata, modellszám: 20-10; IDEC szám: 0628
4. Tec-Control Radiokromatográfiás készlet, Biodex, modellszám: 151-770
5. Liofilizáló; Virtis, Model Freezemobil 12; IDEC szám: 0458

A további anyagokat és berendezéseket a specifikus módszerek-nél írjuk le.

C. Módszerek

1. Liofilizált SB és HSB sejtek előállítása

A sejteket a fentebb leírt módon tenyésztettük, és környezeti hőmérsékleten $0,5-2 \times 10^6$ sejt/ml sejtsűrűségnél centrifugálással leárattuk (1300 rpm egy Sorvall centrifugában), és kétszer 1 X HBSS-ben mostuk. A pelletizált sejteket 50×10^6 sejt/ml koncentrációig 1% (tömeg/térf.) marha szérumalbumint (BSA) és 10 % (tömeg/térf.) mannitot tartalmazó 1 X HBSS-be (liofilizáló puffer) újraszuszpendáltuk, 0,5 ml-t 1,5 ml o-alakú tömitőgyűrűkkel rendelkező polipropilén mikrofugacsövekbe osztottunk szét, és -70°C -on tároltuk, és 30-60 millitorr-on egy éjszakán át liofilizáltuk. A liofilizált sejteket tartalmazó csöveket $2-8^\circ\text{C}$ -on szárítva tároltuk, és a mérőeljárásokhoz steril vízben

va tároltuk, és a mérőeljárásokhoz steril vízben állítottuk helyre. A sejteket tartalmazó csöveket mikrofugacsövekben száritószerral együtt tároltuk.

2. FACS kötési analízis

Az antitestek humán B-sejtekhez való közvetlen kötődését áramlásos citometriával határoztuk meg. Az antitestet növekvő koncentrációban 1% (tömeg/térf.) BSA-t tartalmazó 1X PBS-ben (pH=7,2) (kötési puffer) inkubáltuk 5×10^6 CD20-pozitív (SB) vagy CD20-negatív (HSB) sejtekkel 30 percig jégen. A sejteket centrifugálással mostuk, kötési pufferben újra szuszpendáltuk, és FITC-jelölt kecske anti-egér $F(ab')_2$ -vel 30 percen át jégen inkubáltuk. Miután a második reagenssel inkubáltuk, a sejteket centrifugálással mostuk, és 1,1% (térfogat/térfogat) formaldehidet tartalmazó 1 X PBS-ben újra szuszpendáltuk, hogy rögzítsük a sejteket. Az átlagos fluoreszcencia intenzitást áramlásos citometriát alkalmazva határoztuk meg.

3. Kompetitív kötési mérőeljárás

A 2B8 és a 2B8-MX-DTPA immunreaktivitását CD20-pozitív SB sejtekhez való kompetitív kötéssel határoztuk meg ORIGEN elektrokemilumineszcenciás eljárást (Leland and Powell) alkalmazva. A log-fázisú SB-sejteket a tenyészetből összegyűjtöttük, és kétszer mostuk 1 X HBSS-sel. A sejteket 1% (tömeg/térfogat) marha szérumalbumint tartalmazó 1X PBS-ben hígítottuk. Bizonyos kísérletekben liofilizált sejteket alkalmaztunk, miután azokat steril vízzel helyreállítottuk.

Ruténiummal jelölt nyomjelző antitestet állítottunk elő a CHO-eredetű 2B8-t (165. számú tétel) 1 X PBS-ben (pH=7,2) ruténium(II)-tris-bipiridin kelátor N-hidroxiszukcinimid észterével

(TAG-NHS) inkubálva 15:1 TAG-NSH:antitest molarányban. Környezeti hőmérsékleten végzett 1 órás inkubálás után fénytől védve, a reakciót glicinnel 10 perc alatt leállítottuk. A nem reagált TAG-ot méretkizárásos kromatográfiával eltávolítottuk egy 1 X PBS-sel kiegyensúlyozott Pharmacia PD-10 oszlopot alkalmazva. A fehérjekoncentrációt Bradford fehérje assay-t alkalmazva határoztuk meg. A TAG beépülést az abszorbancia 455 nm-en való mérésével határoztuk meg. Kiszámoltuk, hogy a TAG/fehérje molaránya 3,0.

Mérővizsgálatokat hajtottunk végre 12 X 75 mm-es polipropilén csövekben. A kompetícióba lépő antitestek különböző mennyiségeit (0,002- 17 µg/ml) inkubáltuk 1 X PBS-ben (pH=7,2, mely 1% (tömeg/térf.) BSA-t tartalmazott) 0,08 µg/ml TAG-jelölt CHO 2B8-vel, 0,08 mg/ml anti-CD19 gyöngyökkel és 167 000 sejt/ml-rel. Miután környezeti hőmérsékleten inkubáltuk 3 órán át orbitálisan keverve, meghatároztuk a relatív elektrokemilumineszcenciát (ECL) ORIGEN készüléket alkalmazva. Meghatároztuk az átlagos ECL értékeket a két példányos mintákban, és a kompetícióban álló antitest koncentrációjának függvényében ábrázoltuk Kaleidagraph szoftvert alkalmazva. Bizonyos kísérletekben a százalékos gátlást ábrázoltuk. A kompetíciós görbéket hozzáillesztettük, és az EC 50 értékeket (50 % maximális kötést adó antitestkoncentráció) meghatároztuk a következő 4-paraméteres programot alkalmazva:

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

m0 = független változó

m1 = nulla jelválasz relatív ECL egységekben

m2 = görbületi paraméter

m3 = EC50 µg/ml-ben kifejezve

m₄ = maximális jelválasz relatív ECL egységekben

Az átlagos affinitási értékeket az EC₅₀ értékekből és a nyomjelző antitest ismert koncentrációiból számoltuk ki, Muller módszerét alkalmazva.

4. 2B8-MX-DTPA előállítása

A kelátképző szert, az 1-izotiocianáto-benzil-3-metildietilén-triamin-pentaecetsavat (MX-DTPA) száraz porként (szabad sav) szereztük be, és szárítva tároltuk -20°C-on vagy -70°C-on. Hozzávetőleg 3 mg CHO 2B8 antitestet kis fémtartalmú normál sóoldatban pH=8,6-os értékre állítottuk be 1-10 térfogatnyi, 8,6 pH értékű 50 mM nátrium-borát hozzáadásával. Az antitestet 10-11 mg/ml koncentrációban 4:1 MX-DTPA:fehérje molarányban inkubáltuk 50 mM nátrium-borátban (pH=8,6) oldott MX-DTPA hozzáadásával. Környezeti hőmérsékleten történő inkubálás után (2-24 óra) a nem reagált kelátképzőt eltávolítottuk a konjugátumból kis fémtartalmú sóoldatban végzett ismételt diafiltrációval Centricon 30 spin-filtereket alkalmazva.

5. In2B8 és Y2B8 előállítása

In2B8-t állítottunk elő a radioaktív jelölési készlet eljárást alkalmazva az itt leírt módon. Az antitestet 3 mCi/mg specifikus aktivitásnál jelöltük, és 0,2 mg/ml-re formuláztuk. Röviden, 0,5-2 mCi ¹¹¹In-kloridot vittünk át egy fémentes mikrofugacsőbe, és hozzávetőleg pH=4,2 értékre állítottuk be 1,2 X térfogatnyi kis fémtartalmú 50 mM nátrium-acetátot alkalmazva. 2 mg/ml 2B8-MX-DTPA-t adtunk az indium-acetát oldathoz, és miután környezeti hőmérsékleten 30 percen át inkubáltuk, a jelölt antitestet 0,2 mg/ml-re formuláztuk 7,5% (tömeg/térf.) humán szérum albumint és 1 mM DTPA-t tartalmazó 1 X PBS-ben (pH=7,2)

(a HSA végső koncentrációja 4-6%). Az összes mintát teszteltük a radioaktivitás beépülésére három példányban; az értékek 95%-nál nagyobbak voltak.

Az Y2B8-t az 1. példában leírt radioaktív jelölési készlet eljárás egy kisméretben végzett változatával is előállítottuk. Az antitestet 15 mCi/mg specifikus aktivitásnál jelöltük, és 0,3 mg/ml koncentrációjára formuláztuk. Röviden, 0,5-2 mCi ^{90}Y -kloridot tettünk egy fémmentes mikrofugacsőbe, és a pH-t hozzávetőleg 4,2 érékre állítottuk be 1,2 X térfogatnyi kis fémtartalmú 50 mM nátrium-acetátot alkalmazva. 2 mg/ml 2B8-MX-DTPA-t adtunk az ^{90}Y -acetát oldathoz, és miután környezeti hőmérsékleten 30 percen át inkubáltuk, a jelölt antitestet 0,2 mg/ml-re formuláztuk 7,5 % (tömeg/térf.) humán szérum albumint és 1 mM DTPA-t tartalmazó 1 X PBS-ben (pH=7,2) (a HSA végső koncentrációja 4-6%). Az összes mintát teszteltük a radioaktivitás beépülésére három példányban; az értékek 95%-nál nagyobbak voltak.

A végső radioaktívan jelölt termékek radioaktivitáskoncentrációit a reakcióelegyhez adott radioaktivitás mennyisége alapján és a radioizotóp Analízis Tanusítványát figyelembe véve számítottuk ki. A leállított reakcióelegyek antitestkoncentrációját a hozzáadott antitest ismert mennyiségéből számítottuk ki.

A radioaktív jelölési kinetikai vizsgálatokhoz, melyek a pH hatását vizsgálják a radioaktivitás beépülésre és a kötésre, a reakcióelegyek pH-ját különböző mennyiségű kis fémtartalmú 50 mM nátrium-acetát (0,8-2,2 X a radioizotóp oldat térfogata) hozzáadásával állítottuk be.

6. A Radioaktivitás-beépülés meghatározása az In2B8-nál és az Y2B8-nál

A végtermékekben vagy az inkubációs mintákban a konjugátumokhoz kapcsolódó radioaktivitás mennyiségét (radioaktivitás beépülés) egy kereskedelemben beszerezhető Biodex által gyártott készletet (Tec-Control Radiochromatographic Kit; lásd az 1. példát) határoztuk meg. Általánosságban 1 μ l tesztmintát viszünk fel két vagy három példányban egy mikropipettával és a Biodex útmutatójának megfelelően. A félbevágott csíkokat radioaktivitásra mértük üvegcsövekben egy Isodata gamma-számlálót vagy egy Packard Top Cunt szcintillációs számlálót alkalmazva, ahogy lentebb leírjuk. A radioaktív jel beépülését úgy számoltuk ki, hogy a csík felső felében lévő radioaktivitás mennyiségét osztottuk a felső és alsó félben található teljes radioaktivitással. Ezt az értéket százalékban fejeztük ki, és az átlagértéket meghatároztuk.

7. Az In2B8 és Y2B8 immunreaktivitásának meghatározása

Az immunreaktivitást Lindmo és munkatársai eljárását alkalmazva és az 1. példában fentebb leírt módon mértük.

8. Közvetlen kötési mérőeljárás az In2B8-hoz és az Y2B8-hoz

Ugyanazokat az eljárásokat, melyeket itt leírtunk, alkalmaztuk a CD20-pozitív SB sejtekhez való kötődés meghatározására az In2B8-nál illetőleg az Y2B8-nál. Az In2B8-t és az Y2B8-t a fentebb leírt módon állítottuk elő és formuláztuk. A mérőeljáráshoz az In2B8 vagy Y2B8 mintákat assay hígítási pufferrel (1XPBS, pH=7,2, mely 1% (tömeg/térf.) marha szérumalbumint (BSA) tartalmazott) 40 ng/ml-re illetőleg 11 ng/ml-re hígítottuk.

Az antigén-pozitív (SB) és antigén-negatív (HSB) sejteket 10% magzati borjúsérummal kiegészített RPMI 1640-ben tartottuk fenn

37°C-on és 5% CO₂ tartalom mellett. A sejteket (90%-nál nagyobb életképesség tripán-kékes kizárással meghatározva) környezeti hőmérsékleten $0,5-2 \times 10^6$ sejt/ml sűrűségnél centrifugálással (1300 rpm egy Sorvall centrifugában) összegyűjtöttük, és kétszer 50 ml 1X HBSS-sel mostuk. A pelletizált sejteket 50×10^6 sejt/ml koncentrációig újra szuszpendáltuk 1% (tömeg/térfogat) marha szérumalbumint (BSA) és 10% (tömeg/térf.) mannitot tartalmazó előhűtött 1X HBSS-ben (liofilizáló puffer). A sejtszuspenziókat 1,5 ml-es, tömítőgyűrűs polipropilén mikrofugacsövekbe osztottuk szét 50×10^6 sejt/ml (koncentrációban (0,5 ml/cső), és egy éjszakán át 30-60 millitorr-nál liofilizáltuk. A liofilizált sejteket szárítva tároltuk 2-8°C-on, és steril vízben állítottuk helyre a mérőeljárásokhoz.

A liofilizált SB és HSB sejteket 1,5 ml-es polipropilén csövekben állítottuk helyre 50×10^6 sejt/ml koncentrációban, steril vizet használva. A hígított In2B8 vagy Y2B8-t a sejtekhez adtuk három példányban, és 45-60 percre függőleges dobkeverővel környezeti hőmérsékleten kevertük. Az inkubálás után a sejteket centrifugálással pelletizáltuk, és a sejthez kötött radioaktivitást a minták egy Isodata Gamma Számlálóban vagy egy Packard Top Count szcintillációs számlálóban való mérésével a lentebb leírt módon meghatároztuk. A sejtekhez kötött radioaktivitást (B) úgy számoltuk ki, hogy kivontuk a nem kötött radioaktivitást (felül-úszó) a teljes hozzáadott radioaktivitásból. A teljes radioaktivitást a csövekben sejtek nélkül mért radioaktivitásból határoztuk meg. A százalékos kötődést a kötött értéknek teljes érték százalékában kifejezve számoltuk ki.

9. Radioaktivitás mérés

A radioaktivitás beépülési mintákat 1 percig mértük egy Isodata gamma-számlálót alkalmazva. A számlálót 100-500 KeV energiaablakokra állítottuk be, és a háttérét nullára állítottuk közvetlenül a minták alkalmazása előtt ^{111}In -t alkalmazva. Szintén az Isodata gamma-számlálót alkalmaztuk az ITLC csíkok számlálására, melyekre ^{90}Y -t cseppentettünk. A fékezési sugárzás kimutatására szolgáló energiaablakok 100-1000 KeV értékűek voltak.

A kötési mérőeljárásokhoz az ^{90}Y -mintákat 24 mérőhelyes lemezekre és MicroScint 40 koktélba vittük át, és egy Packard TopCount-ban számoltuk egy percen át minimum és maximum energia-beállításokat használva. Indium-[111] mintákat számoltunk 1 percen át Isodata gammaszámlálóval. A számlálót 100-500 KeV energiaablakokra állítottuk be, és a háttérét közvetlenül az alkalmazás előtt nullára állítottuk be.

10. Az In2B8 és Y2B8 klinikai dózisainak forgalombahozatali előírásai

A radioaktivitás beépülés és a CD20-pozitív sejtekhez való kötődés forgalombahozatali előírásait úgy állapítottuk meg, hogy az In2B8 és Y2B8 mindegyikéből hat dózist készítettünk klinikai minőségű 2B8-MX-DTPA két tételéből (0219 és 0220. számú tételek), melyeket a találmány szerint állítottunk elő, és GMP körülmények között töltöttük. A forgalombahozatali mérőeljárásokat a fentebb leírt módon hajtottuk végre.

IV. Eredmények

A. A CHO-eredetű 2B8 jellemzése

Áramlásos citometriás analízist alkalmazva kimutattuk, hogy a CHO 2B8 közvetlenül kötődik a CD20-pozitív SB sejtekhez, anélkül, hogy a CD20-negatív HSB sejteket kötné (34. ábra). Nem je-

gyezettünk fel szignifikáns SB vagy HSB sejthez való kötődést az irreleváns izotípusú (γ lk) antitestnél (S004).

A CHO 2B8-nak a CD20-pozitív sejtekhez való kötődését kompetíciós mérőeljárásokban értékeltük ki ORIGEN kemilumineszcens kimutatási rendszert használva. Liofilizált és helyreállított antigén-pozitív SB sejteket inkubáltunk az antigén növekvő mennyiségeivel ruténiummal jelölt CHO 2B8 nyomkövető jelenlétében. Az eredmények azt mutatják, hogy a CHO 2B8 gátolja a CD20-pozitív sejtekhez való kötődést ugyanolyan mértékben, mint a üreges-szál bioreaktorokból származó antitest (2B8-49) (35. ábra). Az EC50 értékeket grafikusan és határoztuk meg, és Muller eljárását (1980) használtuk az átlagos affinitási értékek kiszámítására. Meghatároztuk, hogy a CHO 2B8 affinitása $1,3 \times 10^{-10}$ M; az üreges szál bioreaktorokból származó 2B8 antitest egy $2,5 \times 10^{-10}$ M affinitási értéket adott. A nem specifikus kötés elhanyagolható volt, melyet az S004 irreleváns izotípusú antitesttel végzett kompetíció hiánya igazolt.

B. A CHO-eredetű 2B8-MX-DTPA jellemzése

2B8 konjugátumot (2B8-MX-DTPA) készítettünk egy hasonló eljárással, mint amit a korábban jellemzett 2B8-49-nél alkalmaztunk. A reakciókat hozzávetőleg 3 mg antitestet és a 4:1 kelátor:antitest arányt alkalmazva hajtottuk végre. A 2, 4, 8, 17 és 24 órás inkubációs időket értékeltük ki, hogy meghatározzuk azokat a reakcióidőket, amik a CD20-pozitív sejtek kötésének elfogadható fennmaradását és magas radioaktivitás-beépülést eredményeznek a ^{111}In -nel. A kompetitív kötési görbék, melyek a 8-24 órán át reagáltatott CHO 2B8-t hasonlították össze a CHO 2B8-MX-DTPA konjugátummal, azt jelezték, hogy a konjugációs el-

járás nem változtatta meg jelentősen az antitest kötődését a CD20 antigénhez (36. ábra). Grafikusan meghatározott EC50 értékeket alkalmazva (36. ábra), a konjugált és nem konjugált antitestek affinitási konstansai $2,3 \times 10^{-10}$ M-től $5,9 \times 10^{-10}$ M-ig változtak (40. táblázat).

A radioaktivitás-beépülés 95%-nál nagyobb volt a 8-24 órás konjugációs időnél (40. táblázat).

40. táblázat: A konjugációs reakcióidő hatása a CHO 2B8-MX-DTPA radioaktivitásának beépülésére és az immunreaktivitására

Inkubációs idő (óra)	Radioaktivitás-beépülés (%)	Affinitás (M)
0	Nincs meghatározva	$2,3 \times 10^{-10}$
2	83,5	nincs meghat.-va
4	90,5	nincs meghat.-va
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-eredetű 2B8-MX-DTPA-ból előállított In2B8 és Y2B8 jellemzése

Indium-[111]-jelölt CHO 2B8-MXDTPA-t (In2B8) állítottunk elő a korábban az Üreges szál bioreaktor eredetű antitestre leírt kisméretű radioaktív jelölő készlet eljárás szerint (1. példa). Röviden, konjugált antitestet (CHO-eredetű 2B8-MX-DTPA; 0165A számú tétel) inkubáltunk ^{111}In -acetáttal a megjelölt pH-n 30 percig környezeti hőmérsékleten. A reakcióelegyet 7,5% (tömeg/térfogat) humán szérumalbumint és 1 mM DTPA-t tartalmazó PBS-sel formuláztuk. Az In2B8 formulázott mintáit radioaktivitás-beépülésre vizsgáltuk instant vékonyréteg kromatográfiával.

Az In2B8 kötődését a CD20-pozitív sejtekhez liofilizált és helyreállított SB sejteket alkalmazva határoztuk meg. Az összehasonlításhoz a hibridómatermelő antitestből (2B8-49) előállított konjugátumot ^{111}In -acetáttal inkubáltuk 30 percen át pH=4,2-n (a körülmények erre az antitestre korábban határoztuk meg).

Kinetikai vizsgálatokat hajtottunk végre, hogy meghatározzuk a CD20-pozitív sejtek kötődésének maximális fennmaradását és a nagy radioaktivitás-beépülést biztosító jelölési körülményeket (41. és 42. táblázat). A konjugált antitestet (CHO-eredetű 2B8-MX-DTPA) környezeti hőmérsékleten ^{111}In -acetáttal indukáltuk pH=4,2-n a megjelölt időig (42. táblázat).

41. táblázat. In2B8 radioaktív jelölési kinetika. A pH hatása a radioaktivitás-beépülésre és a CD20-pozitív sejtekhez való kötődésre

Reakció pH-ja	Radioaktivitás beépülés	Kötés (%)
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
Kontroll (2B8-49)	99,3	86,5

42. táblázat: In2B8 radioaktív jelölési kinetika: Az inkubációs idő hatása a radioaktív jelölésre és a CD20-pozitív sejtekhez való kötésre

Inkubációs idő	Radioaktivitás beépülés (%)	Kötés (%)
pH=2,9	15	97,2
	30	99,1
	45	97,2
		85,3
		85,2
		84,8

pH=4,6	15	99,0	87,2
	30	97,2	86,8
	45	99,4	86,3
Kontroll	(2B8-49)	99,4	87,8

Az eredmények azt mutatják, hogy a 3,0-4,6 pH-tartományban és 30 perces inkubációs időnél a radioizotóp 97%-nál nagyobb radioaktivitás-beépülését értük el, míg a kötés hozzávetőleg 84%-ban maradt meg. A radioaktivitás beépülése és a kötési értékek nem változtak a reakciók 15-45 perces inkubációs időinél pH=2,9-4,6-on (42. táblázat). Az eredmények hasonlóak a 2B8-49 antitestet alkalmazva kapott eredményekhez (41. és 42. táblázat).

Ittrium-[90]-nel jelölt antitestet állítottunk elő úgy, hogy a konjugált antitestet (CHO-eredetű 2B8-MX-DTPA) ^{90}Y -acetáttal inkubáltuk a megjelölt pH-n 5 percen át környezeti hőmérsékleten. A reakcióelegyet 7,5% (tömeg/térfogat) humán szérumalbumint és 1 mM DTPA-t tartalmazó PBS-ben formuláztuk. Az Y2B8 formulázott mintáit radioaktivitás beépülésére mértük instant vékonyréteg kromatográfiát alkalmazva. Az Y2B8 kötődését a CD20-pozitív sejtekhez liofilizált és helyreállított SB sejteket alkalmazva határoztuk meg. Az összehasonlításhoz a hibridómatermelő antitestből (2B8-49) előállított konjugátumot ^{90}Y -acetáttal inkubáltuk 5 percen át pH=4,2-n (a körülmények erre az antitest-re korábban határoztuk meg).

Hasonló kinetikai vizsgálatokat hajtottunk végre, hogy meghatározzuk az ^{90}Y -jelölt antitest (Y2B8) előállítását. A radioaktív jelölési reakciónál 3,9-4,7 pH tartományban 5 perces inkubációs időnél a radioaktivitás beépülés 96%-nál nagyobb volt a CD20-pozitív sejtek kötésének 80%-nál nagyobb megmaradásával. (43.

táblázat). Hasonló eredményeket kaptunk a 3, 5, és 10 perces inkubációs időknél, 2,9-4,6 pH tartománynál (44. táblázat). Ezután a konjugált antitestet (CHO-eredetű 2B8-MX-DTPA) környezeti hőmérsékleten ^{90}Y -acetáttal inkubáltuk pH=4,2-n a megjelölt időig (44. táblázat). Az eredmények hasonlóak a 2B8-49 antitestet alkalmazva kapott eredményekhez (43. és 44. táblázat).

43. táblázat. Y2B8 radioaktív jelölési kinetika. A pH hatása a radioaktív beépülésre és a CD20-pozitív sejtekhez való kötődésre

Reakció pH-ja	Radioaktivitás-beépülés	Kötés (%)
3,0	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
Kontroll (2B8-49)	99,3	82,6

42. táblázat: Y2B8 radioaktív jelölési kinetika: Az inkubációs idő hatása a radioaktív jelölésre és a CD20-pozitív sejtekhez való kötődésre

Inkubációs idő (perc)	Radioaktivitás beépülés (%)	Kötés (%)
pH=3,9	3	97,0
	5	98,9
	10	99,2
pH=4,7	3	97,2
	5	96,7
	10	97,6
Kontroll	(2B8-49)	99,2

Az immunreaktivitást a CHO 2B8-ból előállított In2B8-nál és Y2B8-nál Lindmo és munkatársai eljárását alkalmazva határoztuk meg. Frissen begyűjtött CD20-pozitív SB sejteket növekvő mennyiségben inkubáltunk az In2B8 vagy Y2B8 rögzített mennyiségével antigén feleslegében. A kötési adatok reciprokonos analízise lehetővé tette az immunreaktivitások meghatározását, mely 80,6% volt az In2B8-nál és 72,2 % volt az Y2B8-nál. (37. és 38. ábrák).

D. Forgalmahozatali előírások a CHO-eredetű In2B8-nál és Y2B8-nál

Két tétel klinikai minőségű In2B8/Y2B8 radioaktív jelölési készletet alkalmaztunk arra, hogy az In2B8 és Y2B8 mindegyikéből hat tételt elkészítsünk. In2B8 és Y2B8-t állítottunk elő a jelenleg a klinikai kísérletekben alkalmazott radioaktív jelölési eljárások kisméretű változatait alkalmazva. A radioaktívan jelölt 2B8-MX-DTPA mindegyik tételét a radioaktivitás beépülésére és a CD20-pozitív (SB) és a CD20-negatív (HSB) sejtekhez való kötődésre vizsgáltuk. Ezeket az eredményeket a 45. és 46. táblázatban foglaljuk össze. Az In2B8 előállított hat tételénél a radioaktivitás beépülés 98,9%-tól 99,3%-ig terjedt, az átlag 99,1 %. A CD20-pozitív sejtekhez való kötődés 81,9%-tól 85,1%-ig terjedt, az átlag 83,6% volt; a CD20-negatív sejtekhez való kötődés 4%-nál kisebb volt. A hat előállított Y2B8 tételnél a radioaktivitás beépülés 97,4%-tól 98,7%-ig terjedt, az átlag 98,2% volt. A CD20-pozitív sejtekhez való kötődés 81,4%-tól 82,7%-ig terjedt, az átlag 81,9 % volt; a CD20-negatív sejtekhez való kötődés 8%-nál kisebb volt.

45. táblázat: Forgalombahozatali mérőeljárási eredmények a radioaktivitási jelölési készlet eljárást alkalmazva előállított

CHO-eredetű In2B8-nál

Futtatás száma	Radioaktivitás beépülés (%)	Kötés (%)	
		SB sejtek	HSB sejtek
1. (0219. tétel)	99,1	81,9	2,8
2. (0219. tétel)	99,3	83,2	2,8
3. (0219. tétel)	99,2	83,6	3,7
4. (0220. tétel)	99,0	83,8	2,6
5. (0220. tétel)	98,9	84,1	2,6
6. (0220. tétel)	98,9	85,1	3,3
Átlag = 99,1 %		Átlag=83,6%	Átlag = 2,9%
SD=0,2%		SD=1,1%	SD=0,4%

46. táblázat: Kibocsátási mérőeljárási eredmények a radioaktivitási jelölési készlet eljárást alkalmazva előállított CHO-eredetű In2B8-nál

Futtatás száma	Radioaktivitás beépülés (%)	Kötés (%)	
		SB sejtek	HSB sejtek
1. (0219. tétel)	98,7	82,1	7,4
2. (0219. tétel)	98,6	82,7	0,7
3. (0219. tétel)	98,3	82,2	7,2
4. (0220. tétel)	97,4	81,8	1,7
5. (0220. tétel)	97,6	81,4	2,2
6. (0220. tétel)	98,4	81,4	1,1
Átlag = 98,2%		Átlag = 81,9%	Átlag = 3,4%
SD=0,5%		SD=0,5%	SD=3,1%

V. Tárgyalás és következtetések

A CHO sejtekben (CHO-eredetű 2B8) klónozott és kifejezett anti-CD20 egér monoklonális antitest (2B8) fenntartja a CD20-pozitív humán sejtekkel szembeni specifitását, melyet FACS analízissel és kompetitív kötési mérőeljárás analízissel mutattunk ki. A humán T-sejtekhez való kötődés minimális volt. A humán CD20-pozitív sejteknél az antitest affinitást meghatároztuk, az $1,3 \times 10^{-10}$ M volt egy kompetitív kötési mérőeljárást alkalmazva. Ugyanezzel a mérőeljárással az üreges szál bioreaktorokból származó 2B8 antitest egy $2,5 \times 10^{-10}$ affinitási értéket adott.

A CHO 2B8 antitestet MX-DTPA-val reagáltattuk, hogy egy konjugátumot, a 2B8-MX-DTPA-t hozzuk létre, míg az immunreaktivitás megfelelő fennmaradását megőrizzük.

Az optimális kelátképző beépülést a radioaktivitás beépülés ^{111}In -nel végzett mérésével határoztuk meg, és nyolc órás környezeti hőmérsékleten történő inkubálás után értük el. A radioaktív jelölési eljárást a 2B8-MX-DTPA-nál optimalizáltuk a ^{90}Y -nál vagy a ^{111}In -nél a pH és az inkubációs idő tekintetében, hogy biztosítsuk a maximális radioaktivitás beépülést és az immunreaktivitás fennmaradását.

Az In2B8 és Y2B8 különböző készítményeinek eredményei igazolták a radioaktív jelölési eljárás reprodukálhatóságát abból a célból, hogy klinikai dózisokat állítsunk elő. Ezeknek a radioaktivitási eredmények azt sugallják, hogy a forgalombahozatali előírás a radioaktivitás-beépülésnél $\geq 90\%$ és a kötődésnél $\geq 70\%$, liofilizált CD20-pozitív sejteket alkalmazva. Összességében ezek az eredmények azt demonstrálják, hogy a CHO-eredetű 2B8 és az üreges szál-eredetű 2B8-49 összevethető, és azt jelzik, hogy a

CHO-eredetű 2B8-MX-DTPA alkalmas a klinikai kísérletekben való alkalmazásra.

Végezetül a találmány egy jelölési eljárást, egy úgynevezett „mix-and-shoot” eljárást ismertet a radioaktívan jelölt antitestek klinikai dózisainak előállítására, melyhez nincs szükség a jelenleg alkalmazott nagy teljesítményű folyadék kromatográfiás (HPLC) lépésre a nem fehérjéhez kötött radioizotóp eltávolítására. Az egyszerűsített eljárás megszünteti a fáradságos tisztítási lépést, míg fenntartja a radioizotóp beépülés magas szintjét (>95%) és az immunreaktivitás jobb fennmaradását eredményezi (>70%). A radioizotóp retenciója és az immunreaktivitás alapján úgy találtuk, hogy a klinikailag formulált radioaktívan jelölt konjugátum in vitro stabil, amikor 4°C-on 48 órán át inkubáljuk. Továbbá a radioaktívan jelölt konjugátum stabil volt, amikor humán szérumban inkubáltuk 37°C-on 72 órán át. A BALB/c egerekben végzett biológiai megoszlási vizsgálatok azt igazolták, hogy nincs a megszokottól eltérő szöveti lerakódás, és nincs jelentős felhalmozódás a csontban. A sugárzás abszorbeált dózisok becsült értékei egy „átlagos” 70 kg-os embernél összevethetőek a folyamatban lévő, ⁹⁰Y-jelölt 2B8-MX-DTPA-vat alkalmazó klinikai kísérletben kapott értékekkel. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményei azt mutatják, hogy a „mix-and-shoot” eljárást alkalmazva előállított ⁹⁰Y-nal jelölt 2B8-MX-DTPA összehasonlítható a hagyományos HPLC eljárást alkalmazva előállítottal. A klinikai minőségű radioaktívan jelölt konjugátum scale-up eljárásának validációja azt mutatta, hogy a módszer reprodukálható, és hogy a termék összehasonlítható azzal, melyet a jelenlegi HPLC módszert alkalmazva állítanak elő. Ezeknek a preklinikai vizsgálatoknak az

eredményei azt jelzik, hogy az új „mix-4-shoot” eljárást a klinikai kísérletekben való alkalmazáshoz megfelelő ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA előállítására használhatjuk fel.

Irodalmi hivatkozások

A következő irodalmi helyek hivatkozásként a leírásba épülnek:

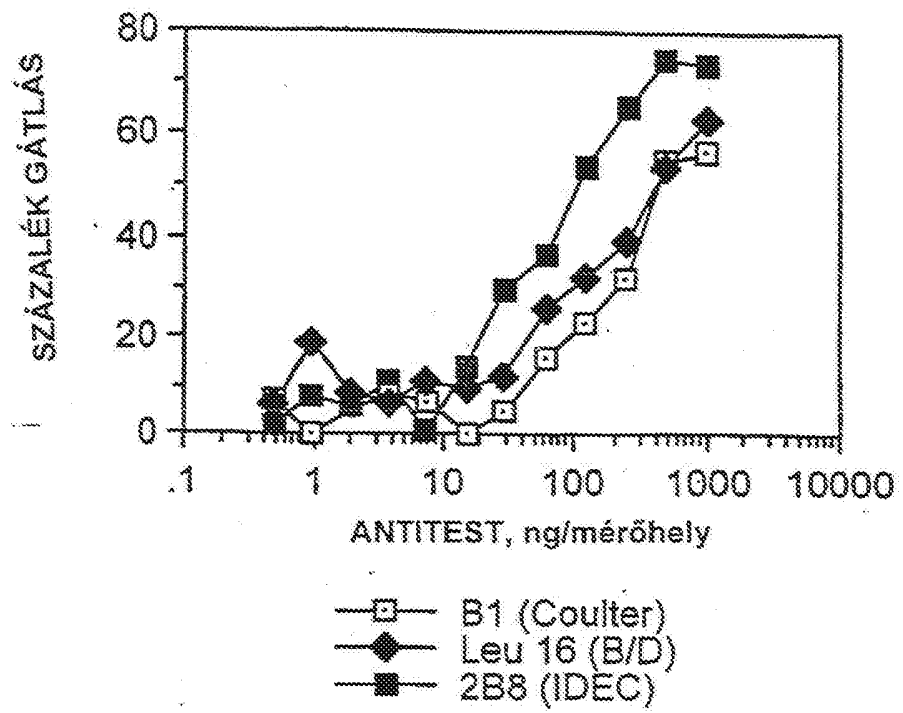
1. Adams, R. A. Flowers, A. és Davis B. J. Direct Implantation and transplantation of Human Acute Lymphoblastic Leukemia in Hamsters, SB-2. Cancer Research 28, 1121-1125 (1968).
2. Adams, R. A. Formal Discussion: The Role of Transplantation in the Experimental Investigation of Human Leukemia and Lymphoma. Cancer Res. 27(1), 2479-2482 ('967).
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., és Waldmann T. A. Cancer Res. 49, 2639-2644 (1989).
5. Parker, B. A., Halpern, S. E., Miller R. A., Hupf, H., Shawler D. L., Collins H. A., Amox, D., White, C. A. és Royston I. N. Eng. J. Med., benyújtva.
6. Leland, J. K. és Powell, M. J. J. , Electrochem. Soc. 137, 3127 (1990)
7. Muller, R. J., Immunological Methods 34, 345 (1980)
8. Mirzadeh, S., Breichbiel M. W., Atcher, R. W. és Gansow, O. A., Bioconjugate Chemistry 1(1), 59 (1990)
9. Brechbiel, M. W., Gansow, O. A., Atcher, R. W.; Sciom, J., Esteban, J., Simpson, D. E. és Colcher, D. 25, 2772 (1986)

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás egy kelátképzőhöz konjugált antitest ^{111}In -al való radioaktív jelölésére ahol
 - (i) a kelátképzővel konjugált antitestet egy ^{111}In -t tartalmazó oldattal keverjük össze és így egy elegyet képzünk;
 - (ii) az elegyet megfelelő hőmérsékleten kb. 30 percig inkubáljuk, amellyel egy radioaktívan jelzett antitestet állítunk elő, ahol a radioaktívan jelzett antitest radioinkorporációja 95 %-nál nagyobb; és
 - (iii) a jelölt antitestet egy készítménypufferben megfelelő koncentrációra hígítjuk oly módon, hogy az a páciensnek a nem inkorporált ^{111}In -tól való további tisztítás nélkül közvetlenül beadható, ahol a készítménypuffer egy fiziológiás sóoldatot, egy radioprotektánst és egy nem konjugált kelátképzőt tartalmaz.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a keátképzőhöz konjugált antitest egy anti-CD20 antitestet tartalmaz.
3. A 2. igénypont szerinti eljárás, ahol az anti-CD20 antitest 2B8-MX-DTPA.
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol a ^{111}In -t tartalmazó oldatot körülbelül 3-5-ös pH értékre állítjuk be, mielőtt a kelátképzőhöz konjugált antissztel összekevernénk.
5. A 4. igénypont szerinti eljárás, ahol a pH-t egy alacsony fémtartalmú nátrium-acetát oldattal állítjuk be.
6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, ahol a nátrium-acetát oldat koncentrációja 10-1000 mM.
7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol az alkalmazott ^{111}In mennyisége 4-6 mCi osztva a jelölés időpontjában lévő radioaktivitás-koncentrációval.
8. A 7. igénypont szerinti eljárás, ahol az alkalmazott ^{111}In mennyisége 5,5 mCi osztva a jelölés időpontjában lévő radioaktivitás-koncentrációval.

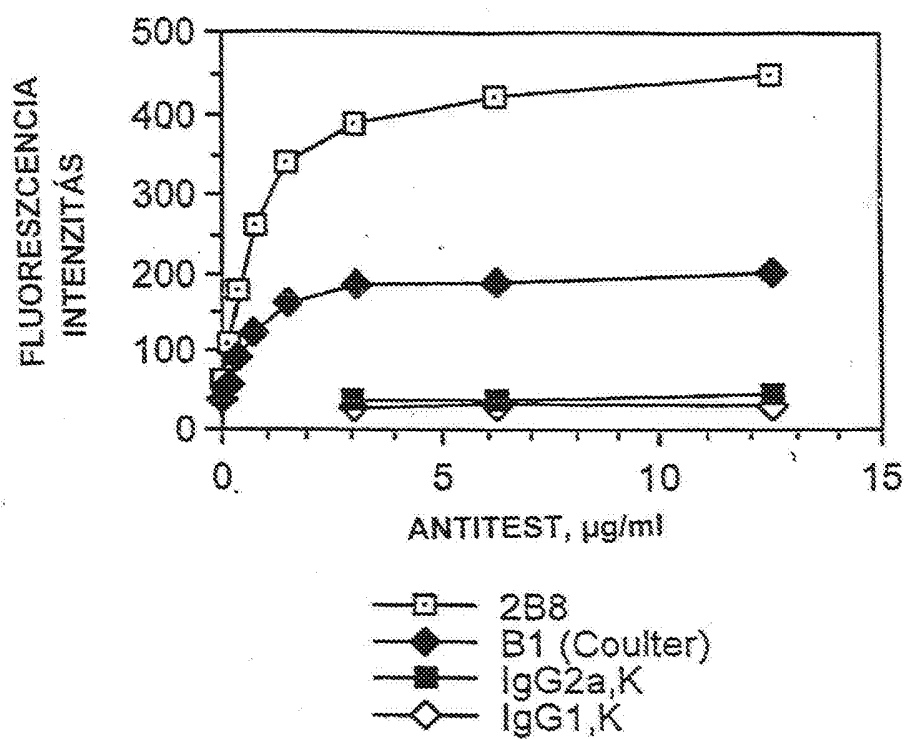
9. A 8. igénypont szerinti eljárás, ahol körülbelül 1 ml-nyi, 0,5-30 mg/ml koncentrációjú MX-DTPA konjugált antitestet keverünk össze a ^{111}In -t tartalmazó oldattal.
10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol a készítménypuffert olyan mennyiségben adjuk, amennyi ahhoz szükséges, hogy 10-50 ml végtérfogatot érjünk el.
11. A 10. igénypont szerinti eljárás, ahol a radioprotektáns a humán szérum albumin (HSA), aszkorbát, aszkorbinsav, fenol, szulfitek, glutation, ciszteín, gentizinsav, nikotinsav, aszkorbil-palmitát, $\text{HOP}(\text{:O})\text{H}_2$, glicerín, nátrium formaldehid szulfoxilát, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ vagy SO_2 .
12. A 11. igénypont szerinti eljárás, ahol a radioprotektáns a HSA.
13. A 12. igénypont szerinti eljárás, ahol a HSA koncentrációja 1-25 tömeg/térfogat %.
14. A 13. igénypont szerinti eljárás, ahol a HSA koncentrációja körülbelül 7,5 tömeg/térfogat %.
15. A 14. igénypont szerinti eljárás, ahol a radioprotektáns aszkorbát.
16. A 15. igénypont szerinti eljárás, ahol az aszkorbát koncentrációja 1-100 mg/ml.
17. A 16. igénypont szerinti eljárás, ahol a nem konjugált kelátképző DTPA vagy EDTA.
18. A 17. igénypont szerinti eljárás, ahol a DTPA koncentrációja körülbelül 1mM.

1. ábra



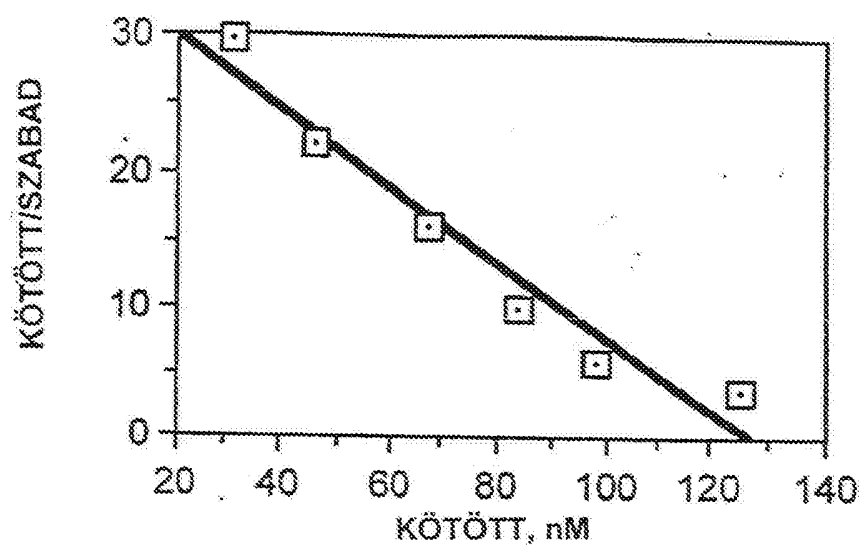
2. ábra

A 2B8-nak a humán B-sejteken jelenlévő CD20 antigénhez való kötésének FACS analízise



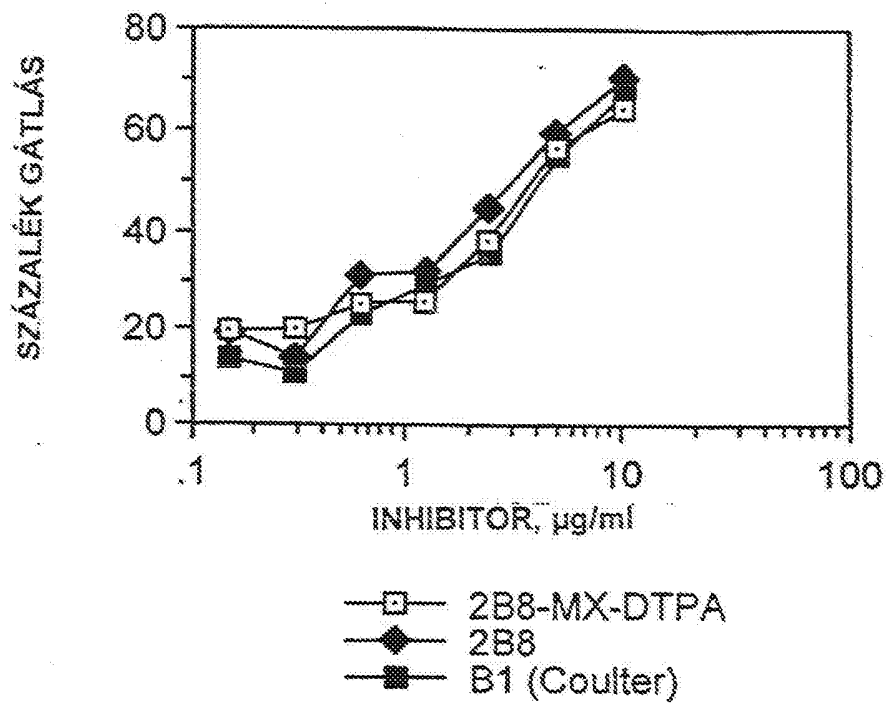
3. ábra

A 2B8 B-sejtekhez való kötődésének Scatchard analízise



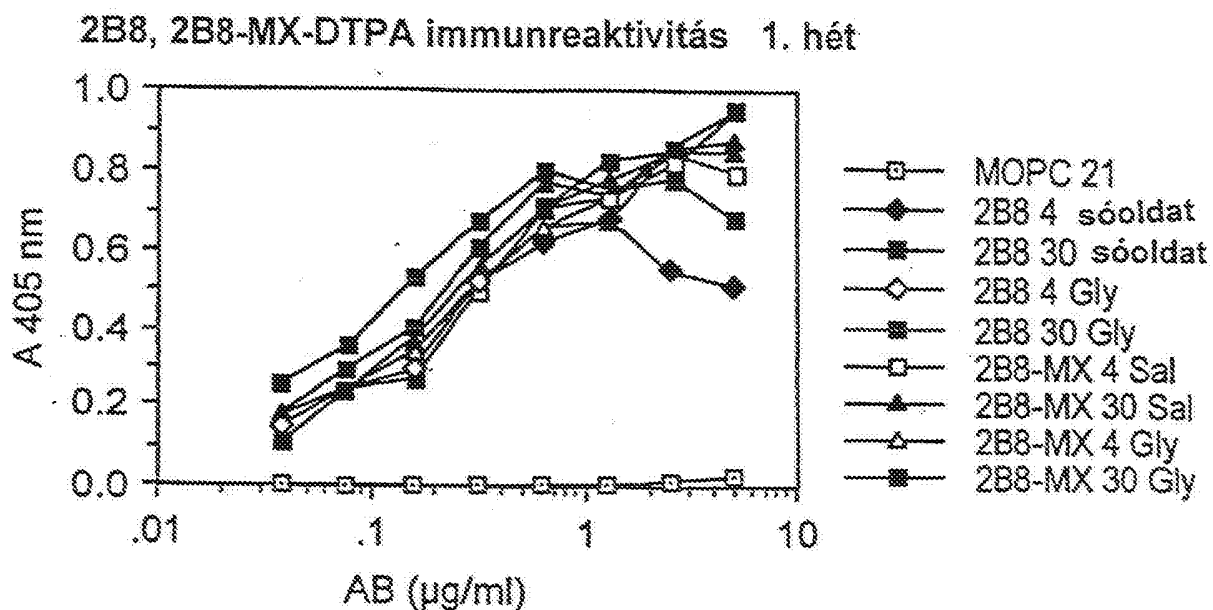
4. ábra

Radioaktívan jelölt B1 anti-CD20 MAb gátlása
jelöletlen B1-gyel, 2B8-cal és MX-DTPA-val konjugált 2B8-cal



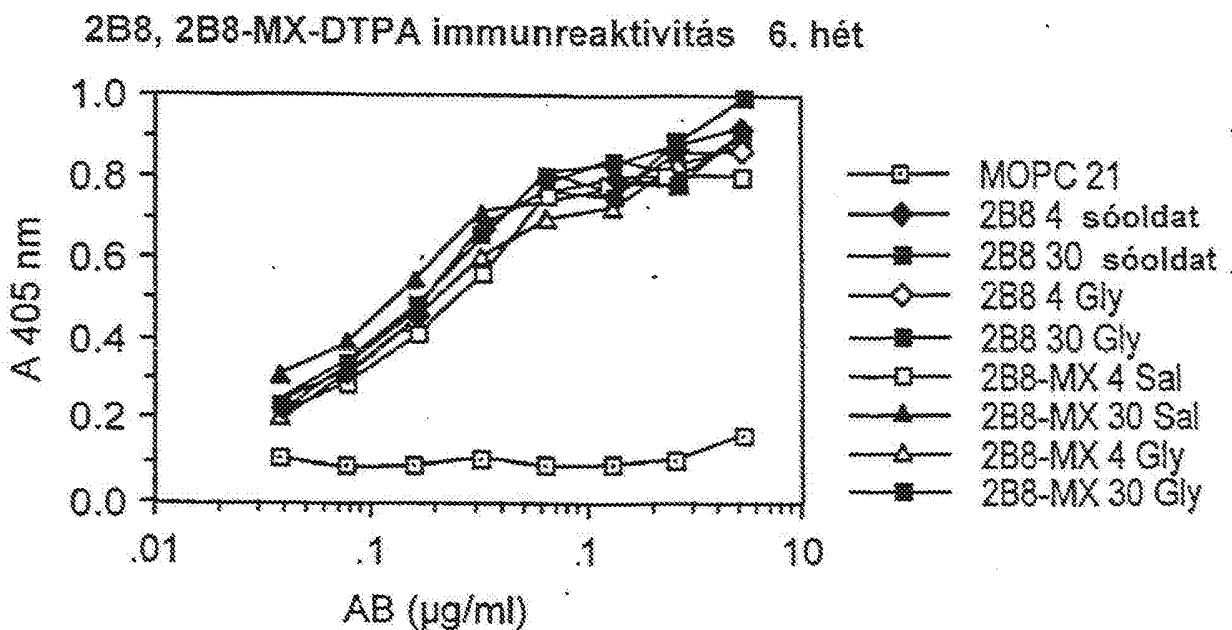
5A. ábra

A 2B8 immunreaktivitása az inkubálás alatt 4°C-on és 30°C-on



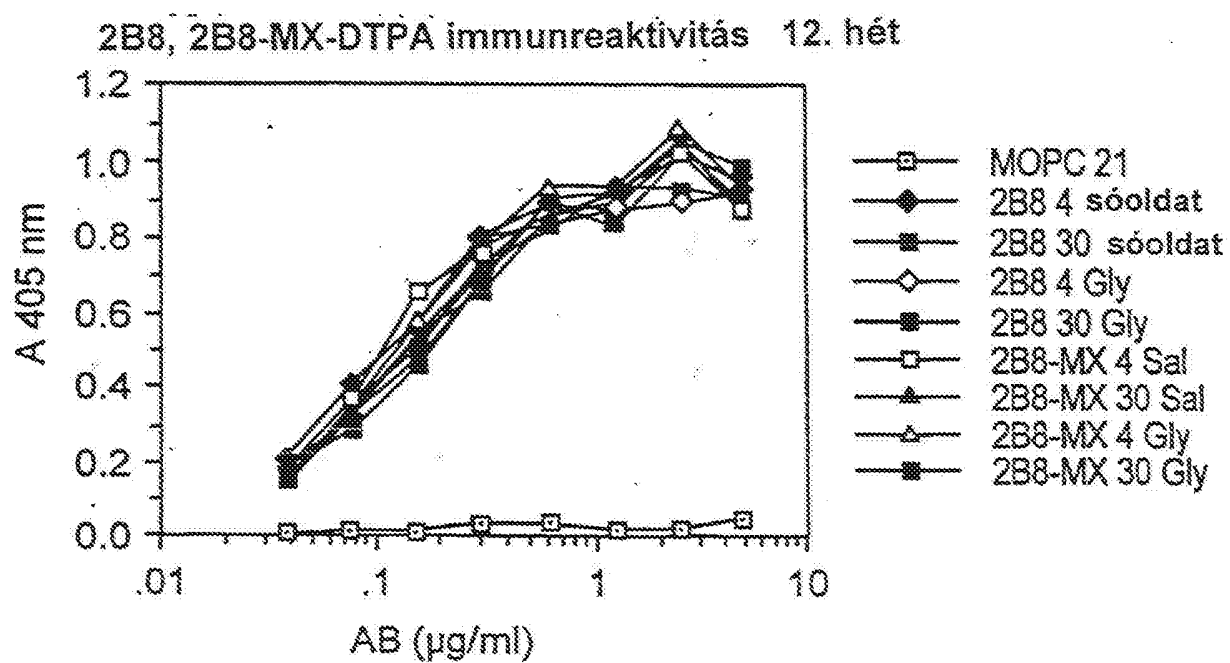
5B. ábra

A 2B8 immunreaktivitása az inkubálás alatt 4°C-on és 30°C-on



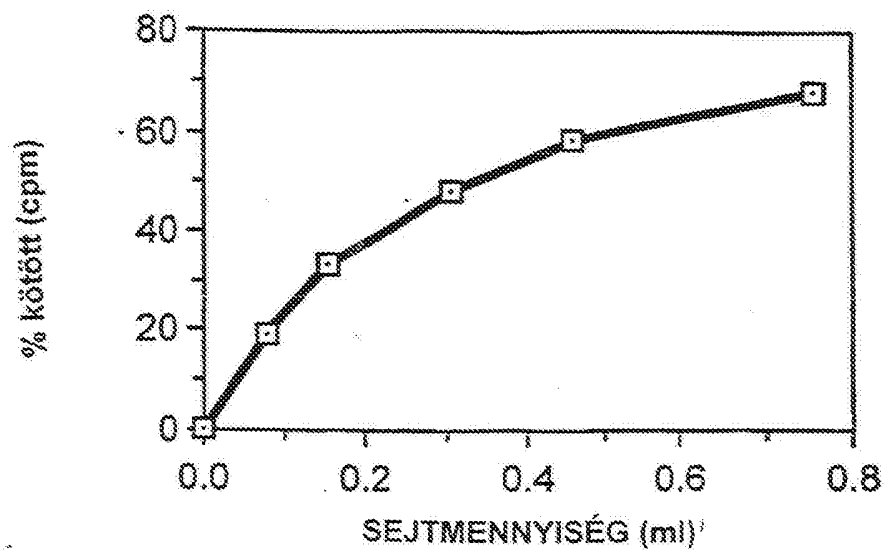
5C. ábra

A 2B8 immunreaktivitása az inkubálás alatt 4°C-on és 30°C-on



6A. ábra

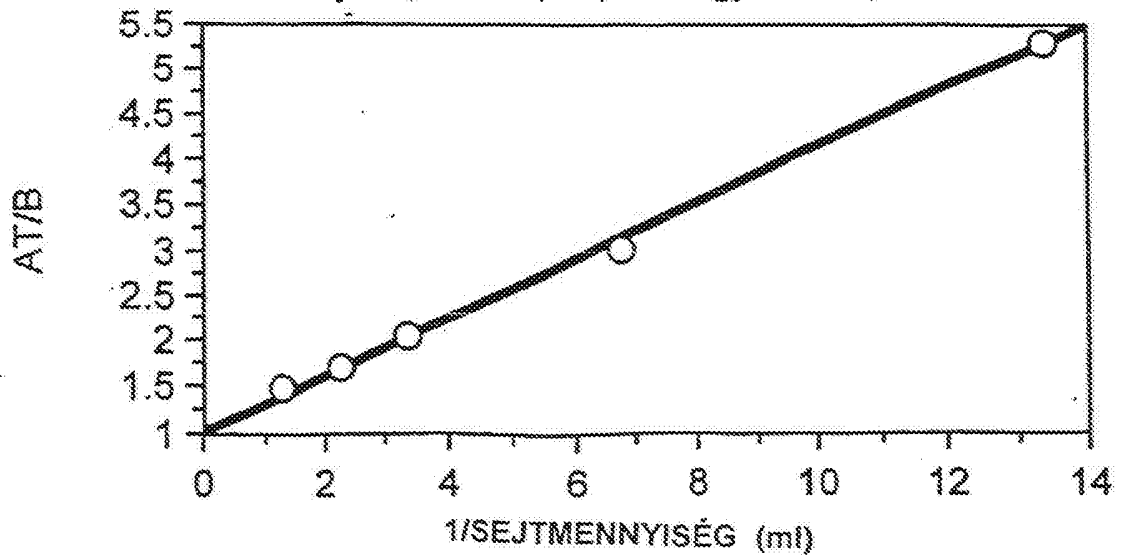
A ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA kötődése
a CD-20-pozitív humán sejtekhez



6B. ábra

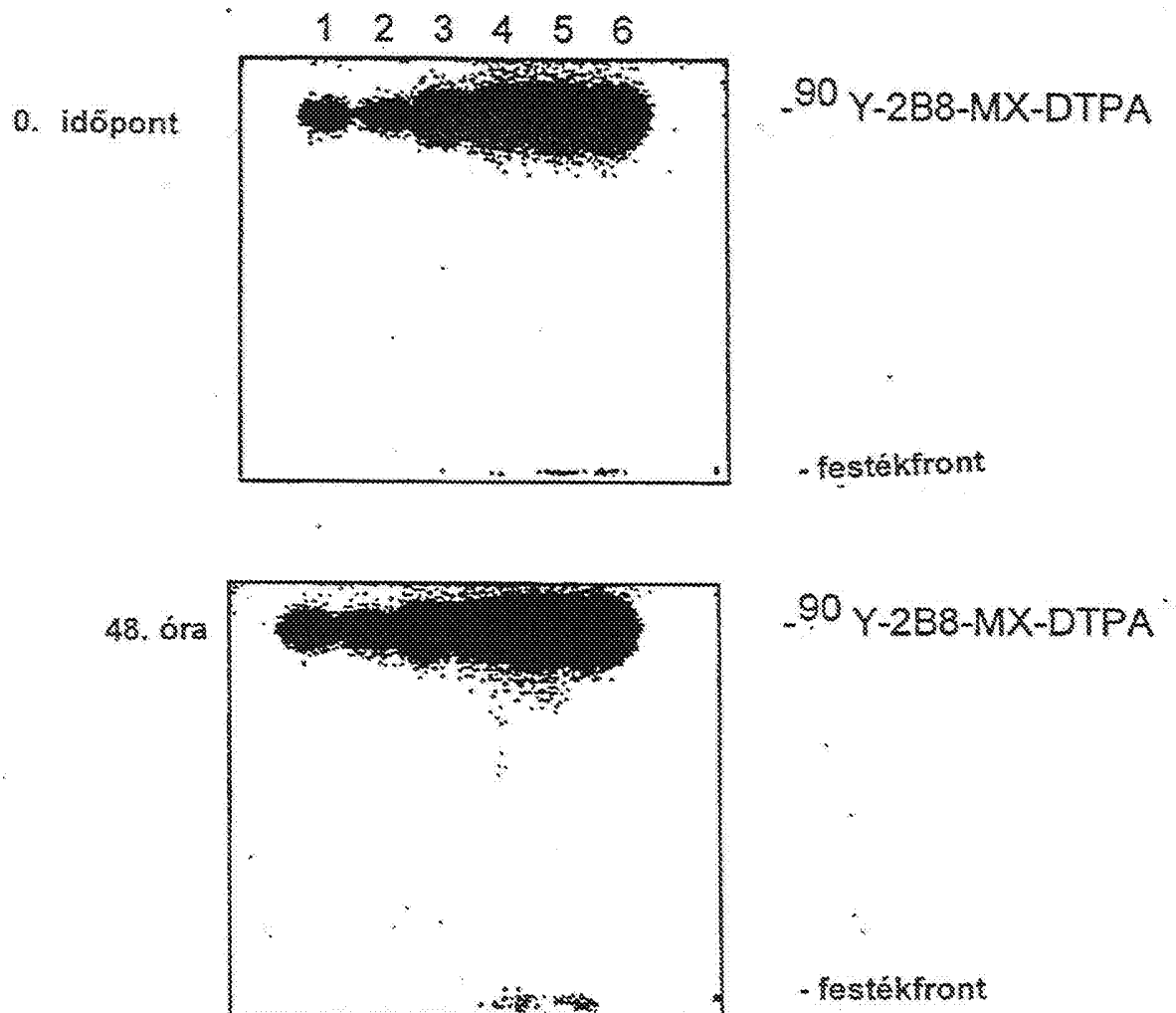
A ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA kötődése
a CD-20-pozitív humán sejtekhez

$$y = 0,319x + 0,997, R \text{ a négyzetben: } 0,998$$



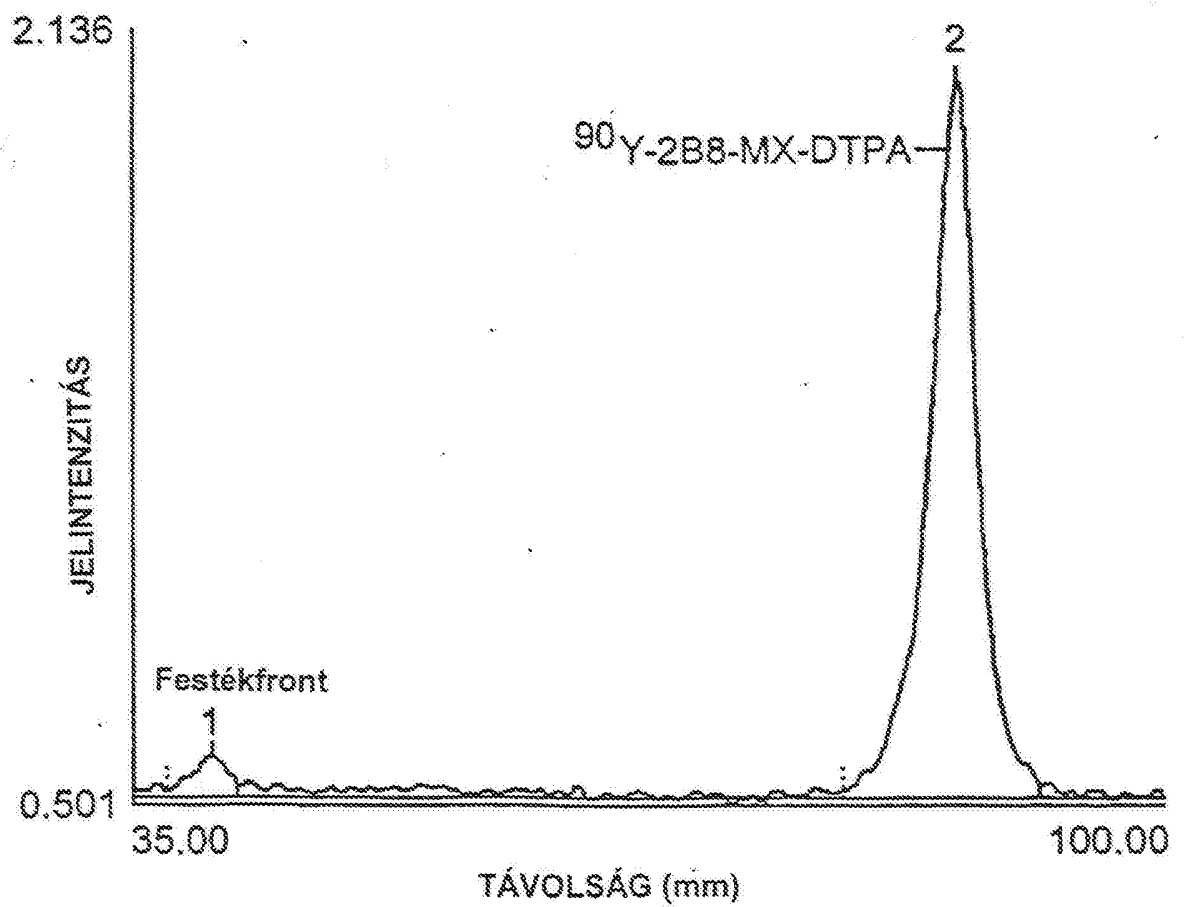
7. ábra

A ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása humán
szérumalbumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben



8. ábra

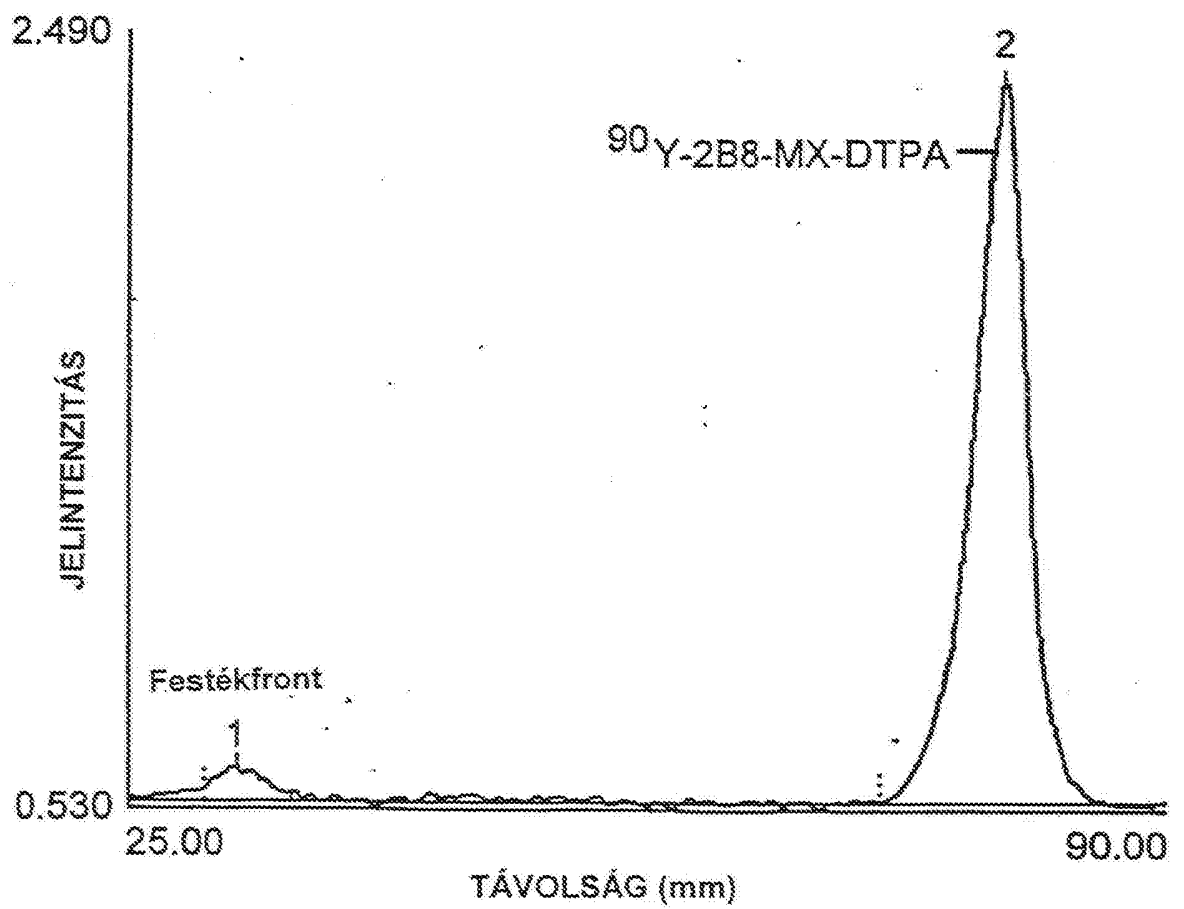
A ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása humán szérumalbumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben



39/10

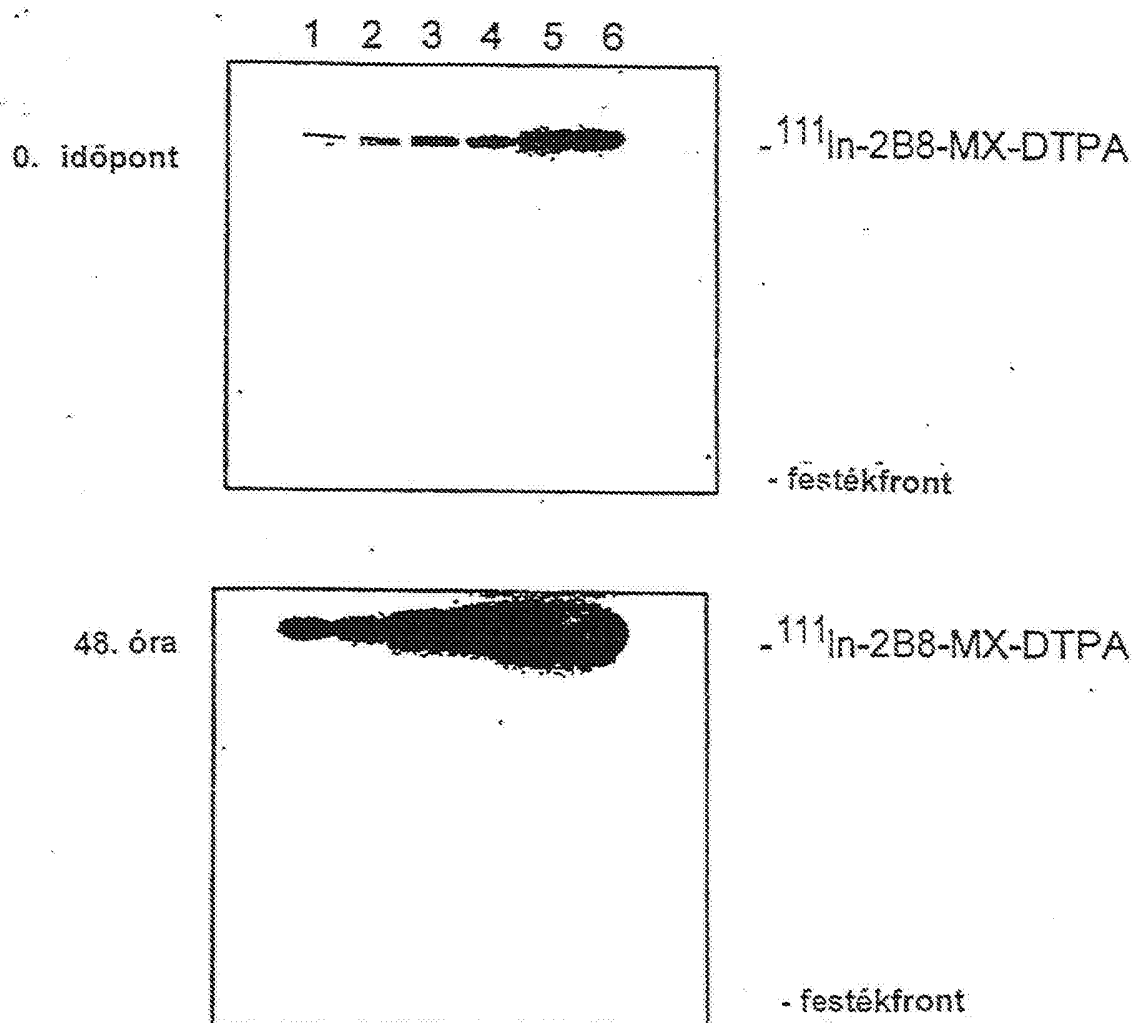
9. ábra

A ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása humán szérumalbumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben



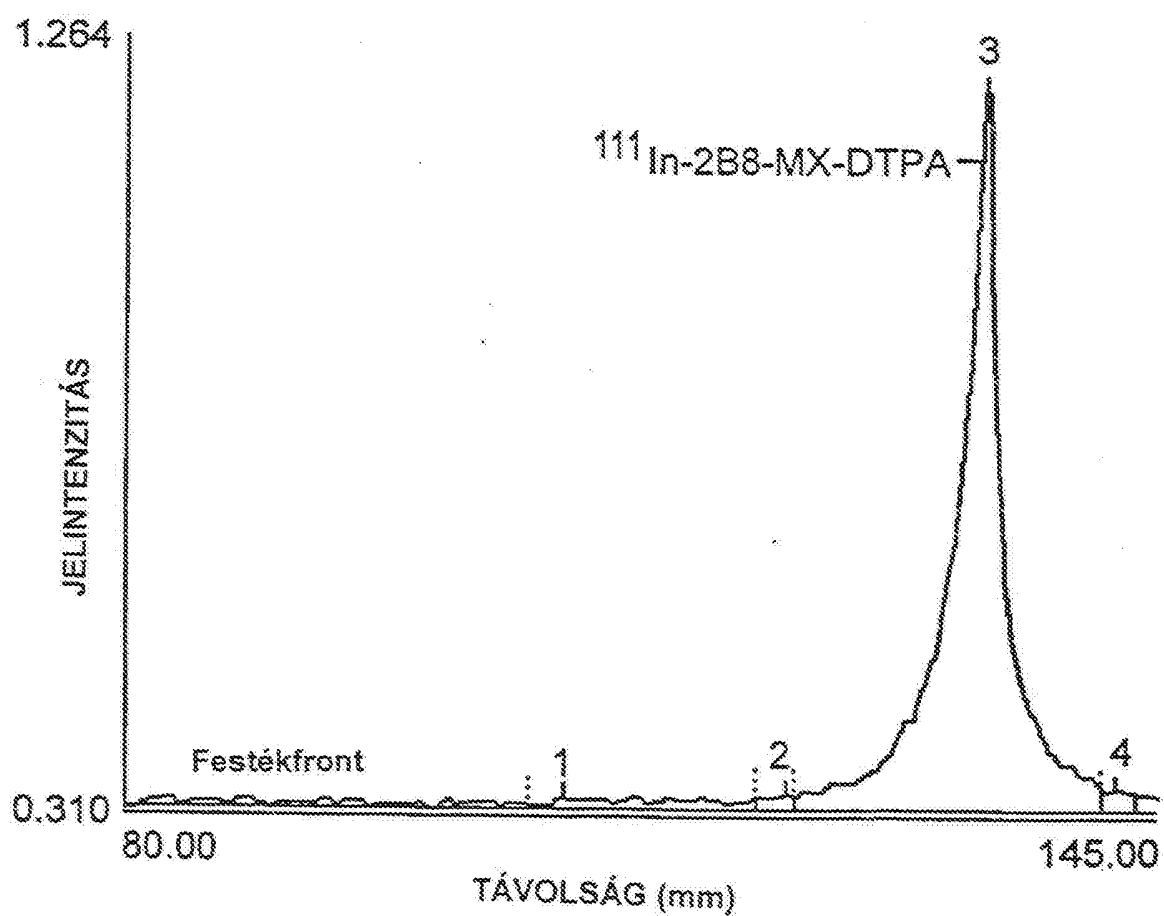
10. ábra

A ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása humán szérumalbumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben



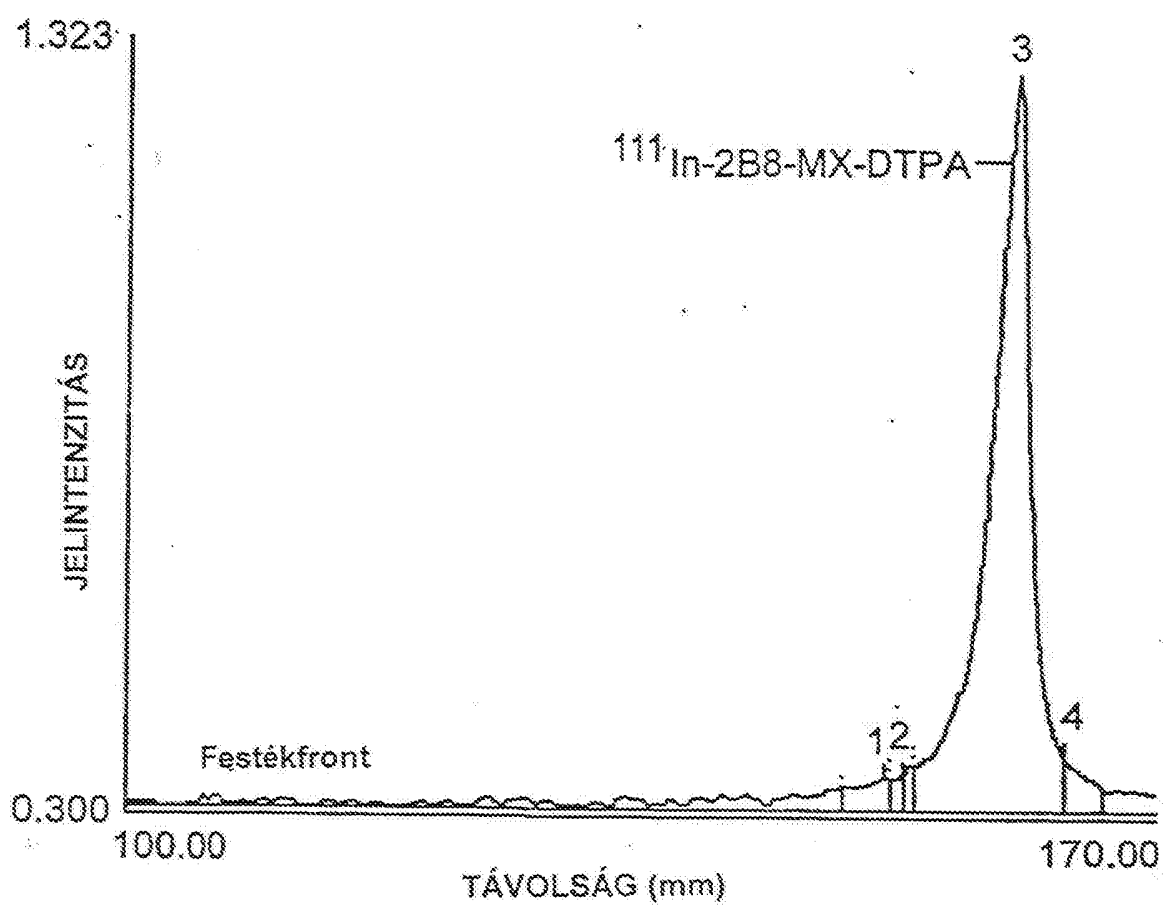
11. ábra

A ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása humán
szérumalbumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben



12. ábra

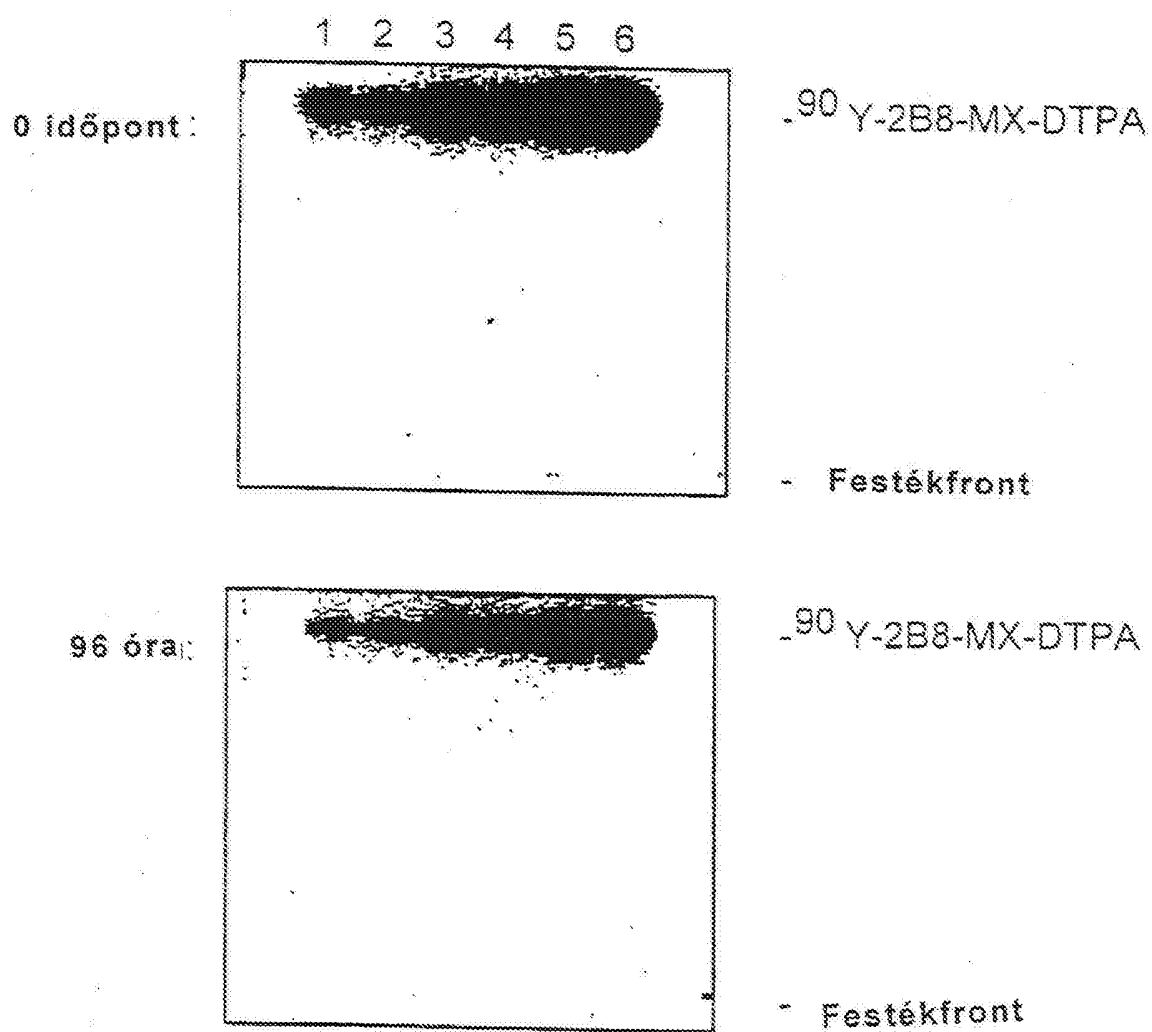
A ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása humán szérumalbumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben



39/14

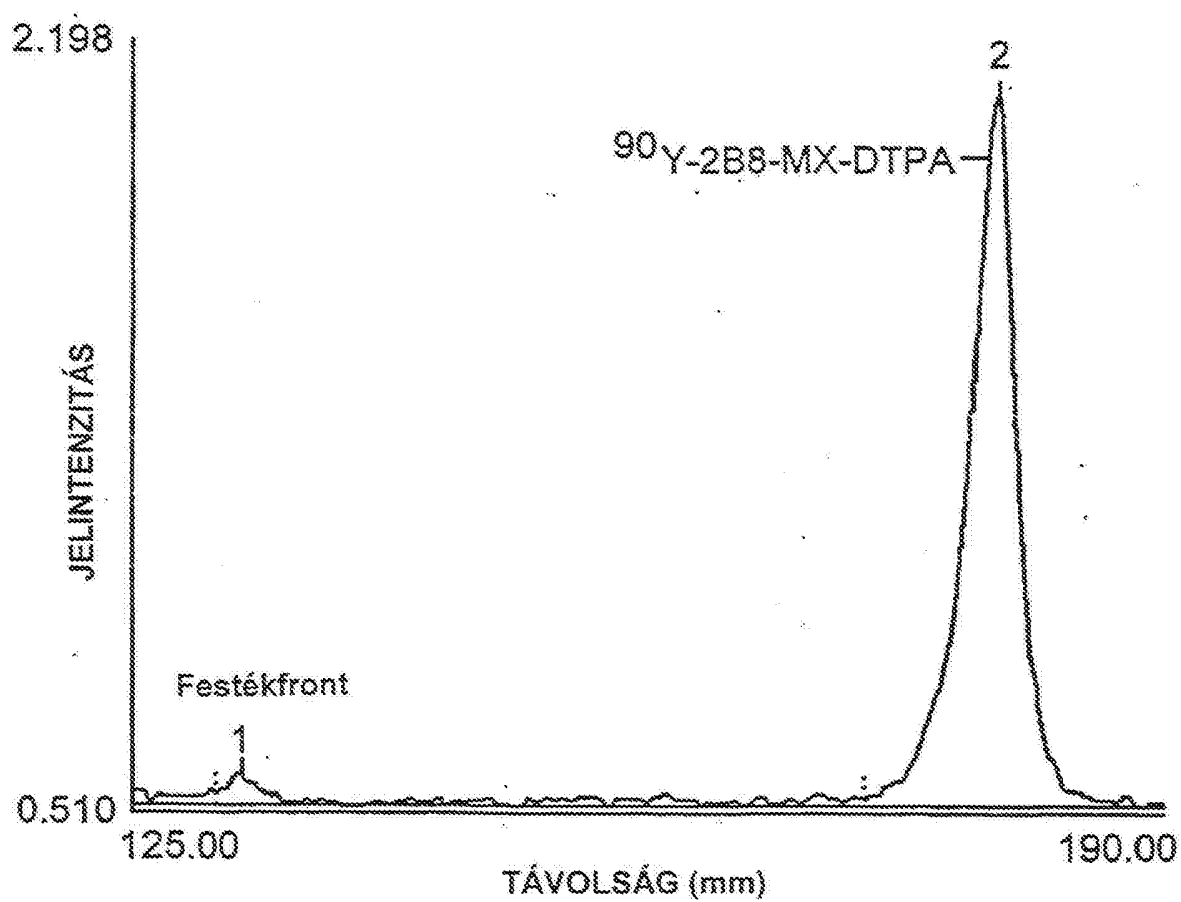
13. ábra

Humán szérumban inkubált ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro*
stabilitása



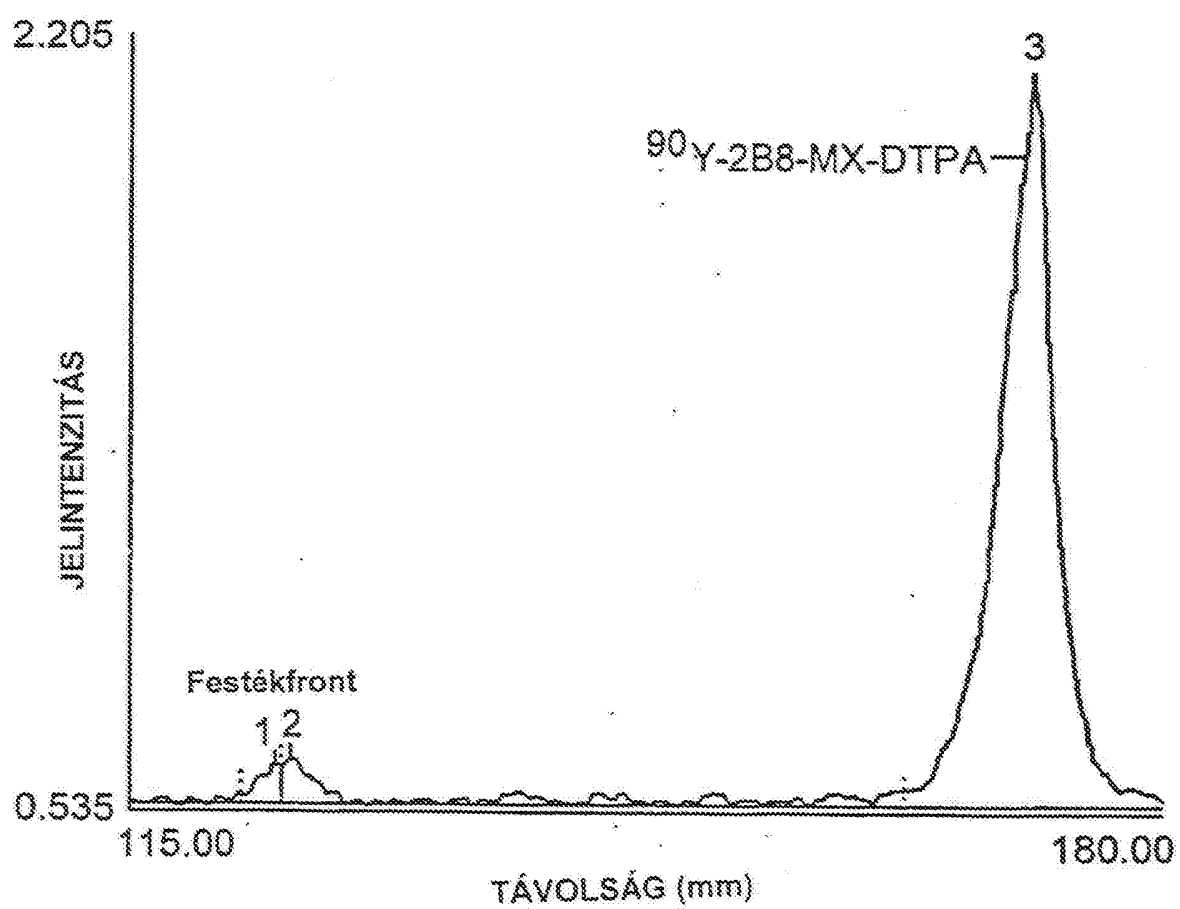
14. ábra

Humán szérumban inkubált ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása



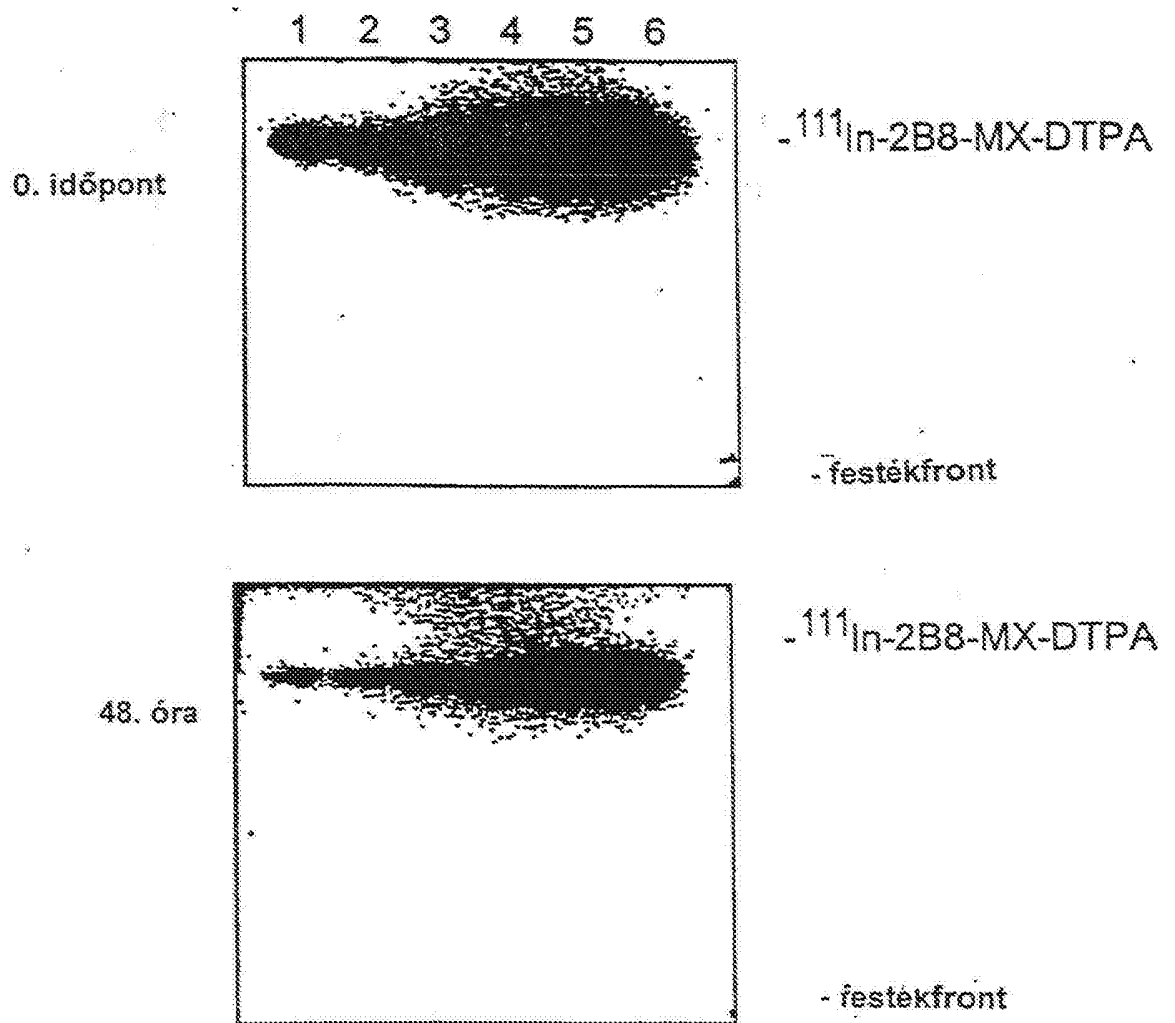
15. ábra

Humán szérumban inkubált ^{90}Y -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása



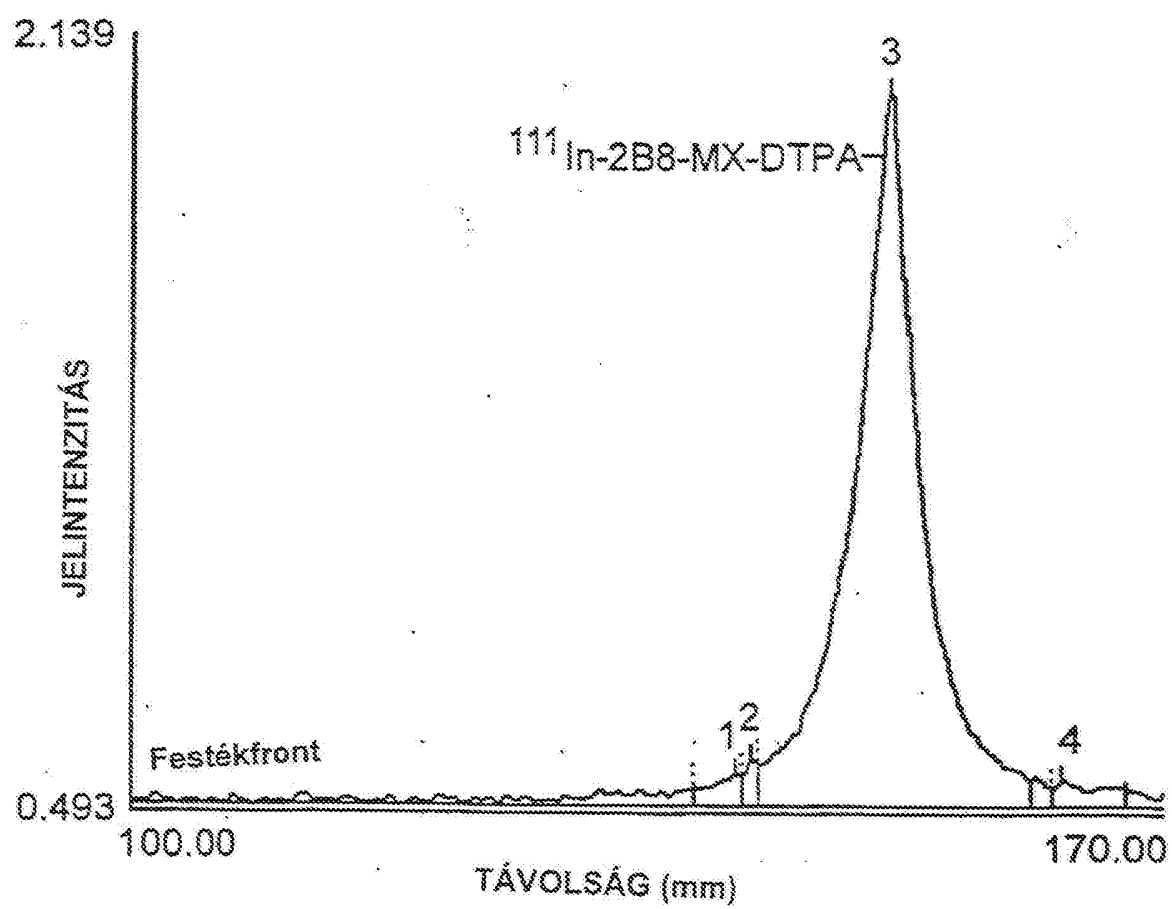
16. ábra

Humán szérumban inkubált ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása



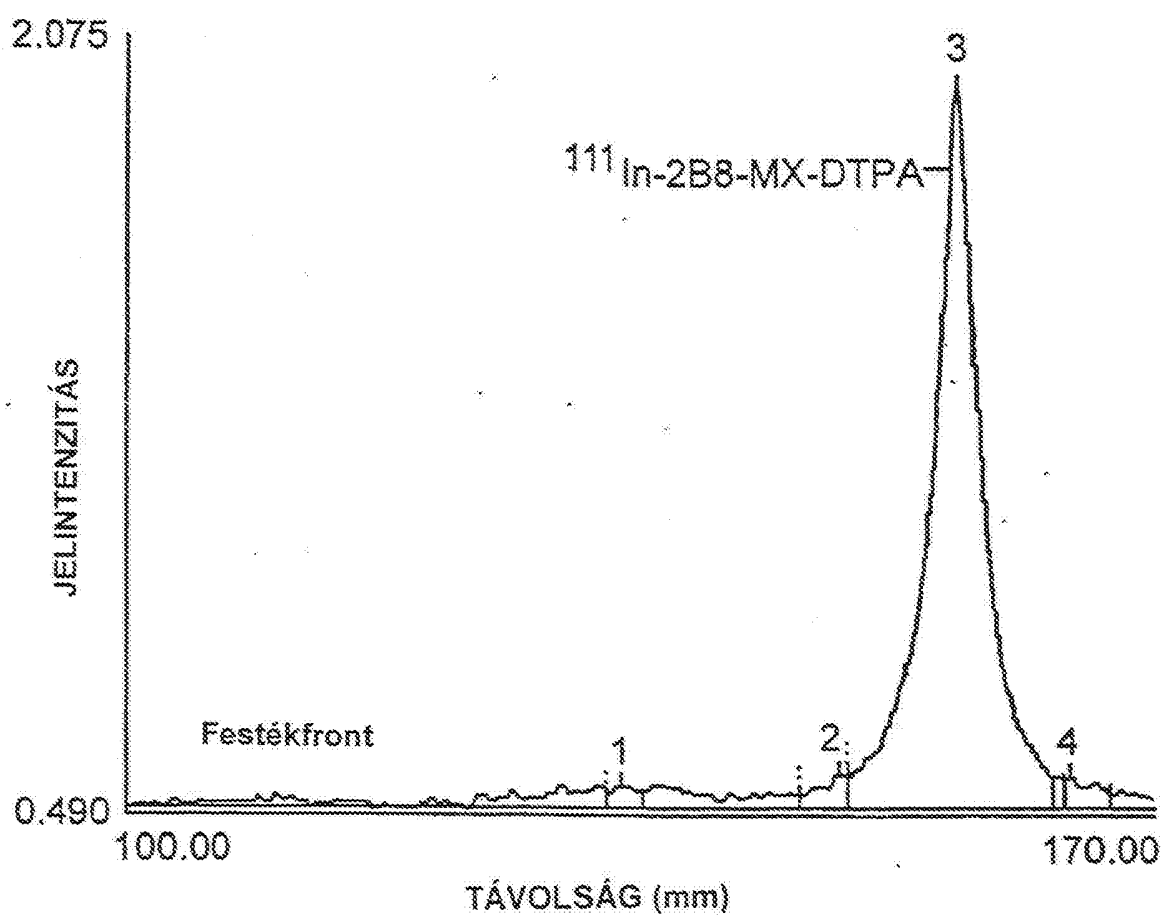
17. ábra

Humán szérumban inkubált ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása



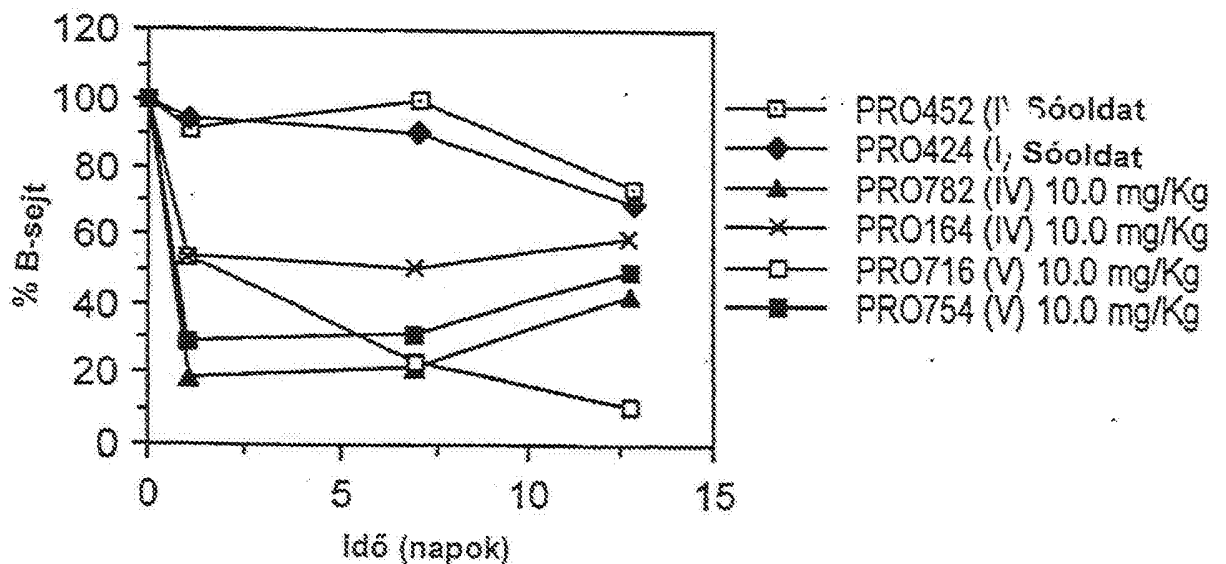
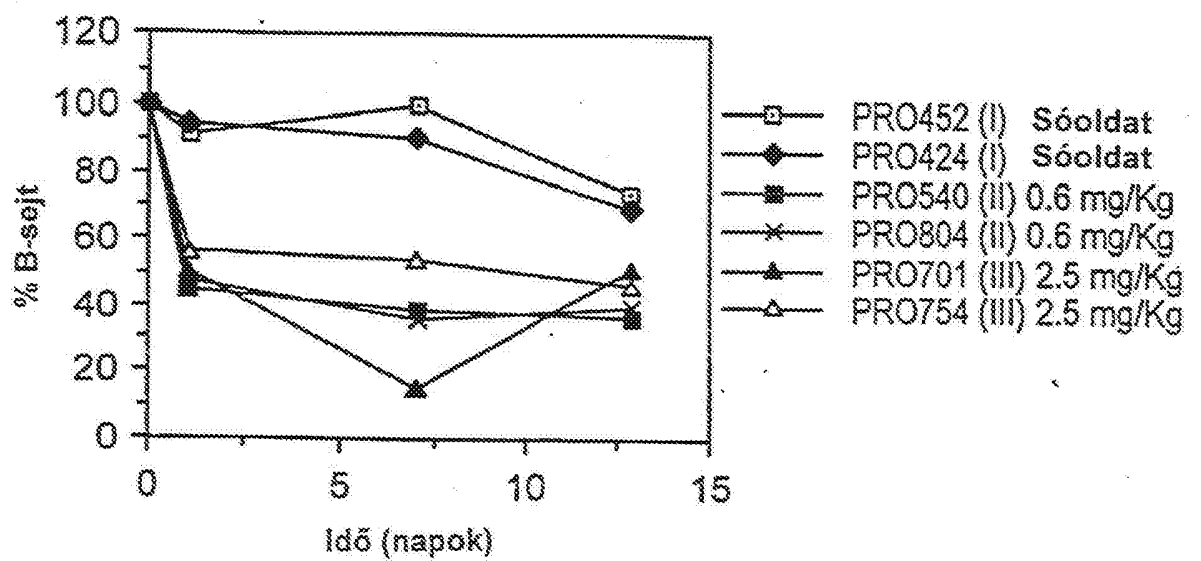
18. ábra

Humán szérumban inkubált ^{111}In -jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása



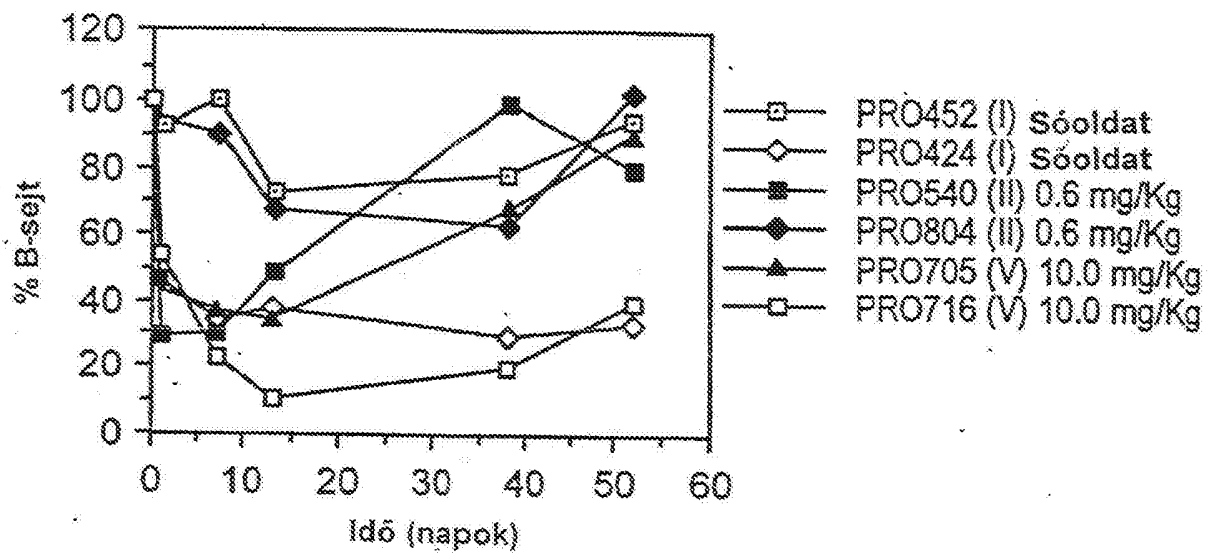
19. ábra

A 2B8 infúzió hatása a B-limfocita-szintekre
jávai makákókon a 0-13. napon



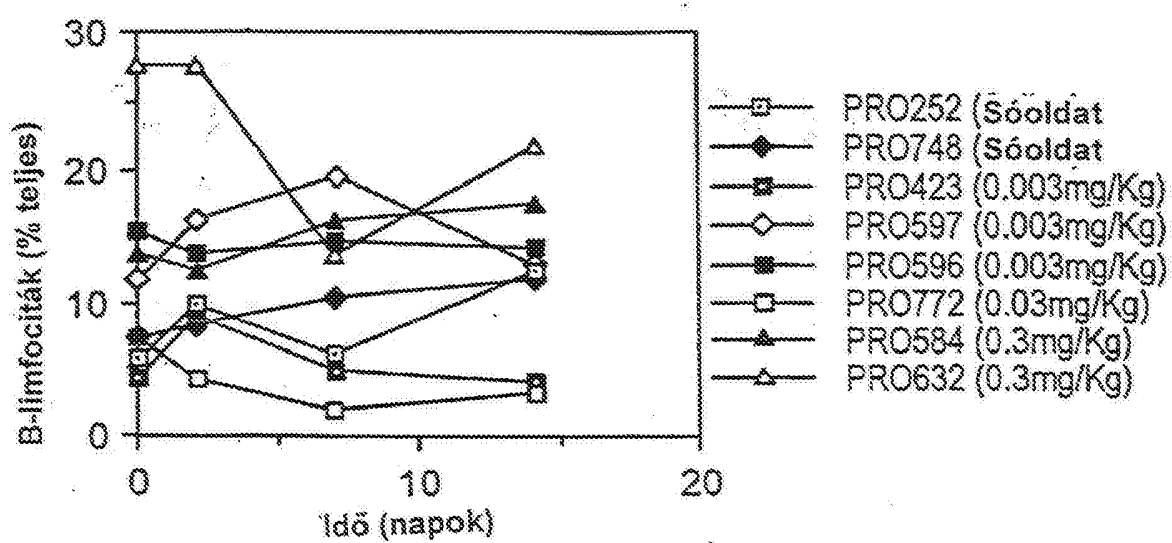
20. ábra

A keringő B-sejt szintek helyreállása
egér 2B8 anti-CD20 antitestekkel oltott jávai makákókban



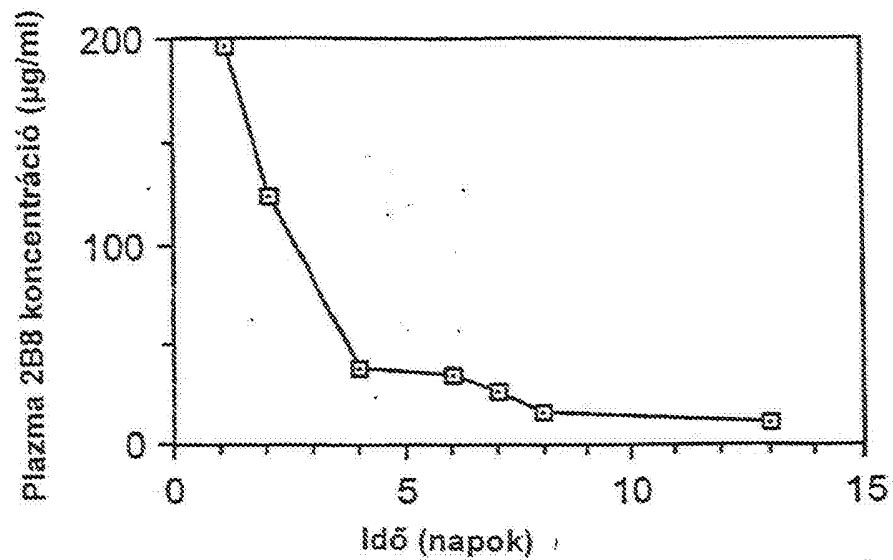
21. ábra

A 2B8-MX-DTPA hatása a keringő B-sejtekre jávai makákókban



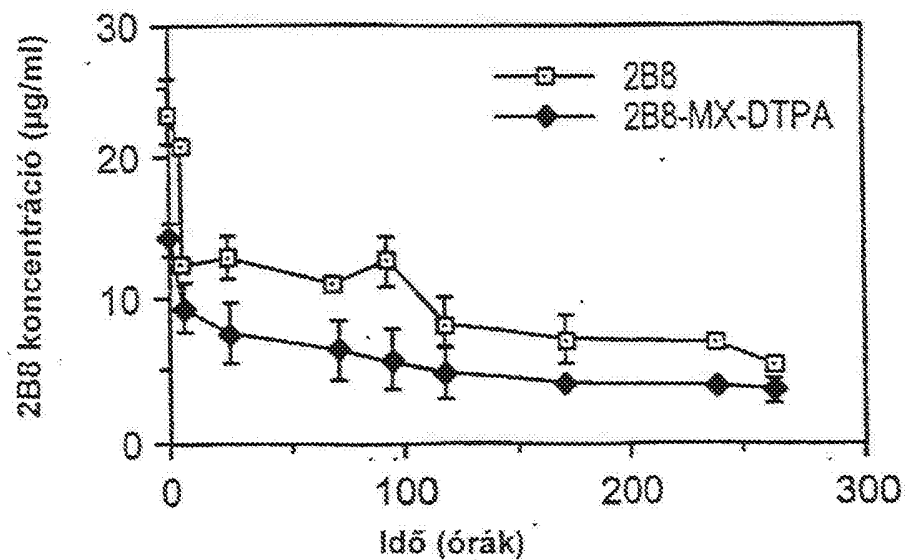
22A. ábra

A 2B8 kiürülése a jávai makákókból egyetlen,
10 mg/kg injekció után

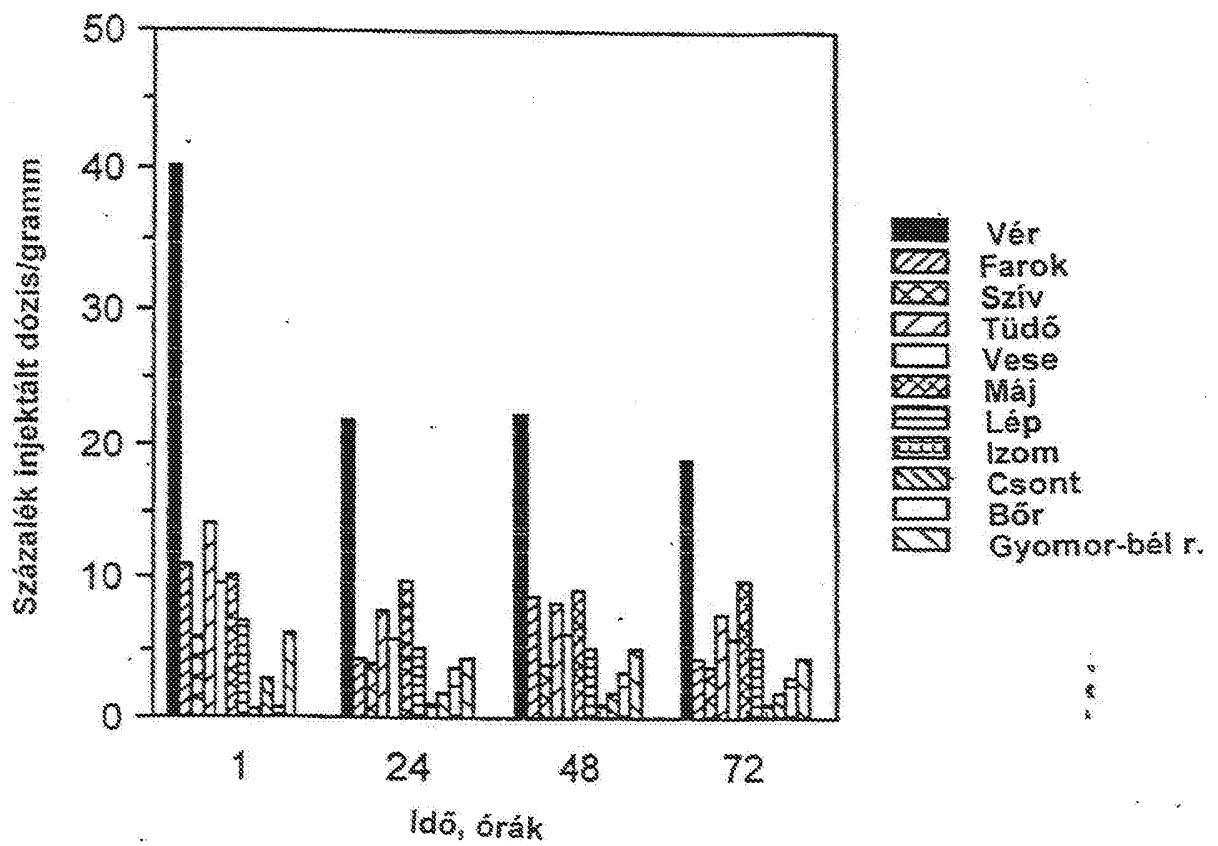


22B. ábra

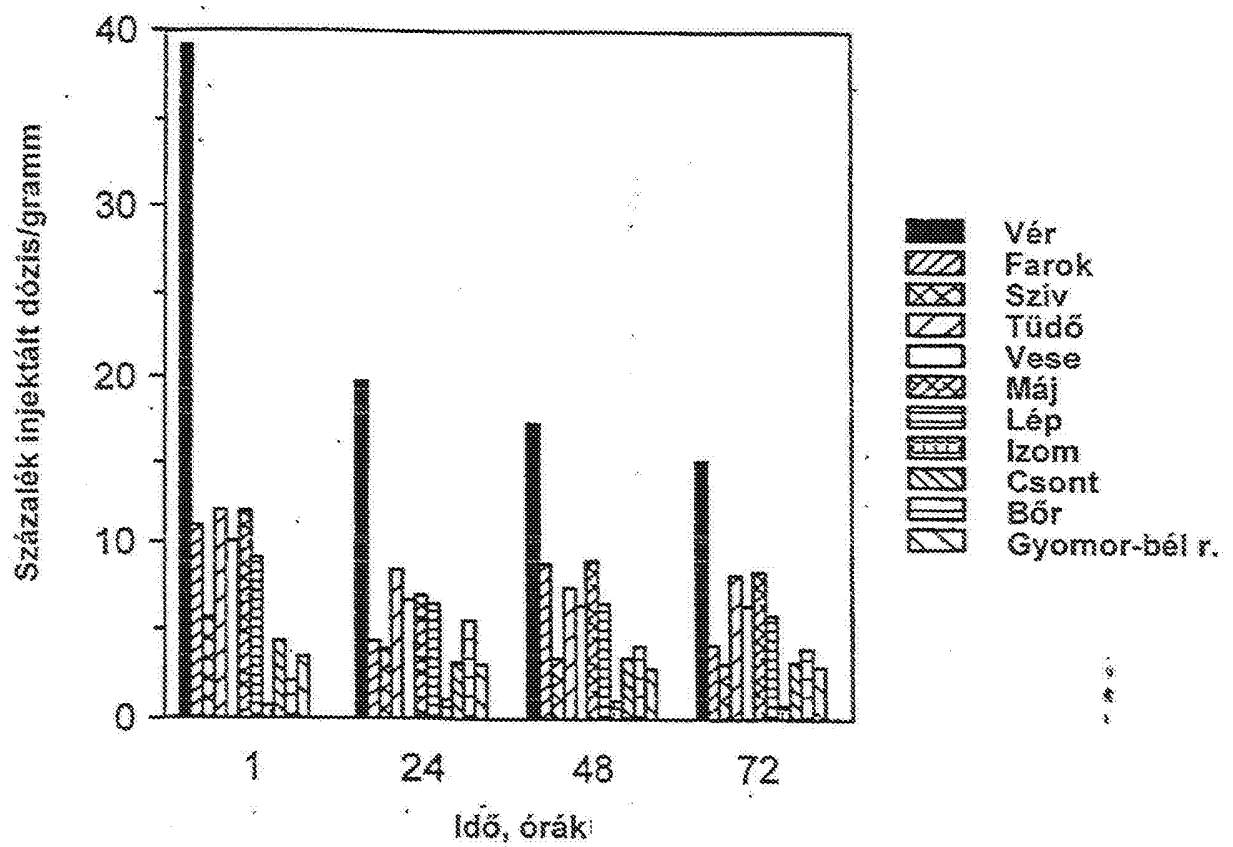
A 2B8, 2B8-MX-DTPA kiürülése a vérből BALB/c egerekben



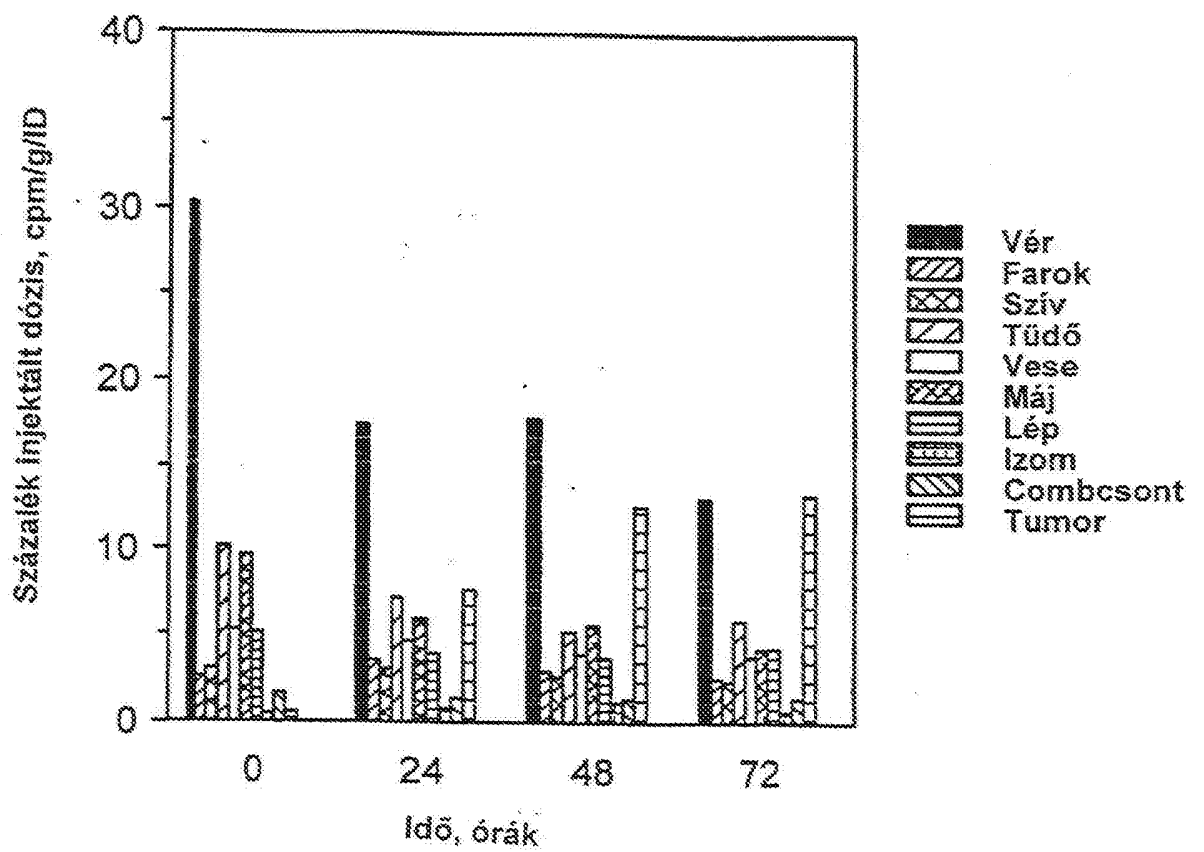
23. ábra
A $[^{111}\text{In}]\text{-2B8-MX-DTPA}$ biológiai megoszlása



24. ábra
A [90]-Y-2B8-MX-DTPA biológiai megoszlása

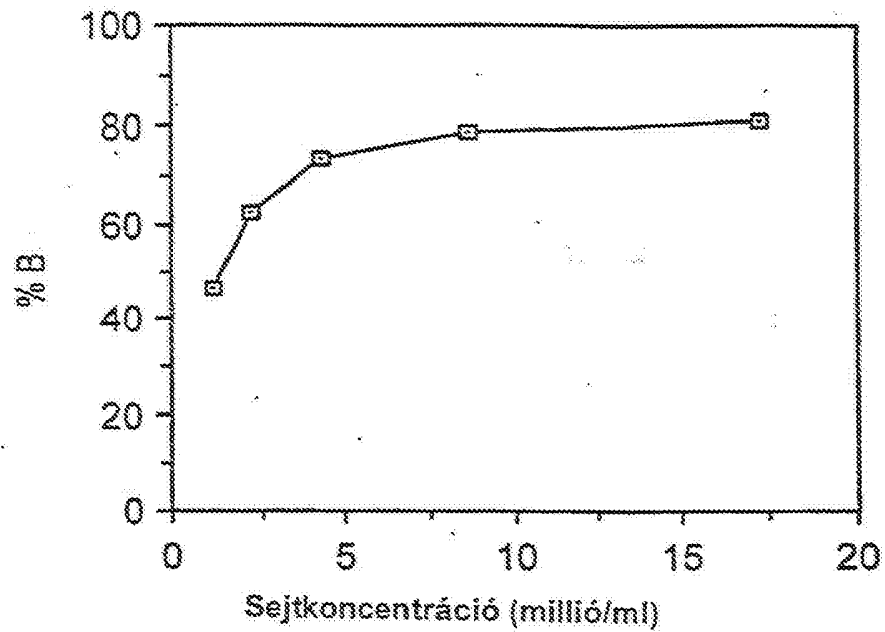


25. ábra
[111]-In-2B8-MX-DTPA tumorlokalizációja



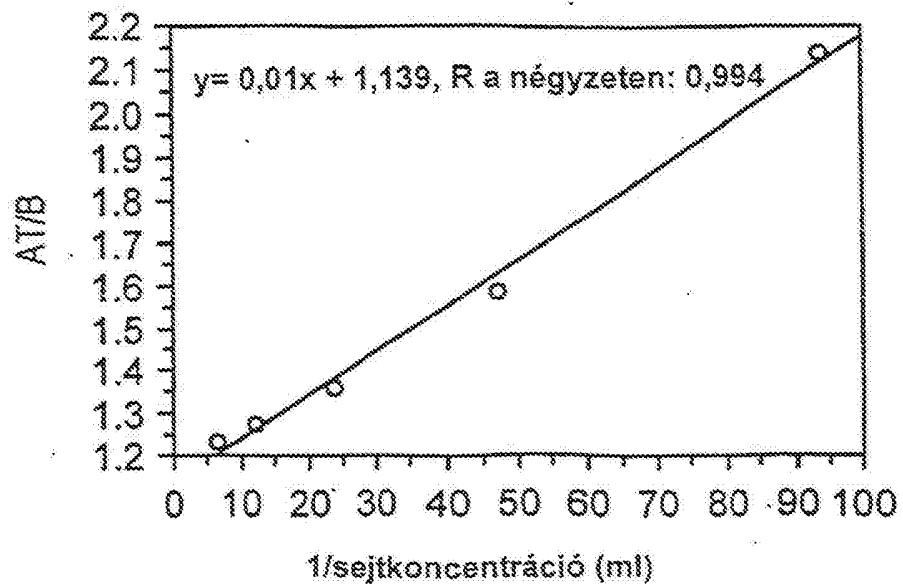
26A. ábra

A ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA kötődése CD20-pozitív humán sejtekhez



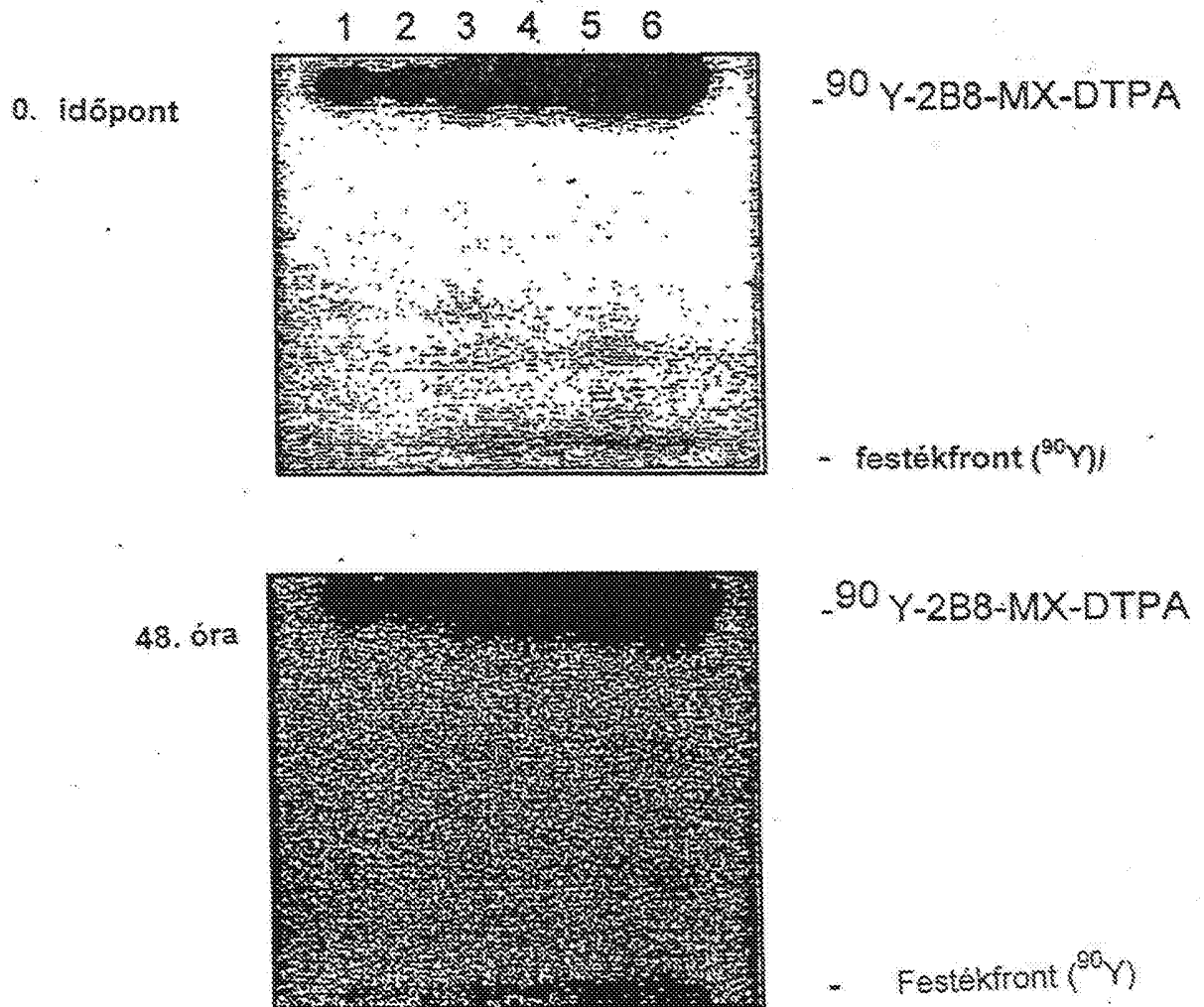
26B. ábra

A ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA kötődése CD20-pozitív humán sejtekhez



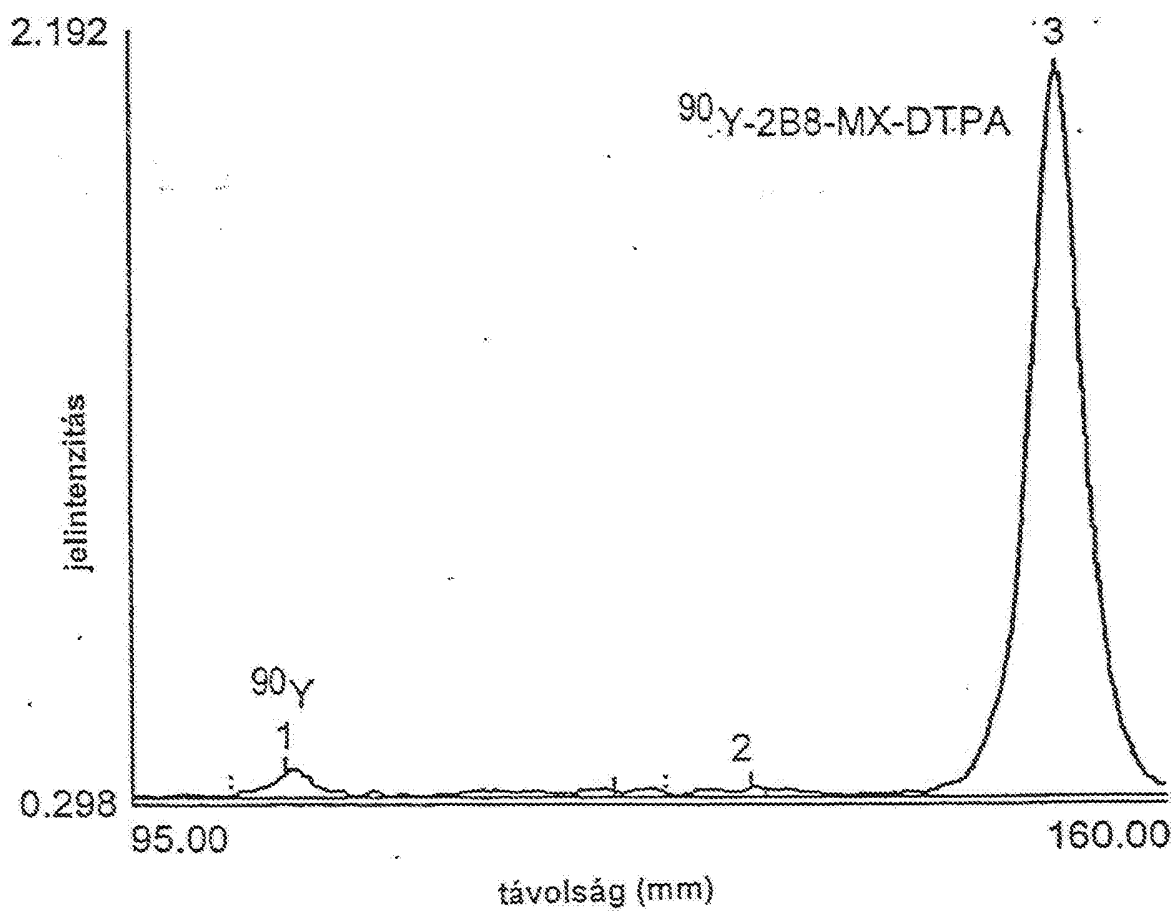
27. ábra

A ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA in vitro stabilitása humán szérumalbumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben



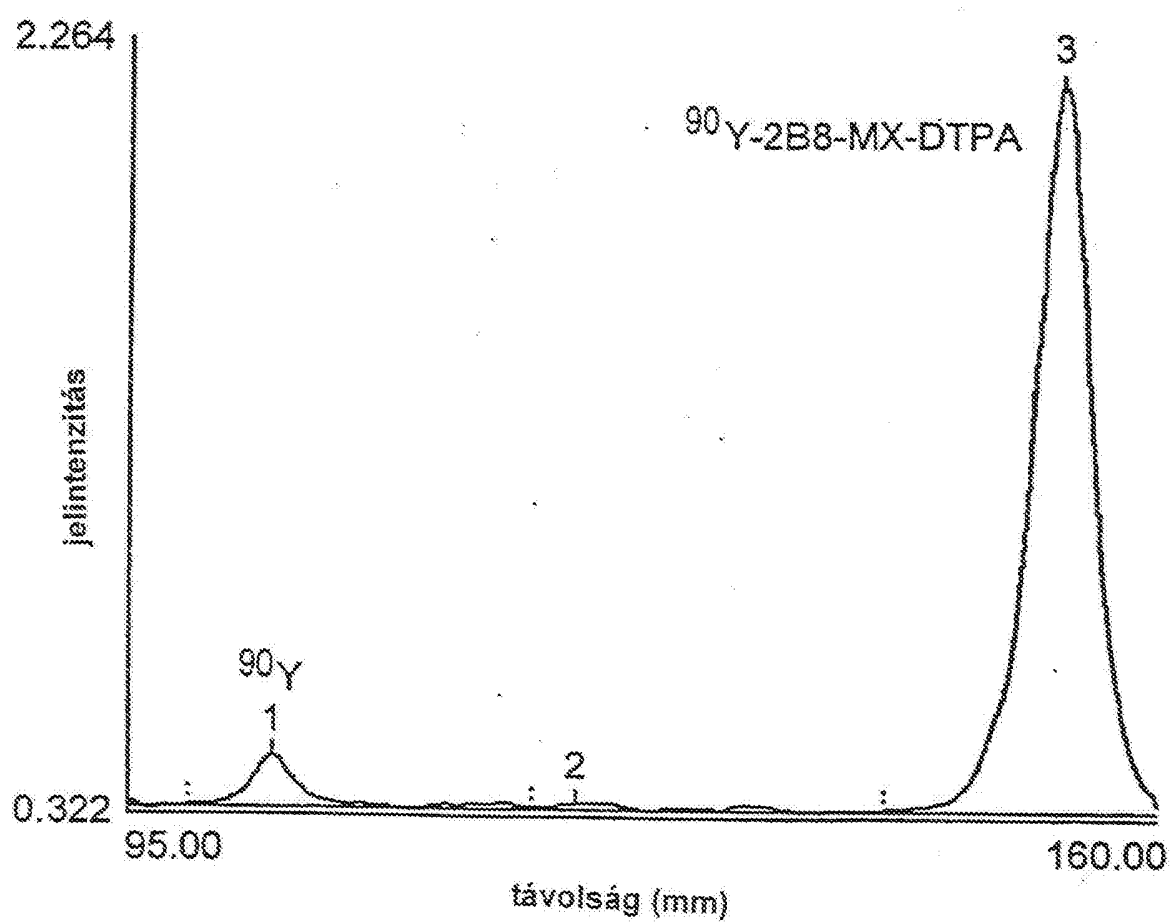
28. ábra

A ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása humán szérumalbumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben

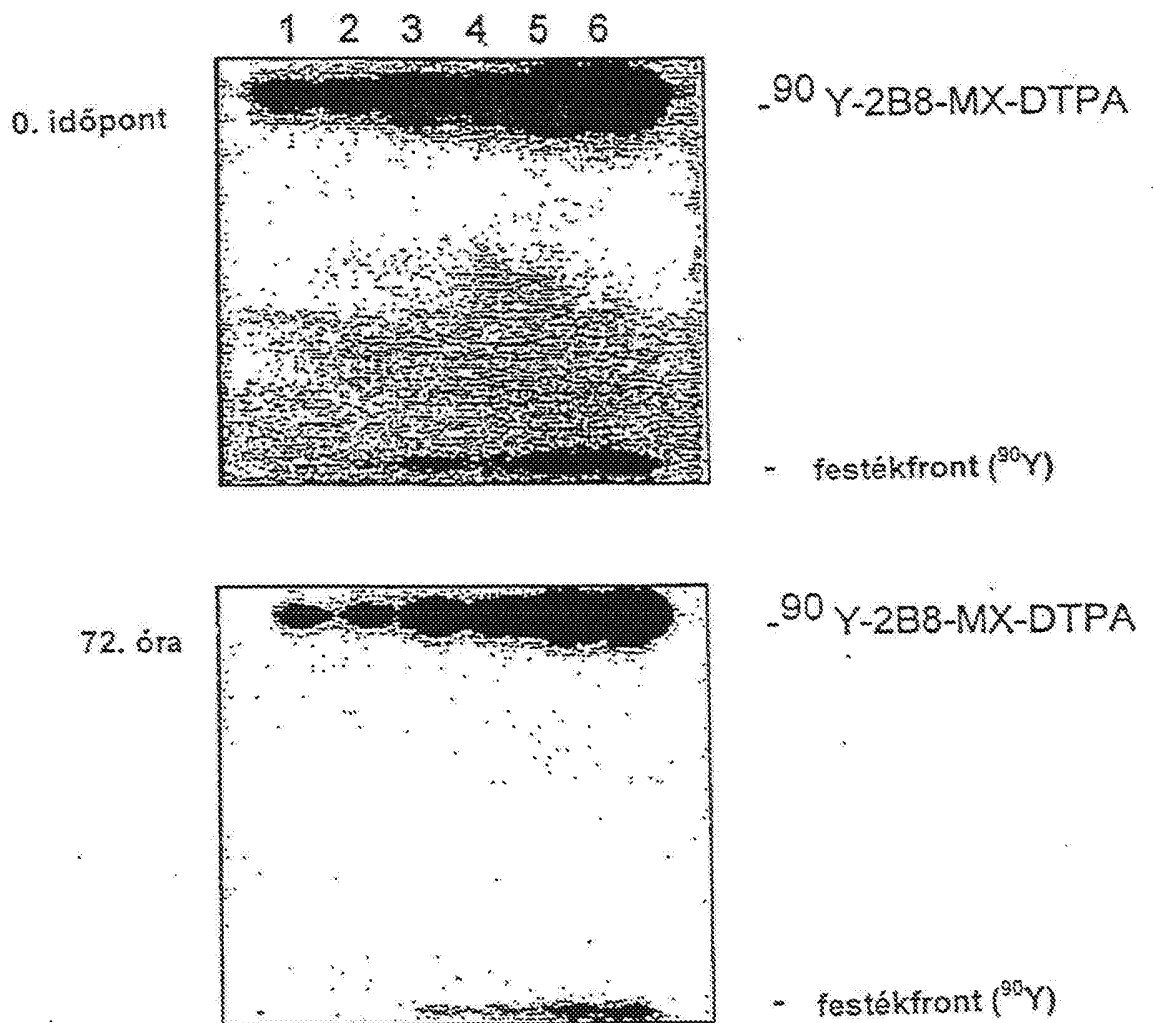


29. ábra

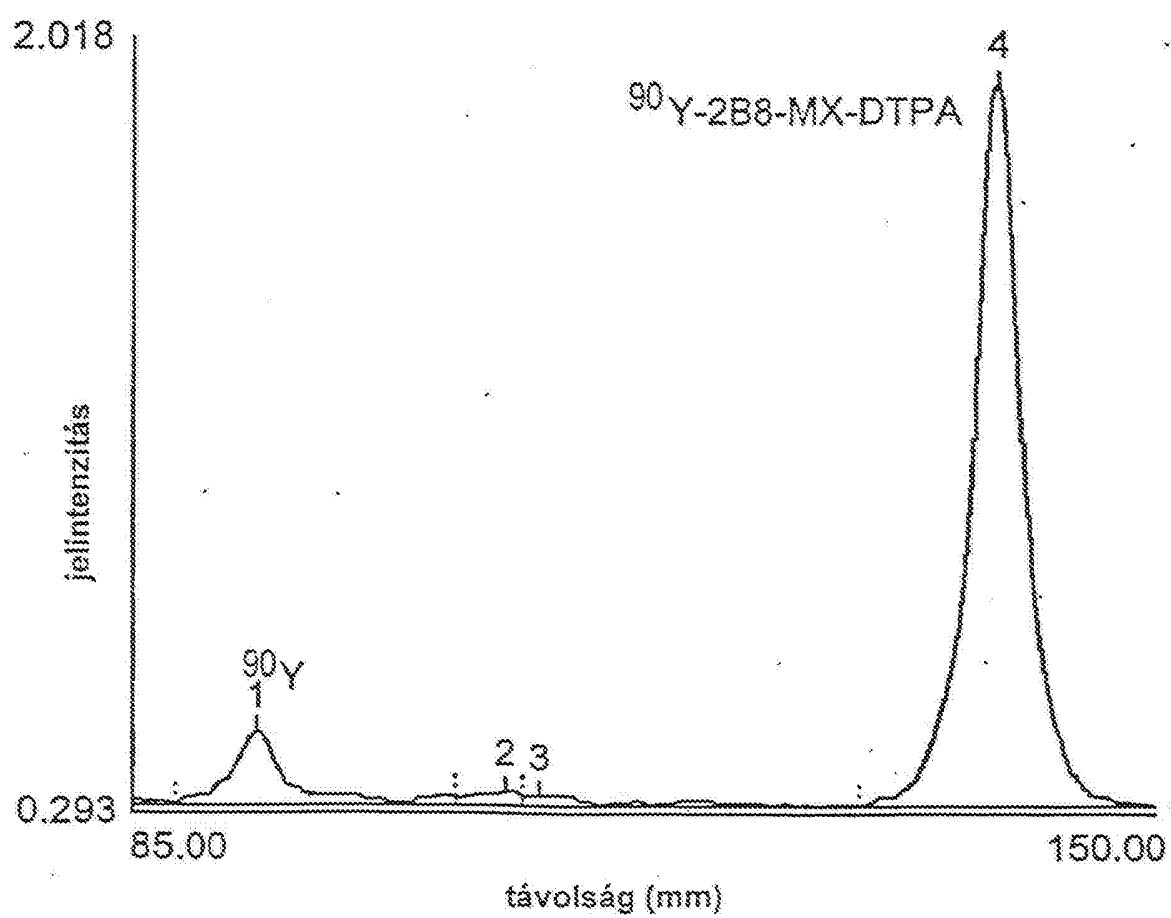
A ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA *in vitro* stabilitása humán szérumalbumint és DTPA-t tartalmazó PBS-ben



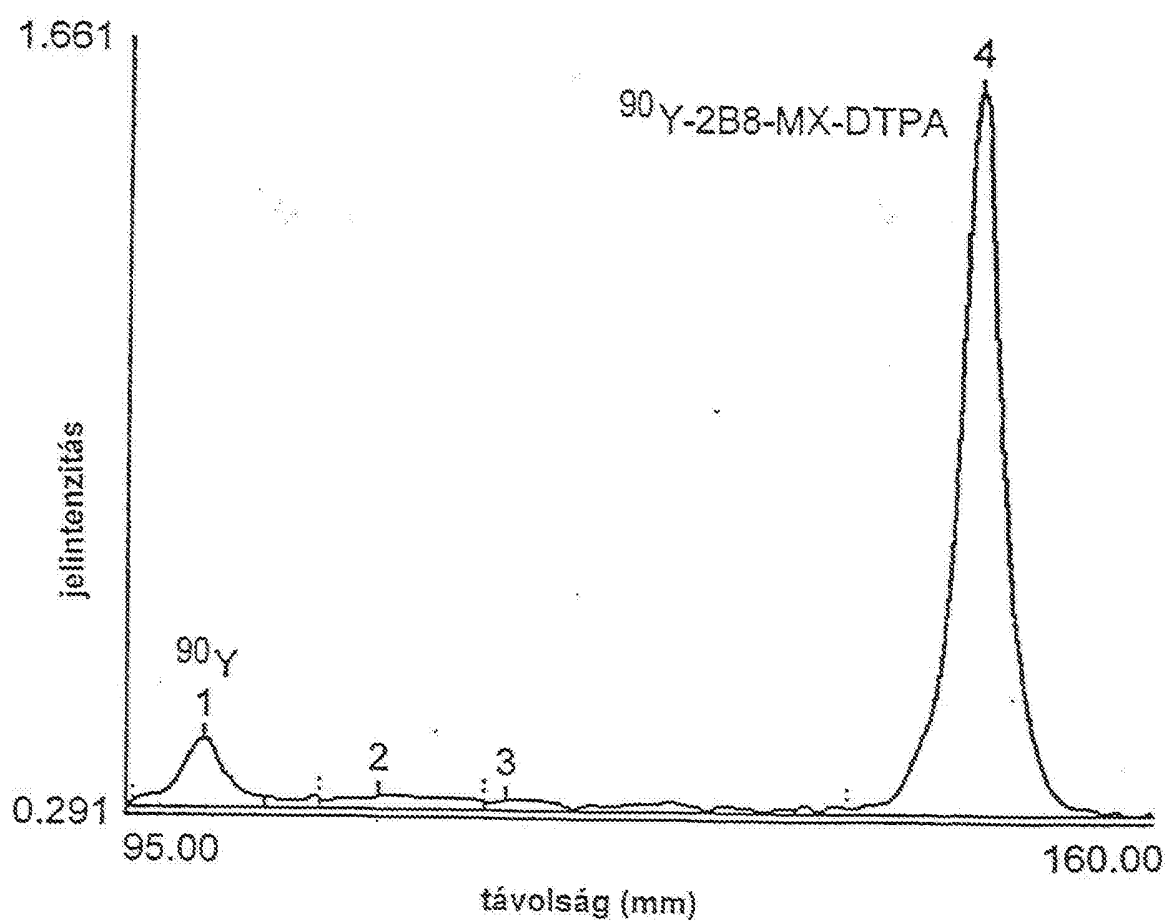
30. ábra
 Humán szérumban inkubált ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA
in vitro stabilitása



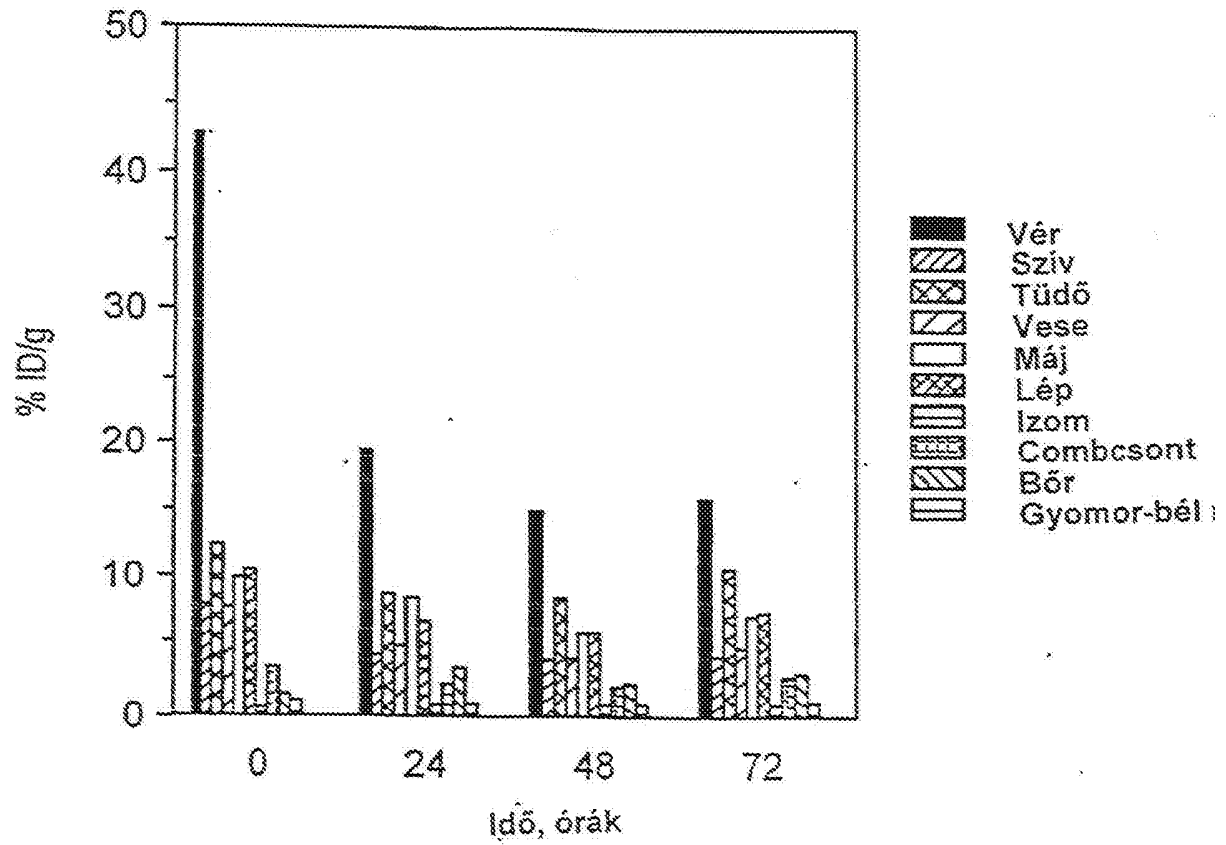
31. ábra
Humán szérumban inkubált ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA
in vitro stabilitása



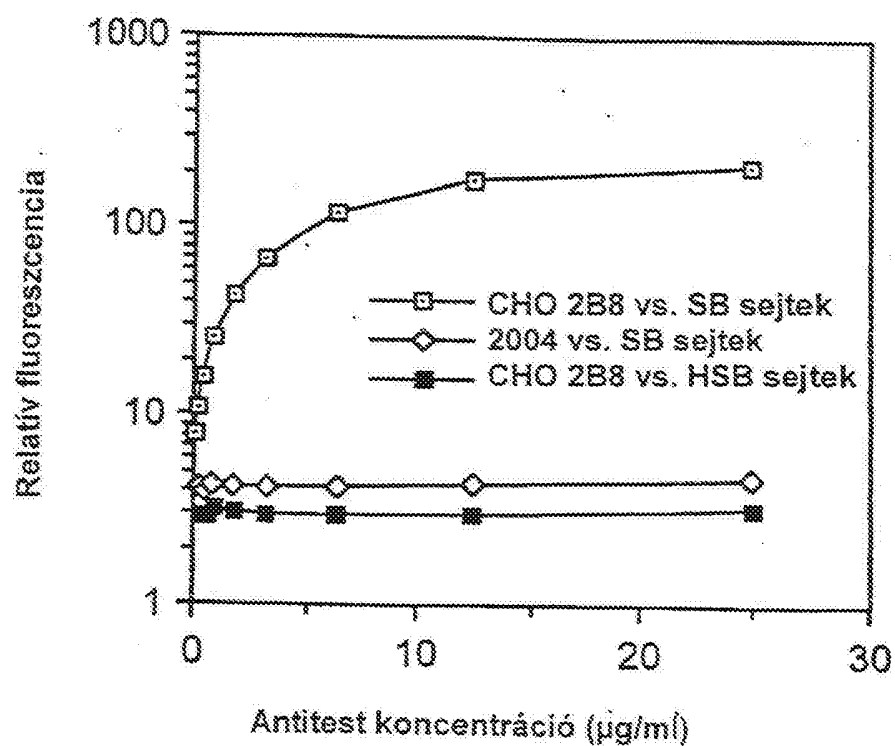
32. ábra
Humán szérumban inkubált ^{90}Y -nal jelölt 2B8-MX-DTPA
in vitro stabilitása



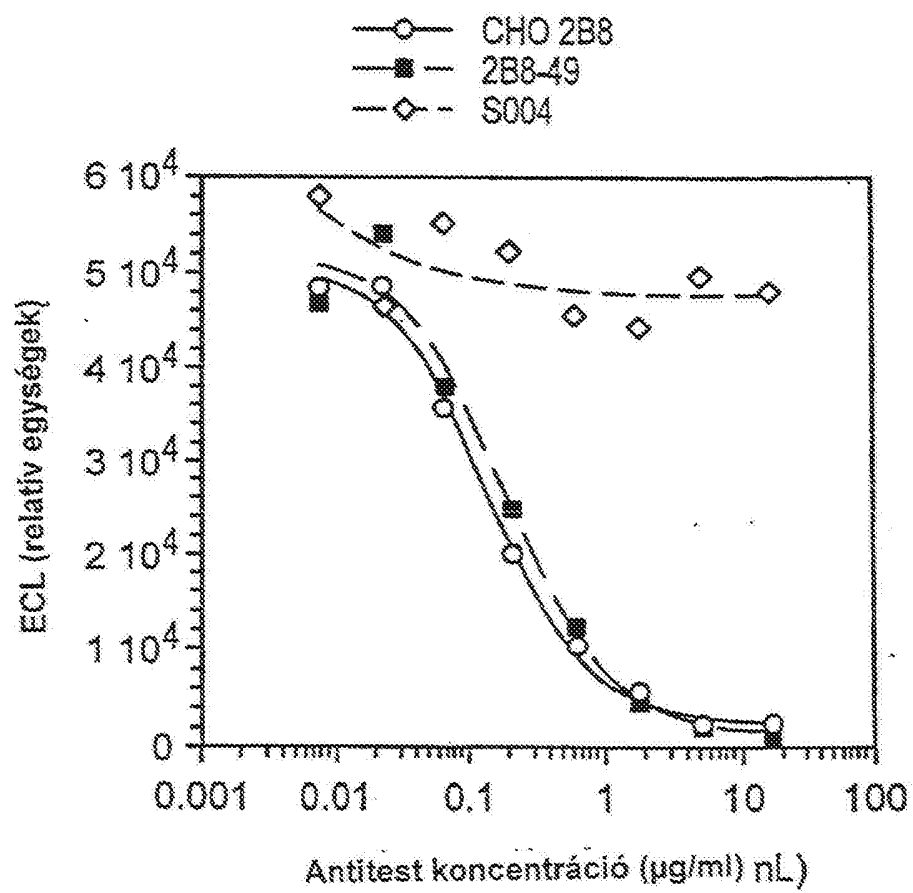
33. ábra



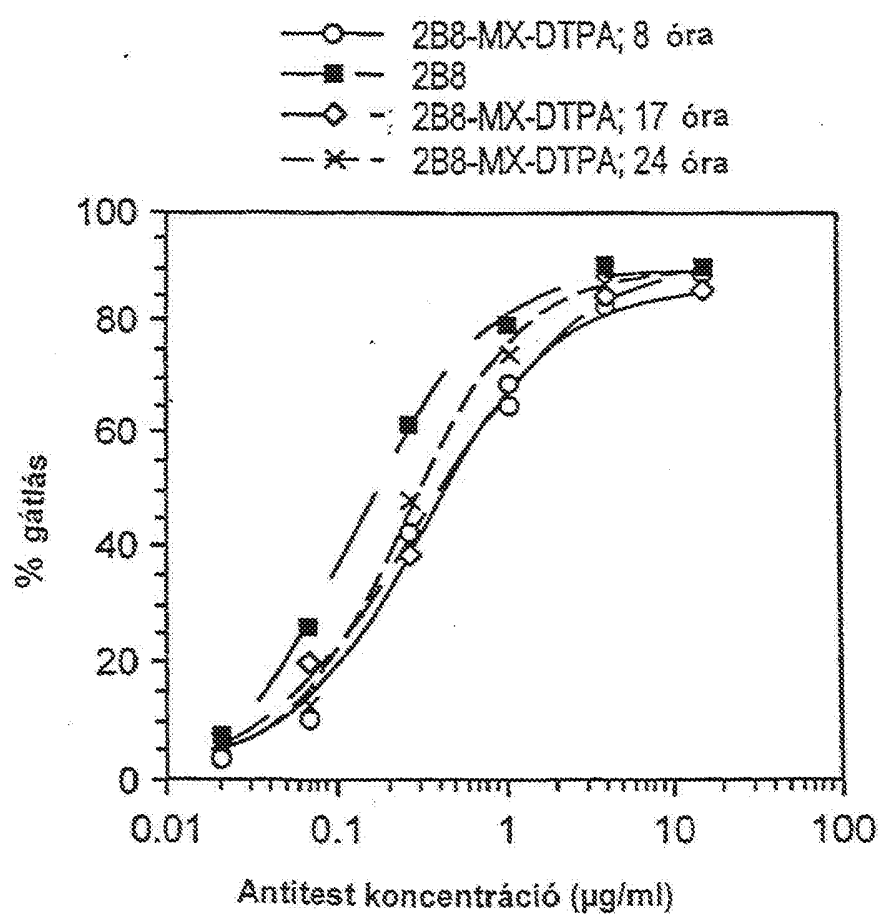
34. ábra
CHO-eredetű 2B8 közvetlen kötődése a CD20-pozitív és CD20-negatív humán sejtekhez



35. ábra
CHO-eredetű 2B8 kompetitív kötődése
CD20-pozitív humán sejtekhez

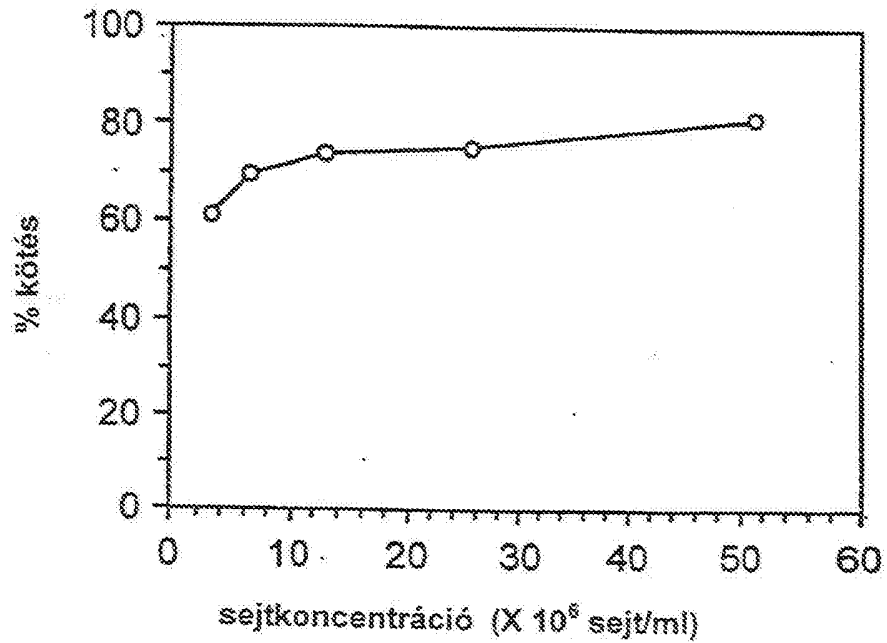


36. ábra
CHO-eredetű 2B8 és 2B8-MX-DTPA kompetitív kötődése
CD20-pozitív humán sejtekhez



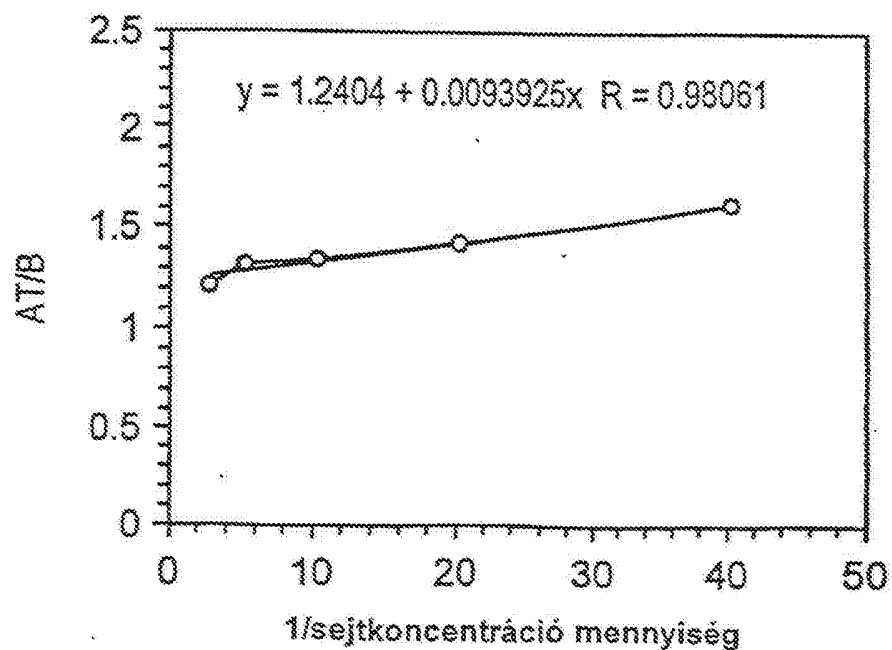
37A. ábra

CHO 2B8-MX-DTPA-ból előállított
In2B8 kötődése CD20-pozitív sejtekhez

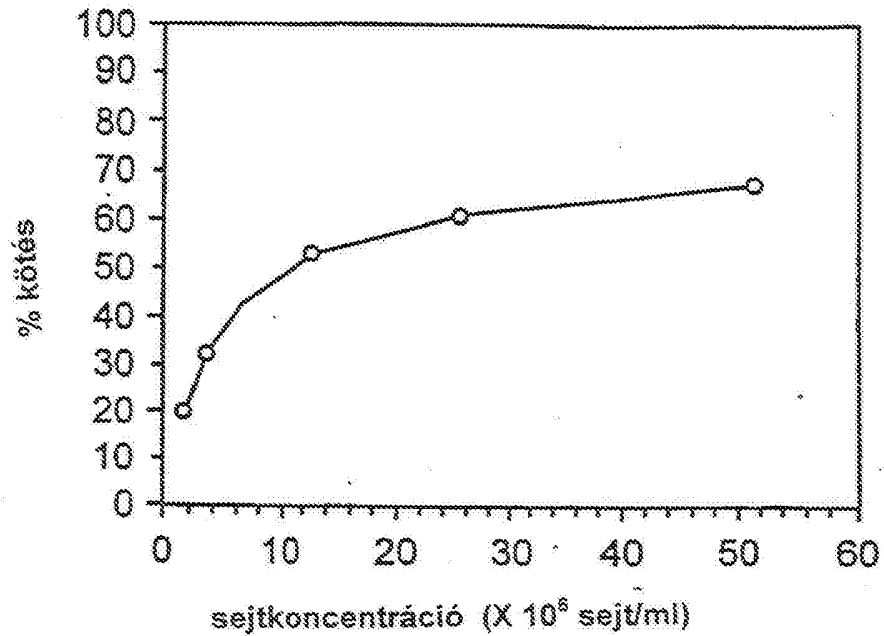


37B. ábra

CHO 2B8-MX-DTPA-ból előállított
In2B8 kötődése CD20-pozitív sejtekhez



38A. ábra
CHO 2B8-MX-DTPA-ból előállított
Y2B8 kötődése CD20-pozitív sejtekhez



38B. ábra
CHO 2B8-MX-DTPA-ból előállított
Y2B8 kötődése CD20-pozitív sejtekhez

