

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

303 262

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/534 (2006.01)
G01N 33/60 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-3126**
(22) Přihlášeno: **29.02.2000**
(30) Právo přednosti: **01.03.1999 US 09/259337**
(40) Zveřejněno: **17.07.2002**
(**Věstník č. 7/2002**)
(47) Uděleno: **23.05.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **04.07.2012**
(**Věstník č. 27/2012**)
(86) PCT číslo: **PCT/US2000/005061**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/052473**

(56) Relevantní dokumenty:
WO 9411026; US 5595721; EP 274394.

(73) Majitel patentu:
IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, San
Diego, CA, US

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

(74) Zástupce:
JUDr. Petr Kalenský, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:
**Způsob radionuklidového značení protilátky
konjugované s chelatotvorným prostředkem a
vazebný test**

(57) Anotace:
Je popsán způsob radionuklidového značení protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem, pro použití na podávání ⁹⁰Y pacientovi, který zahrnuje (i) smísení protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem s roztokem obsahujícím ⁹⁰Y za vytvoření směsi, (ii) inkubaci této směsi a (iii) zředění protilátky označené radionuklidem ve formulačním pufru na koncentraci vhodnou pro podávání pacientovi. Je také popsán vazebný test pro stanovení procenta vazby protilátky značené radionuklidem s její cílovou buňkou, které zahrnuje: (i) uvedené značení protilátky radionuklidem, (ii) smísení a inkubaci protilátky značené radionuklidem s antigen-pozitivními buňkami, a dále se (iii) zředovacím pufrům, (iv) peletování buněk centrifugací, (v) měření radioaktivity a (vi) srovnání množství radioaktivity v supernatantu buněk s množstvím radioaktivity v kontrole.

CZ 303262 B6

Způsob radionuklidového značení protilátky konjugované s chelatovorným prostředkem a vazebný test

5 Oblast techniky

Tento vynález se týká způsobu radionuklidového značení protilátky konjugované s chelatovorným prostředkem, pro použití na podávání ^{90}Y pacientovi a také vazebného testu pro stanovení procenta vazby protilátky značené radionuklidem s její cílovou buňkou.

10

Dosavadní stav techniky

15 Veškeré publikace a patentové přihlášky, které se zde popisují, se zahrnují formou odkazu ve stejném rozsahu, jako kdyby se každá jednotlivá publikace či patentová přihláška konkrétně a jednotlivě citovala s požadavkem zahrnutí formou odkazu.

20 Imunitní systém obratlovců (například primátů, kteří zahrnují lidi, lidoopy, opice atd.) se skládá z řady orgánů a buněčných typů, které se vyvinuly tak, aby přesně a specificky rozpoznávaly cizí mikroorganismy („antigeny“), které napadají hostitele ze skupiny obratlovců, aby specificky vázaly tyto cizí mikroorganismy a aby eliminovaly/ničily tyto cizí mikroorganismy. Lymfocyty, stejně tak jako další typy buněk, mají kritický význam pro imunitní systém. Lymfocyty se vytvářejí v thymu, slezině a kostní dřeni (zralé) a představují zhruba 30 % z celkového počtu bílých krvinek přítomných v oběhovém systému lidí (zralých).

25

Existují dvě hlavní podskupiny lymfocytů: T buňky a B buňky. T buňky jsou odpovědné za imunitu zprostředkovanou buňkami, zatímco B buňky jsou odpovědné za tvorbu protilátek (humorální imunita). Avšak lze uvažovat vzájemnou závislost mezi T buňkami a B buňkami – při typicky imunitní odpovědi se T buňky aktivují při vazbě receptorů T buněk na fragmenty antigenu, které se váží na hlavní glykoproteiny histokompatibilního komplexu („MHC“) na povrchu buňky poskytující antigen. Tato aktivace způsobuje uvolňování biologických mediátorů („interleukinů“), které v podstatě stimulují B buňky k jejich diferenciaci a poskytují protilátku („imunoglobuliny“) proti tomuto antigenu.

30

35 Každá B buňka v organismu hostitele exprimuje na svém povrchu jinou protilátku, takže jedna B buňka bude exprimovat protilátku specifickou pro jeden antigen, zatímco další B buňka bude exprimovat protilátku specifickou pro jiný antigen. V souladu s tím jsou B buňky zcela rozmanité a tato rozmanitost je pro imunitní systém zásadní. U lidí může každá B buňka tvořit mimořádně vysoký počet molekul protilátek (to jest zhruba 10^7 až 10^8). Tato tvorba protilátek většinou vymizí (nebo podstatně poklesne), když se cizí antigen zničí. Případně však může proliferace dané B buňky pokračovat bez omezení a tato proliferace může vést ke karcinomu, který se nazývá „B buněčný lymfom“.

40

45 T buňky a B buňky obsahují proteiny buněčného povrchu, které lze použít jako „markery“ pro diferenciaci a identifikaci. Jedním takovým B buněčným markerem je lidský diferenciací antigen Bp35, omezující se na B lymfocyty, uváděný jako „CD20“. CD20 se exprimuje během časného pre-B buněčného rozvoje a přetrvává do diferenciaci plazmatických buněk. Molekula CD20 může specificky regulovat krok aktivačního procesu, který se požaduje pro zahájení buněčného cyklu a diferenciaci se obvykle exprimuje při velmi vysokých hladinách neoplastických („tumorových“) buněk. CD30 je podle definice přítomen na „normálních“ B buňkách i 50 „maligních“ B buňkách, to jest na těch B buňkách, jejichž neomezená proliferace může vést k B buněčnému lymfomu. Proto může povrchový antigen CD20 sloužit jako kandidát pro „cílený zásah“ B buněčných lymfomů.

V podstatě lze takové cílené působení obecně popsat následujícím způsobem: protilátky specifické pro povrchový antigen B buněk CD20 se například padají pacientovi injekčně. Tyto protilátky proti CD20 se specificky vážou na antigen buněčného povrchu CD20 normálních a maligních B buněk. Protilátka proti CD20 vázaná na povrchový antigen CD20 může způsobit zničení a vyčerpání neoplastických B buněk. Navíc se chemické prostředky nebo radioaktivní značky mající možnost zničit tumor mohou připojovat k protilátce proti CD20, takže tento prostředek se specificky „dodává“ například k neoplastickým B buňkám. Bez ohledu na způsob provedení je primárním cílem zničit tumor. Tento specifický způsob se může určovat konkrétní protilátkou proti CD20, která se použije, takže se různé způsoby cíleného zásahu antigenu CD20 mohou v širokém rozmezí měnit.

Udávají se například způsoby cíleného zásahu povrchového antigenu CD20. Myší monoklonální protilátka 1F5 (protilátka proti CD20) se podává v nepřetržité intravenózní infuzi pacientům s B buněčným lymfomem. Údajně se potřebují mimořádně vysoké hladiny (>2 g) 1F5 pro vyčerpání tumorových buněk v oběhu a výsledky se popisují jako „přechodné“. Press a kol., „Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas“, *Blood* 69/2, 584 až 591 (1987).

Možným problémem při tomto způsobu je skutečnost, že jiné než lidské monoklonální protilátky (například myší monoklonální protilátky) obvykle postrádají lidské efektorové funkční skupiny, to jest nedokáží mimo jiné zprostředkovat komplement-dependentní rozklad či rozkládat lidské cílové buňky prostřednictvím buněčné toxicity nebo Fc-receptorem zprostředkované fagocytózy dependentní na protilátce. Dále může člověk jako hostitel rozpoznávat monoklonální protilátky jiného než lidského původu jako cizorodou bílkovinu. Proto mohou opakované injekce takových cizorodých protilátek způsobovat vyvolání imunitních odpovědí, které vedou ke škodlivým reakcím z přecitlivělosti. To se v případě myších monoklonálních protilátek často popisuje jako odpověď „Human Anti-Mouse Antibody“ (Lidské protimyšší protilátky) neboli odpověď „HAMA“. Navíc se mohou tyto „cizorodé“ protilátky atakovat imunitním systémem příjemce, takže se v podstatě zničí před dosažením cílového místa.

Lymfocyty a buňky lymfomu jsou ve své podstatě citlivé na radioterapii. Proto jsou B buněčné malignity atraktivním cílem pro radioimunoterapii (RIT) z několika důvodů. Lokální emise ionizujícího záření protilátek značených radionuklidy může usmrcovat buňky s cílovým antigenem (například CD20) nebo bez tohoto antigenu v těsné blízkosti protilátky vázané na antigen. Tím se může vyřešit problém omezeného přístupu pronikajícího záření beta k protilátce v objemných nebo polyvaskularizovaných tumorech a může se snížit celkové množství požadované protilátky. Radionuklid emituje částice jaderného záření, které mohou poškodit buněčnou deoxyribonukleovou kyselinu do té míry, že buněčné reparační mechanismy již nejsou schopné umožnit další život buňky. Proto, jsou-li cílovými buňkami tumory, mohou látky značené radionuklidem výhodně usmrcovat tumorové buňky. Protilátky značené radionuklidy zahrnují podle definice použití radioaktivní látky, při kterém se mohou požadovat opatření pro pacienta (například možnost transplantace kostní dřeně) stejně tak jako pro poskytovatele zdravotní péče (to jest nutnost vysoké míry opatrnosti při práci s radioaktivními látkami).

Proto jeden způsob zlepšení schopnosti myších monoklonálních protilátek při uplatnění léčby B-buněčných poruch spočívá v připojení radioaktivní značky k protilátce takovým způsobem, že se značka či toxin lokalizuje v místě tumoru. Toxiny (například chemoterapeutické prostředky, jako je doxorubicin nebo mitomycin C) lze rovněž konjugovat s těmito protilátkami. Viz například přihlášku zveřejněnou PCT WO 92/07466 (vydanou 14. května 1992).

„Chimérické“ protilátky, to jest protilátky, které obsahují součásti od dvou či více různých druhů (například myš a člověk) se vyvíjejí jako alternativa „konjugovaných“ protilátek. Myší/lidské chimérické protilátky, které se připravují, vykazují vazebné charakteristiky mateřské myší protilátky a efektorové funkce odpovídající lidské konstantní oblasti. Viz například Cabilly a kol., patent US 4 816 567, Shoemaker a kol., patent US 4 978 745, Beavers a kol., US 4 975 369 a

- Boss a kol., patent US 4 816 397, které se zde všechny zahrnují formou odkazu. Obecně se tyto chimérické protilátky tvoří přípravou genomové genové knihovny z deoxyribonukleové kyseliny extrahované z předem existujících myších hybridomů. Nishimura a kol., *Cancer Research*, **47**, 999 (1987). Tato knihovna se poté podrobí screeningu ohledně genů variabilní oblasti od těžkých i lehkých řetězců vykazujících správné typy nového uspořádání fragmentu protilátky. Klonované geny variabilní oblasti se poté spojují do vektoru exprese obsahujícího klonované kazety příslušného lidského genu konstantní oblasti s těžkým nebo lehkým řetězcem. Chimérické geny se poté exprimují ve zvolené buněčné linii, obvykle v linii myšího myelomu.
- 10 Například A. Y. Liu a kol., „Production of a Mouse-Human Chiméric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity“, *J. Immun.*, **139**/10, 3521 až 3526 (1987) popisuje myší/lidskou chimérickou protilátku cílenou na antigen CD20. Viz též publikaci PCT WO 88/04936. Neposkytuje se však žádná informace, pokud jde o schopnost, účinnost nebo praktickou použitelnost chimérických protilátek podle Liu při léčení B-buněčných poruch.
- 15 Zaznamenává se, že funkční analýzy in vitro [například komplement-dependentní cytolyza („CDC“), buněčná cytotoxicita závislá na protilátce („ADCC“) atd.] nemohou samy o sobě poskytnout předpověď schopnosti in vivo jakékoliv protilátky ničit či vyčerpávat cílové buňky exprimující specifický antigen. Viz například R. D. Robinson a kol., „Chiméric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate different antitumor cell biological activities“, *Hum. Antibod. Hybridomas*, **2** 84 až 93 (1991) (chimérická myší-lidská protilátka, která nemá detekovatelnou aktivitu ADCC). Proto lze možnost terapeutické účinnosti protilátek hodnotit pouze experimenty in vivo.
- 20 Pro tento účel současné US přihlášky 08/475 813, 08/475 815 a 08/478 967, které se zde zahrnují formou odkazu v plném znění, popisují konjugáty proti CD20 značené radionuklidy pro diagnostické „zobrazování“ B-buněčných tumorů před podáním terapeutické protilátky. Konjugát „In2B8“ zahrnuje myší monoklonální protilátku 2B8 specifickou pro lidský antigen CD20, která se připojuje k radionuklidu ^{111}In bifunkčním chelatačním prostředkem, to jest MX-DTPA (kyse-
lina diethylenetriaminpentaoctová), která obsahuje směs 1:1 1-isothiokyanatobenzyl-3-methyl-
30 DTPA a 1-methyl-3-isothiokyanatobenzyl-DTPA. ^{111}In se volí jako diagnostický radionuklid, protože je zářičem gama, jehož použití pro zobrazovací účely je nejběžnější.
- 35 Patenty, které se týkají chelatačních prostředků a konjugátů chelatačních prostředků jsou v oboru známy. Například patent US 4 831 175 Gansowa se zaměřuje na polysubstituované cheláty kyseliny diethylenetriaminpentaoctové a proteinové konjugáty, které je obsahují, a na způsoby jejich přípravy. Patenty US 5 099 069, US 5 246 692, US 5 286 850 a US 5 124 471 Gansowa se též týkají polysubstituovaných chelátů DTPA. Tyto patenty se zde zahrnují v plném znění.
- 40 Specifický bifunkční chelatační prostředek použitý pro usnadnění chelace v US přihláškách 08/475 813, 08/475 815 a 08/478 967 se volí z toho důvodu, že vykazuje vysokou afinitu k trojmocným kovům a poskytuje zvýšené poměry mezi tumorovými a netumorovými buňkami, snížené vychytávání v kostech a zvýšenou retenci radionuklidu v cílových místech in vivo, to jest v místech B-buněčného lymfomu. Jsou však v oboru známy i další bifunkční chelatační prostředky
45 a mohou být též prospěšné při terapii tumorů.
- V US přihláškách 08/475 813, 08/475 815 a 08/478 967 se též popisují terapeutické protilátky značené radionuklidy pro cílový zásah a destrukci B-buněčných lymfomů a tumorových buněk. Konkrétně konjugát Y2B8 zahrnuje stejnou myší monoklonální protilátku proti lidskému CD20,
50 2B8, připojenou k radionuklidu ^{90}Y prostřednictvím tohoto bifunkčního chelatačního prostředku. Tento radionuklid se volí pro terapeutické použití z několika důvodů. Poločas 64 h radionuklidu ^{90}Y je dostatečně dlouhý, aby umožnil akumulaci v tumoru a na rozdíl od radionuklidu ^{131}I je čistým zářičem beta o vysoké energii bez doprovodného záření gama, s dosahem 100 až 1000 průměrů buňky. Minimální množství penetrujícího záření umožňuje podání protilátek značených radionuklidem ^{90}Y ambulantním pacientům. Dále se nepožaduje internalizace značených proti-
55

látek pro usmrcení buňky a lokální emise ionizujícího záření by měla být smrtelná pro okolní tumorové buňky, které neobsahují cílový antigen.

5 Jelikož radionuklid ^{90}Y je připojený k protilátce 2B8 prostřednictvím téže bifunkční chelatační molekuly MX-DT PA, vykazuje konjugát Y2B8 stejné výhody, které se popisují výše, to jest
 10 zvýšenou retenci radionuklidu v místě cíle (tumoru). Avšak na rozdíl od ^{111}In se tento radionuklid nemůže použít pro účely zobrazování vzhledem k tomu, že není zářičem gama. Proto lze použít diagnostický „zobrazovací“ radionuklid, jako je ^{111}In pro stanovení lokalizace a relativního roz-
 měru tumoru před a/nebo po podání terapeutických chimérických protilátek značených ^{90}Y pro účely redukce tumoru. Navíc umožňuje protilátka značená indiem dozimetrické vyhodnocení.

V závislosti na zamýšleném použití protilátky, to jest jako diagnostického či terapeutického pro-
 středku, jsou použitelné další radioaktivní nuklidy známé v oboru pro podobné účely. Radio-
 15 nuklidy použité v klinické diagnóze zahrnují například ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{67}Ga stejně tak jako ^{111}In . Protilátky se též značí řadou radionuklidů pro možnost použití v cílené imunoterapii [Peirersz a kol., „The use of monoclonal antibody conjugates for the diagnosis and treatment of cancer“, Immunol. Cell Biol., 65 111 až 125 (1987)]. Tyto radionuklidy zahrnují ^{188}Re a ^{186}Re stejně tak jako ^{90}Y a v menší míře ^{199}Au a ^{67}Cu . ^{131}I se používá pro terapeutické účely. Patent US 5 460 785 poskytuje seznam těchto radionuklidů, který se zde zahrnuje formou odkazu.

20 Jak se uvádí v současných US patentových přihláškách 08/475 813, 08/475 815 a 08/478 967, vede podávání konjugátu Y2B8 značeného radionuklidem, stejně tak jako nezačené chimérické protilátky proti CD20, k význačné redukci tumoru u myši s B–buněčným lymfoblastickým tumor-
 25 em. Navíc se uvádějí klinické studie na lidech, které vykazují významné vyčerpání B buněk u pacientů s lymfomem, kteří dostávají infuzi chimérické protilátky proti CD20. 2B8 se nedávno stala první monoklonální protilátkou proti rakovině schválenou FDA pod názvem Rituxan®. Proto alespoň jedna chimérická protilátka proti CD20 vykazuje prokázanou terapeutickou účinnost při léčení B–buněčného lymfomu.

30 Dále US patentová přihláška pořadové č. 08/475 813, která se zde zahrnuje formou odkazu, uve-
 řejňuje postupné podávání Rituxanu®, chimérické protilátky proti CD20, s myší monoklonální protilátkou značenou buď radionuklidem yttria, nebo radionuklidem india. I když jsou protilátky značené radionuklidy použité při těchto kombinovaných terapiích myšimi protilátkami, vyčerpá
 35 počáteční léčení chimérickou protilátkou proti CD20 dostatečným způsobem populaci B–buněk, takže se sníží odpověď HAMA, čímž se usnadní kombinovaný terapeutický a diagnostický způsob.

Proto mohou v souvislosti s kombinovanou imunoterapií nacházet myši protilátky zvláštní pou-
 40 žití jako diagnostické prostředky. Dále se ukazuje v US patentové přihlášce 08/475 813, že tera-
 apeuticky účinné dávky protilátky proti CD20 značené yttriem po podání Rituxanu® jsou dostateč-
 né (a) pro vyčištění periferní krve od zbývajících B–buněk, které se neodstraní chimérickou pro-
 tilátkou proti CD20, (b) pro vyčerpání B–buněk z lymfatických uzlin nebo (c) pro zahájení
 odstraňování B–buněk z dalších tkání.

45 Připojení radioaktivních značek na nádorové terapeutické protilátky tedy poskytuje cenný klinic-
 ký prostředek, který je použitelný pro vyhodnocení možné terapeutické účinnosti těchto proti-
 látek, vytvoření diagnostických prostředků pro monitorování progresu léčby a návrh dalších tera-
 50apeutických prostředků, které lze použít pro zvýšení počáteční možnosti chimérické protilátky při
 usmrcení tumoru. Při prokázané účinnosti určité protilátky proti CD20 při léčení ne Hodgkinského
 lymfomu a známé citlivosti lymfocytů na radioaktivitu by bylo vysoce výhodné obdržet terapeu-
 tické protilátky v komerčně dostupné soupravě, ve které by se snadno modifikovaly radioaktivní
 značkou a podávaly přímo pacientovi v klinickém uspořádání.

I když existuje řada způsobů a prostředků pro značení protilátek radionuklidy, chybí vhodné
 55 vehikulum pro použití těchto prostředků v klinickém prostředí způsobem, který by umožnil snad-

nou přípravku a podání pacientovi před podstatným rozpadem radionuklidu nebo podstatnou destrukcí protilátky radioaktivním zářením. Nedostatek takových vhodných prostředků pro komerční uplatnění této užitečné technologie může vyplývat ze špatné účinnosti inkorporace prokázané při některých známých způsobech značení a následné nutnosti purifikovat prostředek na sloupci po provedení způsobu značení radionuklidem. Zpoždění vývoje těchto souprav může též částečně vyplývat z dřívějšího nedostatku přístupnosti k čistým komerčně dostupným radionuklidům použitelným pro účinnou přípravu značených přípravků bez další purifikace. Alternativně může obecná nedostupnost takových souprav vyplývat z nedostatku protilátek, které by mohly dosahovat schválení nebo účinnosti jako Rituxan® při léčení lymfomu u lidí.

Jak se například diskutuje v patentu US 4 636 380, který se zde zahrnuje formou odkazu, ve vědeckých kruzích se obecně uvažuje, že má-li některé radiofarmakum dosáhnout klinického použití, musí se podrobit dlouhému a obtížnému způsobu separace a purifikace. Injekční podání nenávané radioaktivní značky pacientovi by skutečně bylo nežádoucí. Potřeba dalších purifikačních kroků znamená nemožnost způsobu značení protilátek radioaktivními nuklidy v klinickém prostředí, zejména pro lékaře, kteří nemají ani zařízení ani čas pro purifikaci svých vlastních terapeutických prostředků.

Navíc mohou být proteiny značené radionuklidy samy o sobě nestabilní, zejména ty, které jsou značené radiolytickými radionuklidy, jako je ^{90}Y , které poškozují protilátku tím více, čím déle jsou připojené v její těsné blízkosti. Dále tato radiolýza způsobuje nespolehlivou účinnost terapeutického prostředku následkem ztráty radioaktivní značky a/nebo snížené vazby na cílový antigen a může způsobovat imunitní odpovědi na denaturovaný protein. Bez zařízení pro značení a purifikaci protilátek v místě použití nemají klinici žádnou jinou možnost volby než objednat již označené terapeutické protilátky nebo je značit mimo místo použití v příslušném zařízení a transportovat pro podání pacientovi. Veškeré tyto manipulace a časové období mezi značením a podáním přispívají k nestabilitě terapeutického prostředku a snižují použitelnost souprav značených radionuklidy v klinickém prostředí.

Jiní se neúspěšně snažili vyvinout soupravy pro značení protilátek radionuklidy, které by byly dostatečně dokonalé tak, aby se předešlo zvláštnímu purifikačnímu kroku. Cytogen například nedávno poskytl komerční soupravu pro značení myši monoklonální protilátky radionuklidy zaměřené na glykoprotein TAG-72 související s tumorem. Avšak protilátka cytogen je zvláště nevhodná pro formulaci soupravy vzhledem ke vzniku částic v průběhu skladování, které se musí dále odstraňovat dalším filtračním krokem. Navíc protilátka cytogen způsobuje nepříznivé reakce u pacientů následkem odpovědi HAMA.

Další autoři uvádějí vývoj způsobu značení radionuklidy pro použití v soupravách, ve kterých není nezbytný další purifikační krok [Richardson a kol., „Optimization and batch production of DTPA-labeled antibody kits for routine use in ^{111}In immunoscintigraphy“, Nuc. Med. Commun., 8, 347 až 356 (1987), Chinol a Hnatowich, „Generator-produced yttrium-90 for radioimmunotherapy“, J. Nucl. Med., 28(9), 1465 až 1470 (1987)]. Tyto způsoby však nejsou schopné dosáhnout hladiny inkorporace, které dosahují původci tohoto vynálezu s použitím způsobů, které se zde popisují, při kterých je účinnost inkorporace alespoň 95 %. Taková hladina inkorporace poskytuje další výhodu zvýšené bezpečnosti tím, že se pacientovi nepodává v injekci žádná nevázaná značka, jejíž přítomnost by byla důsledkem nízké radioinkorporace.

Je pocítována potřeba imunoesejí a souprav pro značení radionuklidy, lyofilizovaných buněčných přípravků, chemických látek a způsobů provedení pro testování klinické účinnosti terapeutických protilátek pro léčení/zobrazování tumorů a tumorových buněk. K naplnění této potřeby přispívá předmětný vynález, který umožňuje, aby se soupravy založené na využití tohoto vynálezu (dále též zkráceně „podle tohoto vynálezu“) používaly pro přípravu a vyhodnocení konjugátů protilátek značených radionuklidy, které slouží pro léčení a zobrazování B-buněčných lymfomů na základě cíleného zásahu antigenu BP35 („CD20“) povrchu B buněk.

Způsoby použité v soupravách podle tohoto vynálezu umožňují rychlé značení, které se může uplatnit zhruba v průběhu půl hodiny nebo pouhých 5 min v závislosti na značce. Navíc způsoby značení podle tohoto vynálezu vykazují účinnost značení převyšující 95 %, čímž se předchází nutnosti další purifikace. Předjetím nutnosti další purifikace se poločas rozpadu použitého radionuklidu a integrita protilátky zachovává pro terapeutické použití, pro které byla tato protilátka označena.

Tato patentová přihláška popisuje vhodné soupravy a způsoby, ve kterých lze diagnostické a terapeutické protilátky značit radionuklidem a podávat pacientovi reprodukovatelným spolehlivým a vhodným způsobem. Soupravy podle tohoto vynálezu převádějí způsob značení protilátek radionuklidy na provedení bez obav a potíží, které značně usnadňuje způsoby léčení pacienta. Tyto soupravy poskytují výhody oproti dřívějšímu stavu v tom směru, že se používá stanovených optimálních parametrů pro značení a podávání terapeutických či diagnostických prostředků, čímž se snižují náklady na zboží. Jelikož soupravy, které se zde popisují, poskytují optimální parametry podle konkrétní značky, použití soupravy určené pro konkrétní značku též minimalizuje kanibalizaci, která nastává při použití nevhodné soupravy pro konkrétní značku. Předcházení kanibalizace dále poskytuje optimální účinnost značení. Dále způsoby provedení a sterilní nepyrogenní složky obsažené v každé soupravě zajišťují lépe použitelný způsob pro uživatele, neboť předcházejí sterilizaci, testování na pyrogeny a purifikaci po značení prostředků.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je způsob radionuklidového značení protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem, pro použití na podávání ^{90}Y pacientovi, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje:

(i) smísení protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem s roztokem obsahujícím ^{90}Y za vytvoření směsi,

(ii) inkubaci směsi při vhodné teplotě po dobu 10 minut nebo méně, pro produkci protilátky značené radionuklidem, kde tato protilátka značená radionuklidem má inkorporaci radionuklidu větší než 95 % tak, že může být podávána přímo pacientovi bez další purifikace od neinkorporovaného ^{90}Y , a

(iii) zředění protilátky označené radionuklidem ve formulačním pufru na příslušnou koncentraci vhodnou pro podávání pacientovi.

Předmětem tohoto vynálezu je také vazebný test pro stanovení procenta vazby protilátky značené radionuklidem s její cílovou buňkou, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje:

(i) značení protilátky radionuklidem podle způsobu popsaného svrchu pro produkci protilátky značené radionuklidem,

(ii) smísení a inkubaci alespoň jednoho alikvotního podílu protilátky značené radionuklidem s alespoň jedním alikvotním podílem antigen–pozitivních buněk,

(iii) smísení a inkubaci alespoň jednoho alikvotního podílu protilátky značené radionuklidem identického s alikvotním podílem v kroku (ii) s alespoň jedním alikvotním podílem zředovacího pufru téhož objemu jako má alikvotní podíl antigen–pozitivních buněk v kroku (ii) jako kontrolou,

(iv) peletování buněk centrifugací,

(v) měření radioaktivity v supernatantu peletovaných buněk a kontroly, a

(vi) srovnání množství radioaktivity v supernatantu buněk s množstvím radioaktivity v kontrole.

Dále se uvádí detailní popis předmětného vynálezu. Jsou také uvedeny údaje srovnávací a pro
5 dokreslení údaje ilustrující analogické řešení, založené na jiném radionuklidu, než je ^{90}Y .

Vazebný test je určen pro testování vázání.

Tento vynález umožňuje dosáhnout soupravy pro značení diagnostické nebo terapeutické proti-
10 látky radionuklidy před podáním pacientovi, obsahující alespoň

(i) lahvičku obsahující protilátku konjugovanou s chelačním prostředkem,

(ii) lahvičku obsahující formulační pufr pro stabilizaci a podávání protilátky značené radio-
15 nuklidem a

(iii) instrukce pro značení protilátky radionuklidem, přičemž se popisované složky lahviček
dodávají v takovém množství a v takové koncentraci, že při jejich spojení s radioaktivní značkou
o dostatečné čistotě a aktivitě podle instrukcí pro soupravu není nutná žádná purifikace značené
20 protilátky před podáním pacientovi. Navíc při značení podle instrukcí pro soupravu a s použitím
radionuklidu o dostatečné čistotě a aktivitě může inkorporace radionuklidu dosáhnout hladin
vyšších než 95 % a dokonce až 98 % či vyšších.

Protilátka obsažená v soupravě je nejlépe protilátkou proti CD20. Tato protilátka se dodává ve
25 formě, ve které je připojená na bifunkční chelační prostředek. Přednostně je tato protilátka pří-
pojená na MX-DTPA, avšak lze použít jiné chelační prostředky, jako je fenyl- nebo benzyl-
konjugovaná DTPA, cyklohexyl-DTPA, deriváty EDTA a DOTA. Chelačním prostředkem může
být jakýkoliv chelační prostředek, který je alespoň bifunkční, to jest který má alespoň dvě vazeb-
ná místa (alespoň jedno místo pro chelaci kovového iontu a alespoň jedno místo pro připojení
30 k proteinovému ligandu).

V závislosti na použité protilátce se konjugovaná protilátka obvykle dodává o koncentraci 0,5 až
30 mg/ml, přednostně 2 mg/ml. Objem konjugované protilátky závisí na koncentraci a množství
požadovaném pro optimální značení v závislosti na dané radioaktivní značce. Avšak konjugova-
nou protilátku je třeba dodávat v takovém objemu a koncentraci, aby se celý objem dodal do
35 reakční lahvičky s použitím sterilní injekční stříkačky a aseptického způsobu. To umožní zvýše-
nou reprodukovatelnost a snadnost použití. Veškeré chemické prostředky a soupravy, které se zde
popisují, jsou sterilní a bez pyrogenů a jsou specificky navrženy pro snadný a rychlý přechod od
testování protilátky k podání. Pro některé značky není nutno testovat účinnost značení.

Zvláště výhodnou složkou soupravy je pufr pro stabilizaci proti účinkům radiolýzy a pro podání
40 konjugované protilátky značené radionuklidem pacientovi. Tento formulační pufr je farmaceutic-
ky přijatelnou nosnou látkou, která slouží jako zřed'ovací prostředek pro označenou protilátku a
jako pufr pro podání. I když lze pro podání terapeutických nebo diagnostických protilátek paci-
entovi použít jakýkoliv farmaceuticky přijatelný zřed'ovací prostředek, je formulační pufr podle
45 tohoto vynálezu zvláště vhodný pro podání protilátek značených radionuklidy.

Pufr pro formulaci podle tohoto vynálezu obsahuje radioprotektivní prostředek, jako je lidský
serumalbumin (HSA) nebo askorbát, který minimalizuje radiolýzu způsobenou yttriem a v menší
50 míře indiem. V oboru jsou známy další radioprotektivní prostředky a mohly by se též použít
v pufru pro formulaci podle tohoto vynálezu, to jest látky zachycující volné radikály (fenol, sul-
fity, glutathion, cystein, kyselina gentisová, kyselina nikotinová, askorbyl-palmitát, HOP(:O)H₂,
glycerol, natrium-formaldehydsulfoxylát, pyrosiřičitan sodný, thiosíran sodný a oxid siřičitý
atd.).

55

Je třeba poznamenat, že zatímco se radioprotektivní látky obecně používají ve formulačním pufru pro ochranu protilátky proti radiolýze, lze též uplatnit další ochranu použitím radioprotektivního prostředku v reakčním pufru. To se dříve obecně neprovádělo s HSA (lidským serumalbuminem) vzhledem k přítomnosti kovů, které by interferovaly se způsobem značení. Avšak lidský serumalbumin lze „vyčistit“ s použitím chelatotvorné pryskyřice, kterou lze též přidat do reakčního pufru. Askorbát a další radioprotektivní prostředky se též mohou zpracovat pro odstranění kontaminujících kovů.

Formulační pufr podle tohoto vynálezu též obsahuje přebytek nekonjugovaného chelatotvorného prostředku. Účelem přidání nekonjugovaného chelatotvorného prostředku je, aby tento prostředek sloužil pro vychytání jakékoliv neproteinové radioaktivní značky v organismu pacienta a aby umožnil vylučování radioaktivní značky snižováním vychytávání osteotropních radionuklidů, to jest ^{90}Y v kostech pacienta. Pokud se například protilátka v soupravě konjuguje s chelatotvorným prostředkem DTPA, lze do formulačního pufru zahrnout přebytek DTPA nebo jakéhokoliv dalšího chelatotvorného prostředku. Formulační pufr se též přednostně dodává v takovém objemu, aby se celkový obsah převedl do reakční lahvičky. Jak se diskutuje výše, vede to k usnadnění použití a reprodukovatelnosti, neboť není třeba měřit a převádět přesné objemy.

Preferovaný formulační pufr zahrnuje fosfátem pufrovaný nebo fyziologický roztok, lidský serumalbumin a DTPA. Lidský serumalbumin je přednostně v koncentracích zhruba mezi 1 a 25 % (hmotnost/objem) a lépe v koncentracích zhruba 7,5 % (hmotnost/objem). Koncentrace DTPA je přednostně okolo 1 mM. Askorbát lze použít jako alternativu lidského serumalbuminu a obvykle se používá při koncentracích zhruba 1 až 100 mg/ml, i když lze použít širší rozměr koncentrací bez ohrožení bezpečnosti pacienta.

Protilátka soupravy pro značení radionuklidem se snadno označí zvoleným radionuklidem prostřednictvím bifunkčního chelatotvorného činidla podle způsobů tohoto vynálezu. V tomto směru může pro jednoduchost souprava podle tohoto vynálezu též zahrnovat lahvičku obsahující pufr pro úpravu pH roztoku radionuklidu a sterilní skleněnou reakční nádobku pro provedení značení a následně pro resuspendování konečné protilátky označené radionuklidem ve formulačním pufru. Obvykle postačuje reakční lahvička 10 ml, avšak lze též použít lahvičky o obsahu 5 až 20 ml. Pufrem je přednostně roztok octanu sodného o nízkém obsahu kovů při koncentraci 10 až 1000 mM, nejlépe 50 mM.

Konkrétní souprava podle tohoto vynálezu zahrnuje protilátku konjugovanou s MX-DTPA, 2B8-MX-DTPA, 2B8 je protilátka proti CD20, která způsobuje vyčerpání T buněk při podání pacientům s lymfomem. Avšak těm, kteří mají zkušenost v oboru, by mělo být zřejmé, že soupravu pro značení radionuklidem podle tohoto vynálezu lze optimalizovat pro značení jiných protilátek proti CD20 nebo jakékoliv jiné protilátky, která byla konjugovaná s DTPA nebo polyvalentním chelatotvorným prostředkem. Preferovaná souprava podle tohoto vynálezu může zahrnovat alespoň

(i) lahvičku obsahující protilátku 2B8 konjugovanou s MX-DTPA, buď v roztoku, nebo lyofilizovanou (vyžadující převedení do roztoku) a

(ii) lahvičku obsahující formulační pufr pro podávání protilátky značené radionuklidem pacientovi. Preferovaná souprava bude též obsahovat

(iii) pufr pro úpravu pH roztoku radionuklidu a

(iv) reakční lahvičku.

Alternativně a ještě lépe se pufr dodává v reakční lahvičce, čímž se eliminují kroky odměřování a přenášení pufru a zvyšuje se jednoduchost, konzistence a sterilita složek soupravy. Uvažují se však i další ztělesnění, při kterých se pufr přidává nejprve do lahvičky s radionuklidem a poté se

pufrovaný roztok radionuklidu přenáší do reakční lahvičky. V tomto případě se reakční lahvička dodává s požadovaným objemem protilátky. Alternativně může být lahvička s radionuklidem/-pufrem dostatečně velká tak, aby pojmulu přídavek konjugátu protilátky, to jest přímo do lahvičky dodavatele. To by eliminovalo nutnost reakční lahvičky.

5 Jak se popisuje výše, zahrnuje se další preferovaná konfigurace soupravy, při které reakční lahvička samotná obsahuje požadovaný objem konjugované protilátky (to jest 1 nebo 1,5 ml pro radionuklidy ^{111}In respektive ^{90}Y). Protilátku lze dodávat v pufru, který poskytuje příslušné pH pro značení radionuklidem podle specificky požadovaného radionuklidu (to jest pH 3 až 6 pro ^{111}In , pH 3 až 5 pro ^{90}Y). Lze použít různé pufrы v závislosti na radionuklidu (to jest octan sodný pro ^{90}Y , citrát sodný pro ^{111}In). pH a složení pufru se může též měnit v závislosti na povaze vazebního ligandu, který se má označit (to jest značení peptidů se může provádět při pH < 3). Poté by se v podstatě radionuklid přenášel přímo do reakční nádoby místo formulačního pufru. Omezení použití soupravy na dva kroky přenosu by dále zvýšilo reprodukovatelnost a jednoduchost a dále by snížilo možnost kontaminace sterility v průběhu zacházení se složkami soupravy.

15 Soupravy pro značení radionuklidu podle tohoto vynálezu mohou dále obsahovat lahvičku s radionuklidem nebo lze radionuklid objednat odděleně od příslušného dodavatele. Preferovanými radionuklidy podle tohoto vynálezu jsou ^{111}In ve formě chloridu a ^{90}Y ve formě chloridu v kyselině chlorovodíkové, i když se popisované způsoby neomezují pouze na tyto radionuklidy. Další radionuklidy, které se používají v zobrazovacích aplikacích, jsou známy v oboru a popisují se v patentech US 4 634 586, US 5 460 785 a US 5 766 571, které se zde zahrnují formou odkazu. ^{111}In je zvláště výhodným radionuklidem pro zobrazování B-buněčných tumorů a zářiče beta, jako je ^{90}Y , jsou zvláště užitečné pro radioterapeutické prostředky. Lze však použít i další radionuklidy vhodné pro tyto nebo další účely, to jest zářiče alfa, v závislosti na chelačním prostředku použitým pro konjugaci protilátky.

30 S vyzkoušenou účinností kombinovaných terapeutických protokolů popsanych v US přihlášce pořadové č. 08/475 813 bude další ztělesnění soupravy zahrnovat oddělenou lahvičku s chimérickou protilátkou, to jest Rituxan® pro podání před nebo po značené protilátce proti CD20. Při podání chimérické protilátky před protilátkou označenou radionuklidem lze významně snížit odpověď HAMA, která může obecně nastávat po podání myší protilátky proti CD20, čímž se zvýší terapeutická použitelnost myších protilátek značených radionuklidem. Dále při použití chimérické protilátky proti CD20 pro odstranění B buněk z krevního oběhu jsou následná diagnostická zobrazení získaná s protilátkami značenými radionuklidem ^{111}In mnohem jasnější.

40 Mělo by též být zřejmé, že diagnostická protilátka značená radionuklidem i terapeutická protilátka značená radionuklidem jsou použitelné společně v kombinovaném terapeutickém protokolu. Z tohoto hlediska lze použít diagnostickou protilátku buď před, nebo po terapeutické protilátce pro vizualizaci velikosti tumoru před léčením a po léčení. V tomto případě může soubor podle tohoto vynálezu zahrnovat oddělenou případně barevně označenou lahvičku s pufrem specificky formulovaným podle optimálních požadavků na pH pro značení protilátek radionuklidem při použití konkrétních radionuklidů. Takový systém by zaručoval použití příslušného pufru pro každou značku a umožňoval by též kliníkovi snadné použití značení dvou protilátek, jako je tomu při zakoupení dvou souprav. Taková souprava ve skutečnosti kombinuje dvě složky ze dvou souprav pro značení radionuklidem do jedné soupravy.

50 Složky pro označení soupravy radionuklidem podle tohoto vynálezu se dodávají při příslušných koncentracích a pH takovým způsobem, že se snadno udržuje sterilita před podáním protilátky a je zde málo požadavků pro přídavné pufrы či média. Avšak tomu, kdo má zkušenost v oboru, by mělo být zřejmé, že lze stejná činidla připravit, sterilizovat a testovat ohledně sterility na pracovišti. Proto se uvažují různé formy soupravy podle tohoto vynálezu v závislosti na rozpočtu a preferenci uživatele.

Souprava pro značení radionuklidem podle tohoto vynálezu se může použít při způsobu značení radionuklidem protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem pro podávání pacientovi. Podle tohoto vynálezu tento způsob zahrnuje obecně

- 5 (i) smísení protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem s roztokem obsahujícím radionuklid,
- (ii) inkubaci směsi po příslušnou dobu při příslušné teplotě a
- 10 (iii) zředění označené protilátky na příslušnou koncentraci ve formulačním pufru tak, aby bylo možno podávat protilátku označenou radionuklidem přímo pacientovi bez další purifikace.

Nejpreferovanější protilátkou je protilátka proti CD20 a zejména může být touto protilátkou proti CD20 protilátka 2B8. Tuto protilátku lze konjugovat s jakýmkoliv vhodným chelatotvorným prostředkem, to jest s MX-DTPA, CHX-DTPA, fenylo- nebo benzyl-DTPA, DOTA, deriváty EDTA atd., preferuje se MX-DTPA. Způsoby pro uplatnění konjugace protilátky jsou známy v oboru [Kozak a kol. (1989), Mirzadeh a kol. (1990), Brachbiel a kol. (1986)].

Původci tohoto vynálezu zjišťují, že způsob značení radionuklidem protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem je nejsnadněji proveditelný, pokud se roztok obsahující radioaktivní značku upraví na pH zhruba mezi 3,0 a 6,0, ještě lépe zhruba do 4,2, před smísením s protilátkou konjugovanou s chelatotvorným prostředkem. Pro úpravu pH se zvláště preferuje octan sodný s nízkým obsahem kovů, i když lze použít i jiné pufrů. Přednostně se používá octan sodný při koncentracích mezi zhruba 10 a 1000 mM a ještě lépe 50 mM.

Když je použitým radionuklidem ^{111}In ve formě chloridu, je objem chloridu ^{111}In použitý pro přípravu jedné dávky pro podání obvykle zhruba 203 MBq (5,5 mCi) děleno koncentrací radioaktivity v době značení. Pro podání pacientovi je obvyklá diagnostická dávka ^{111}In zhruba 74 až 370 MBq (2 až 10 mCi). Množství roztoku octanu sodného použité pro úpravu pH se mění v závislosti na koncentraci octanu sodného a zředění izotopického nosiče a může být proto velmi široké. Při koncentracích octanu sodného 50 mM je množství požadované pro úpravu pH obvykle 1,2 násobek objemu roztoku ^{111}In ve formě chloridu, i když lze použít i větší objemy. Je třeba si uvědomit, že poměr octanu sodného ke kyselině chlorovodíkové je důležitým faktorem a množství použitého roztoku octanu sodného se mění v závislosti na množství a koncentraci kyseliny chlorovodíkové v pufru. Poté se smísí zhruba 1 ml protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem při koncentraci zhruba 2 mg/ml s acetátovým roztokem radioaktivní značky a směs se inkubuje zhruba po dobu 30 min nebo po dobu dostatečnou pro dosažení optimálního značení protilátky. Toto časové rozmezí může být zhruba od 30 s do 60 min. Poté se přidá formulační pufr v množství nezbytném pro dosažení celkového konečného objemu zhruba 10 ml.

Optimální čas požadovaný pro značení protilátky se může měnit v závislosti na protilátce, konkrétní radioaktivní značce a konkrétním použitém konjugátu. Faktorem ovlivňujícím optimalizaci času pro značení radionuklidem je poměr chelatotvorného prostředku k protilátce, která se má označit. Poměr chelatotvorného prostředku k protilátce musí být například dostatečně vysoký pro dosažení terapeuticky použitelných hladin inkorporace, to jest 90 až 95 % v závislosti na použitém radionuklidu, ale nesmí být příliš široký, aby se neohrozila strukturní integrita a imunoreaktivita protilátky. To vyžaduje určitý vyrovnávací proces, který může v některých případech vést k nižší hladině konjugovaného chelatotvorného prostředku a k prodloužení času značení.

Například pro 2B8 a MX-DTPA se zjišťuje, že značení lze provést v kratší době než 5 min pro ^{90}Y a zhruba v průběhu 30 min pro ^{111}In s dosažením požadované hladiny inkorporace radioaktivní látky při molárním poměru chelatotvorného prostředku k protilátce pouhých 1,5:1. Proto není třeba zvyšovat poměr chelatotvorného prostředku k protilátce, neboť se dosahuje požadované hladiny radioinkorporace. Navíc není výhodné zvyšovat množství konjugovaného chelatotvorného prostředku, neboť by se tak mohla ovlivnit imunoreaktivita protilátky. Tyto parametry

lze stanovit empiricky pro další protilátky pro návrh souprav jako jsou ty, které se popisují v tomto vynálezu.

Pokud je radionuklidem ^{90}Y ve formě chloridu, je objem roztoku ^{90}Y ve formě chloridu použitý pro přípravu jedné dávky pro podání obvykle v rozmezí od zhruba 370 až 1850 MBq (10 až 50 mCi) a přednostně je zhruba 1665 MBq (45 mCi) děleno koncentrací radioaktivity v době značené. Množství octanu sodného použité pro úpravu pH se mění v závislosti na koncentraci octanu sodného a koncentraci izotopického nosiče a může být proto velmi široké. Při koncentraci octanu sodného 50 mM a ^{90}Y dodávaném v 50 mM roztoku kyseliny chlorovodíkové je množství požadované pro úpravu pH obvykle 1,2 násobek objemu použitého roztoku ^{90}Y ve formě chloridu. Poté se zhruba 1,5 ml protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem o koncentraci zhruba 2 mg/ml smísí s acetátovým roztokem radioaktivní značky a inkubuje se po dobu zhruba 5 min nebo po dostatečný čas pro dosažení optimálního označení protilátky. Takový čas může být v rozmezí od zhruba 30 s do zhruba 60 min. Formulační pufr se přidává v množství nezbytném pro dosažení celkového konečného objemu zhruba 10 ml.

Přednostně se způsob značení radionuklidem podle tohoto vynálezu provádí s použitím soupravy pro značení radionuklidem, která se zde popisuje. Avšak tomu, kdo má zkušenost v oboru, by mělo být zřejmé, že preferované složky a podmínky představují pouze přijatelná vodítka pro provádění způsobu podle tohoto vynálezu a mohou se do určité míry pozměňovat s příslušnou optimalizací. Podmínky, které se odchyľují od preferovaných podmínek, avšak dosud plní účel tohoto způsobu, se uvažují v tom smyslu, že patří do obsahu tohoto vynálezu.

Souprava pro značení radionuklidu podle tohoto vynálezu se může též dodávat s činidly vhodnými pro snadné ověření vazebné afinity protilátky po značení radioaktivním nuklidem. V takové případu lze též použít soupravu podle tohoto vynálezu pro stanovení procenta vazby protilátky označení radionuklidem k její cílové buňce před podáním protilátky pacientovi. Původci tohoto vynálezu také zjišťují, že konkrétní souprava pro imunoesej, která se popisuje, může být použitelná pro testování afinity protilátky obecně, pro kterou není k dispozici purifikovaný antigen. V souladu s tím lze též prodávat složky pro imunoesej jako zvláštní soupravu.

Obecně souprava pro značení radioaktivním nuklidem a imunoesej obsahuje

(i) alespoň jednu lahvičku lyofilizovaných buněk, které exprimují antigen, který se rozpoznává protilátkou v soupravě,

(ii) lahvičku obsahující protilátku konjugovanou s chelatotvorným prostředkem,

(iii) lahvičku obsahující formulační pufr a

(iv) instrukce pro značení radionuklidem protilátky takovým způsobem, že lze protilátku označenou radionuklidem podávat přímo pacientovi bez nutnosti následné purifikace.

Jak se popisuje výše pro soupravu pro značení radionuklidem, může tato souprava též obsahovat lahvičku obsahující pufru pro úpravu pH radionuklidu a sterilní skleněnou reakční lahvičku. Přednostně je pufrem roztok octanu sodného o nízkém obsahu kovů o koncentraci zhruba mezi 10 a 1000 mM a skleněná reakční lahvička o obsahu alespoň 5 ml. Protilátka je přednostně protilátkou proti CD20 a chelačním prostředkem je přednostně MX-DTPA. Ostatní chelatotvorné prostředky lze použít, jak se popisuje výše. Preferovanou konjugovanou protilátkou je 2B8-MX-DTPA, i když je možno označit jakoukoliv protilátku konjugovanou s chelatotvorným prostředkem a vyhodnotit její afinitu. Formulačním pufrem je fyziologický roztok pufrovaný fosfátem obsahující radioprotektivní prostředek a nekonjugovaný chelatotvorný prostředek, jak se popisuje výše, a radionuklid může a nemusí být v soupravě a přednostně je tímto nuklidem ^{111}In nebo ^{90}Y ve formě chloridu. Lze použít i jiné radionuklidy v závislosti na použitém chelatotvorném prostředku.

Rozdíl mezi souborem pro imunoesej/značení radionuklidem a souborem pro značení radionuklidem popsaným výše je zahrnutí antigen–pozitivních buněk, které slouží jako substrátový cíl pro testování afinity protilátky. Jestliže je antigenem CD20, jsou preferovanými CD20–pozitivními buňkami SB buňky (ATCC # CCL 120), avšak lze použít jakékoliv CD20–pozitivní buňky. Soubor pro imunoesej a značení radionuklidem může dále zahrnovat antigen–negativní buňky pro použití jako negativní kontroly. Preferovanými CD20–negativními buňkami jsou HSB buňky (ATCC # CCL 120.1), avšak lze použít jakékoliv CD20–negativní buňky.

Kombinovaná souprava pro značení radionuklidem a imunoesej může ovšem dále obsahovat lahvičku chimérické protilátky proti CD20 navíc k protilátce, která se má značit, pro uskutečnění kombinovaného terapeutického protokolu nebo pro odstranění B buněk v krevním oběhu před diagnostickým zobrazením. Takovou samostatnou protilátkou je přednostně Rituxan®, avšak může jí být kterákoliv protilátka, která dokáže usmrtit tumorové buňky. Je skutečností, že lze kombinovat dva různé typy protilátek v jedné soupravě, to jest protilátky směřované na dva různé antigeny B buněk, pokud kombinovaný terapeutický protokol slouží pro zásah stejného typu buněk, to jest B–buněčného lymfomu.

Jakmile se složky soupravy mají použít pro značení jiných protilátek, lze připravit jiné buňky pro testování afinity protilátky v závislosti na cílovém antigenu. Avšak pro protilátky proti CD20 se imunoesej a souprava pro značení podle tohoto vynálezu zvláště hodí pro komerční účely v tom smyslu, že se dodávají cílové buňky v lyofilizované formě. To umožňuje ověření účinnosti protilátky jednoduchým a systematickým způsobem a odstraňuje potíže a výdaje související s udržováním tkáňových kultur. Lyofilizované buňky se obecně dodávají v alikvotech mezi 0,5 a 500 x 10⁶ buněk na lahvičku podle způsobů tohoto vynálezu.

Je možné, že konkrétní zařízení budou preferovat objednávání protilátky, která již byla označena, a v tomto případě může takové zařízení požadovat činidla pro imunoesej pro zajištění skutečnosti, že protilátky uchovávají cílovou afinitu. V tomto případě tento vynález též poskytuje imunoesej pro stanovení procenta vazby značené protilátky na její cílové buňky. Tato souprava zahrnuje alespoň jednu lahvičku fixovaných a/nebo lyofilizovaných antigen–pozitivních buněk a může případně obsahovat antigen–negativní buňky, jak se popisuje výše, pro imunoesej a pro značení soupravy. Navíc by mělo být zřejmé, že odchylky takového souboru mohou zahrnovat neznačenou kontrolní protilátku pro ověření specifity vazby protilátky zákazníka kompetitivní esejí.

Jestliže je antigenem CD20 jsou CD20–pozitivními buňkami přednostně SB buňky (ATCC # CCL 120) a CD20–negativními buňkami jsou přednostně HSB buňky (ATCC # CCL 120.1), které se dodávají v lyofilizované formě v alikvotech mezi 0,5 až 50 x 10⁶ buněk. V tomto případě je protilátkou přednostně konjugát MX–DTPA s 2B8 značený radionuklidem ¹¹¹In nebo ⁹⁰Y.

Z hlediska dalších ztělesnění soupravy, která se zde popisuje, je třeba zdůraznit, že jednou z výhod soupravy pro značkování radionuklidu a způsobu podle tohoto vynálezu je skutečnost, že není třeba provádět žádný další purifikační krok a protilátka značená radionuklidem se může podávat přímo pacientovi, čímž se ušetří cenný čas a zvýší se stabilita protilátky. Proto se zdůrazňuje, že i když může kliník požadovat testování či verifikaci vazebné specifity a afinity protilátky označené radionuklidem před podáním, lze tento test provést s konkrétními radionuklidy, pokud jde o stabilitu protilátky a inhibici radiolýzy, například s yttriem. Poskytnutím ztělesnění soupravy, kterou lze testovat vazebnou afinitu a specifitu, původci tohoto vynálezu v žádném případě neuvažují, že se takové testy absolutně požadují při způsobech a soupravách podle tohoto vynálezu. Možnost testování této validity protilátky je čistě na volbě klinika.

Původci tohoto vynálezu též zjišťují, že způsob použitý pro přípravu fixovaných a lyofilizovaných buněk pro imunoesej podle tohoto vynálezu je zvláště vhodný pro přípravu buněk pro komerční soupravy. Buňky lze fixovat před lyofilizací pro zlepšení struktury/stability. Buňky

podle tohoto vynálezu vykazují zejména vysokou reprodukovatelnost při jejich použití pro imunoeseje protilátky.

5 Tento vynález zejména zahrnuje způsob přípravy lyofilizovaných buněk obsahující následující kroky

- (i) sbírání buněk při hustotě buněk 0,5 až 2×10^6 buněk na ml centrifugací,
- (ii) promytí buněk alespoň jednou vyváženým roztokem soli, to jest HBSS,
- 10 (iii) resuspendování peletovaných buněk v lyofilizačním pufru obsahujícím vyvážený roztok soli obsahující nosný protein a alespoň jeden typ cukru,
- (iv) přidělení alikvotu resuspendovaných buněk do mikrocentrifugační zkumavky nebo skleněné lahvičky a
- 15 (v) lyofilizace buněk po dobu 12 až 96 h a přednostně 24 až 72 h při tlaku zhruba 5,3 až 8 Pa. Tento způsob je zvláště vhodný pro přípravu lyofilizovaných buněk, při kterém jsou těmito buňkami SB buňky (ATCC # CCL 120) nebo HSB buňky (ATCC # CCL 120.1), avšak pravdě-
- 20 podobně je použitelný i pro jiné typy buněk.

Pufr přednostně obsahuje bovinní serumalbumin jako proteinový nosič při koncentraci 1 % (hmotnost/objemem) a mannitol při koncentraci 10 %. Avšak zřejmě lze použít jiné proteinové nosiče, to jest HSA a jiné cukry. Buňky se získávají centrifugací při rychlosti zhruba 1300 min^{-1} a přidá se roztok soli HBSS (Hankův vyvážený solný roztok). Buňky se obecně resuspendují při koncentraci 50×10^6 buněk na ml. Avšak tomu, kdo má zkušenost v oboru, by mělo být zřejmé, že výše popsané podmínky lze mírně modifikovat bez významného ohrožení životnosti buněk. Navíc lze výše popsané podmínky doplnit přidavnými způsoby navrženými pro optimalizaci procesu pro větší množství buněk, například diafiltrací s tangenciálním tokem pro výměnu buněk do lyofilizačního pufru.

35 Soupravy radioimunoesejí podle tohoto vynálezu lze použít při esejích pro vyhodnocení vazebné afinity protilátky značené radionuklidem. Taková esej je rovněž předmětem tohoto vynálezu. Imunoesej pro stanovení procenta vazby protilátky značené radionuklidem s její cílovou buňkou zahrnuje obecně následující kroky:

- (i) smísení alespoň jednoho alikvotu protilátky značené radionuklidem s alespoň jedním alikvotem antigen–pozitivních buněk,
- 40 (ii) smísení alespoň jednoho alikvotu protilátky značené radionuklidem identického s alikvotem kroku (i) s alespoň jedním alikvotem zředovacího pufru téhož objemu, jako je objem alikvotu antigen–pozitivních buněk v kroku (i) pro kontrolní stanovení,
- (iii) peletizace buněk centrifugací,
- 45 (iv) změření radioaktivity v supernatantu peletovaných buněk a kontroly a
- (v) srovnání radioaktivity v buněčném supernatantu s radioaktivitou kontroly.

50 Pokud soupravy pro značení radionuklidy podle tohoto vynálezu případně obsahují ^{111}In ve formě chloridu nebo ^{90}Y ve formě chloridu, provádí se imunoesej podle tohoto vynálezu obvykle s protilátkami značenými ^{111}In nebo ^{90}Y . Pokud je radioaktivní značkou ^{111}In , měří se aktivita ve zkumavkách pro imunoesej čítačem gama. Pokud je značkou ^{90}Y , měří se aktivita s použitím scintilačního počítáče, avšak lze rovněž použít čítač gama.

55

Pro imunoesej podle tohoto vynálezu je preferovanou protilátkou protilátka proti CD20 a protilátkou proti CD20 je přednostně 2B8 a tato protilátka 2B8 se značí s použitím soupravy pro značení radionuklidu podle tohoto vynálezu. Lze však testovat jakoukoliv protilátku značenou radionuklidem s podmínkou, že jsou k dispozici buňky exprimující konkrétní antigen. Pokud je tímto antigenem CD20, jsou preferovanými buňkami pro provedení eseje SB buňky (ATCC # CCL 120), avšak esej se též optimalizuje a provádí s jakoukoliv protilátkou značenou radionuklidem a příslušnou cílovou buňkou.

Zředovací pufr použitý pro esej by měl udržovat vazbu protilátky, to jest měl by se použít fyziologický pufr případně obsahující proteinový nosič, například bovinní serumalbumin pro minimalizaci nespecifické vazby s buňkami. I když se používá jako kontrola zkumavka se zředovacím pufrem, lze použít další kontrolu při esej s antigen–negativními buňkami. V tomto případě imunoesej dále zahrnuje následující kroky:

(i) smísení alespoň jednoho alikvotu protilátky značené radionuklidem s alespoň jedním alikvotem antigen–negativních buněk,

(ii) peletizace antigen–negativních buněk centrifugací,

(iv) měření radioaktivity supernatantu antigen–negativních peletovaných buněk a

(v) srovnání množství aktivity v antigen–negativním buněčném supernatantu s množstvím radioaktivity v supernatantu antigen–pozitivních buněk a kontrolou.

Srovnání radioaktivity obdržené z této zkumavky s kontrolou zředovacího pufru poslouží jako měřítko množství nespecifické vazby na antigen–pozitivní buňky. Pokud je antigenem CD20 a CD20–pozitivními buňkami jsou SB buňky, jsou CD20 negativními buňkami přednostně HSB buňky (ATCC # CCL 120.1).

Jak se popisuje výše, lyofilizované buňky podle tohoto vynálezu poskytují jednoduchý, účinný a reprodukovatelný standard pro testování vazebné účinnosti protilátky značené radionuklidem. Proto se imunoesej podle tohoto vynálezu přednostně provádí s použitím lyofilizovaných buněk v soupravách pro imunoeseje podle tohoto vynálezu. Navíc se mohou soubory pro značení radionuklidem podle tohoto vynálezu kombinovat s imunoesejemi podle tohoto vynálezu, jestliže se protilátka nejprve označí způsobem značení protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem, jak se popisuje v tomto vynálezu. Nejpreferovanějším způsobem provedení imunoeseje podle tohoto vynálezu je použití imunoeseje a souprav pro značení radionuklidem, jak se zde popisuje.

Mohou nastat určité případy, při kterých je třeba testovat či verifikovat afinitu protilátky, avšak radioaktivní značka dosud není připojena. Například za určitých okolností, to jest při zjišťování příčiny problému, může být výhodné testovat vazebnou aktivitu protilátky před značením radionuklidem. V takovém případě tento vynález též zahrnuje kompetitivní imunoesej pro vyhodnocení afinity testovací protilátky k cílové buňce skládající se z následujících kroků

(i) příprava kontrolní protilátky značené ruthenium použitím známé protilátky specifické pro tentýž antigen,

(ii) inkubace vzrůstajících množství zkušební protilátky a vzrůstajících množství neznačené kontrolní protilátky při pevné koncentraci cílových buněk a stopového množství protilátky značené ruthenium, při které jsou každá oddělená koncentrace zkušební protilátky a každá oddělená koncentrace kontrolní protilátky v jednotlivých zkumavkách,

(iii) stanovení vazby v každé reakční zkumavce na základě relativní elektrochemiluminiscence (ECL) nebo přístrojem ORIGIN a

(iv) výpočet střední hodnoty afinity zkušební protilátky.

Průměrná afinita se může vypočítat z hodnot EC₅₀ a známé koncentrace stopové protilátky s použitím způsobu Mullera [J. Immunological Methods, 34, 345 (1980)] nebo jiného příslušného způsobu. Je třeba poznamenat, že se tento rozbor též může použít pro testování afinity protilátek značených radionuklidy nebo jakékoliv protilátky, pro kterou nelze purifikovat antigen, a jako zdroj antigenu se požadují buňky. Fixované, lyofilizované buňky podle tohoto vynálezu se mohou použít jako cílové buňky.

Při provádění kompetitivní imunoeseje podle tohoto vynálezu pro testování aktivity protilátek proti CD20 může být kontrolní protilátkou 2B8 nebo kterákoliv jiná nekonjugovaná protilátka proti CD20. Kontrolní protilátkou může být protilátka konjugovaná chelatovným prostředkem. Zkušební protilátkou může být též konjugát kontrolní protilátky s chelatovným prostředkem. Alternativně může být zkušební protilátkou jiná protilátka proti CD20, jejíž vazebná afinita k CD20 se má zjišťovat ve srovnání s 2B8. Avšak rozbor lze přizpůsobit k použití s protilátkami, které vykazují jiné specifčnosti, pokud jsou k dispozici příslušné cílové buňky.

V kompetitivní imunoeseji podle tohoto vynálezu jsou preferovanými cílovými buňkami CD20–pozitivní buňky, lépe SB buňky (ATCC # CCL 120) a nejlépe resuspendované lyofilizované SB buňky připravené podle způsobu tohoto vynálezu. Buňky lyofilizované s použitím jiných způsobů nebo fixované buňky jsou rovněž použitelné. Protilátka značená ruthenem se obvykle připravuje způsobem zahrnujícím inkubaci kontrolní protilátky s N–hydroxysukcinimidesterem ruthenium(II) tris–bipyridinového chelatovného prostředku (TAG–NHS), i když se rovněž uvažují jiné známé způsoby značení protilátek. Pro značení se kontrolní protilátka a TAG–NHS přednostně inkubují v molárním poměru zhruba 1:15.

Tyto a další aspekty tohoto vynálezu lze objasnit odkazem na následující obrázky, příklady a popis vynálezu.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1. Imunoreaktivita nativního 2B8 se srovnává s komerčně dostupnými protilátkami B1 proti CD20 (Coulter) a Leu 16 (Becton Dickinson) přímou kompeticí v radioimunoeseji s použitím B1 značené ¹²⁵I. Antigen–pozitivní SB buňky (100 000) se přidají do každé jamky filtračních desek V&P, 10 ng B1 značené radionuklidem se smísí s různými koncentracemi neznačené kompetitivní látky a směs se přidá k buňkám. Protilátky se inkubují s buňkami po dobu 1 h při teplotě okolí. Stanovení se provedou po trojicích. Poté se jamky promyjí, vysuší a stanoví se aktivita na filtru. Znázorněné údaje jsou opravené na aktivitu pozadí a představují průměry z trojic stanovení.

Obrázek 2. Vzrůstající množství nekonjugované 2B8 se analyzují ohledně vazby na lidské B buňky (SB) s použitím analýzy FACS. Srovnání se provádějí s komerčně dostupnou monoklonální protilátkou proti CD20 (B1) a se dvěma irelevantními isotypickými protilátkami. Jako druhé činidlo se použije kozí protilátka proti myším IgG–FITC F(ab')₂. Výsledky ukazují, že 2B8 je specifická pro antigen CD20 a vykazuje vyšší vazbu než B1.

Obrázek 3. Lidské B buňky (SB) se inkubují se vzrůstajícími množstvími 2B8 značené radionuklidem ¹²⁵I. Vzorky po trojicích se inkubují po dobu jedné h a aktivita navázaná na buňky se stanoví po filtraci, kterou se získají buňky. Scatchardova analýza umožňuje výpočet zdánlivé konstanty afinity 4,3 x 10⁻⁹ M.

Obrázek 4. Imunoreaktivita nativní 2B8, 2B8–MX–DTPA a B1. Protilátka B1 se značí podle popisu v oddílu Způsoby provedení. 10 ng B1 označené radionuklidem se smísí se vzrůstajícími

koncentracemi kompetitivní látky a směs se přidá do jamek na filtračních deskách V&P obsahujících každá 100 000 antigen–pozitivních SB buněk. Veškerá stanovení se provádějí po trojicích. Po 1 h inkubace při teplotě místnosti se jamky dostatečně promyjí. Následně se filtry vysuší a připojená aktivita se stanoví měřením četnosti impulzů aktivity gama. Veškeré hodnoty se korigují na pozadí. Znárodněné hodnoty jsou střední hodnoty ze tří stanovení.

Obrázek 5. Protilátka 2B8 se formuluje při konečné koncentraci 10 mg/ml v normálním fyziologickém roztoku nebo v normálním fyziologickém roztoku obsahujícím 10 mM glycin–hydrochloridu o pH 6,8. Dvojitě soubory vzorků se poté umístí do lahviček se šroubovým uzávěrem, lahvičky se promyjí proudem dusíku a uzavrou. Vzorky se poté inkubují při teplotě 4 nebo 30 °C po dobu 12 týdnů. Imunoreaktivita vzorků se hodnotí každý týden. Nepozoruje se žádná ztráta imunoreaktivity u žádného ze vzorků 2B8 v průběhu 12–týdenní studie. Imunoreaktivity v týdnu 1 (obrázek 5A), týdnu 6 (obrázek 5B) a týdnu 12 (obrázek 5C) jsou znázorněné na obrázcích.

Obrázek 6. Imunoesej pro stanovení imunoreaktivity 2B8–MX–DTPA značené radionuklidem ^{111}In inkubované ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem o pH 7,4 obsahujícím lidský serumalbumin o koncentraci 50 mg/ml (inkubace 48 h). Obrázek 6A) Konstantní množství protilátky značené radionuklidem (5 ng/ml) se inkubuje se vzrůstajícími objemy SB buněk (20×10^6 buněk/ml). Aktivita měřená jako četnost impulzů (impulzů/min) navázaná na buňky se vynáší proti objemu přidané buněčné suspenze. Obrázek 6B) Vynáší se celková aplikovaná aktivita vzhledem k navázané aktivitě (AT/B). Lineární extrapolace umožňuje výpočet úseku na ose y (0,997). Převrácená hodnota úseku na ose y x 100 poskytuje imunoreaktivitu 100 % při nekonečném přebytku antigenu.

Obrázek 7. Autoradiogramy obdržené z analýzy SDS–PAGE 2B8–MX–DTPA označené radionuklidem ^{90}Y inkubované při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem o pH 7,4 obsahujícím lidský serumalbumin o koncentraci 75 mg/ml a DTPA o koncentraci 1 mM. V daných časech se vzorky podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris–glycinových gelech za neredukčních podmínek, denaturačních podmínek (SDS). Vzorky se nanášejí v množství 5 μl (dráhy 1, 2), 10 μl (dráhy 5, 6). Gely se exponují s rtg. filmem po dobu zhruba 15 min při teplotě okolí a fotografují.

Obrázek 8. Denzitometrický záznam radiogramu času nula obdržného z analýzy SDS–PAGE 2B8–MX–DTPA značené radionuklidem ^{90}Y inkubované při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem, pH 7,4, obsahujícím lidský serumalbumin o koncentraci 75 mg/ml a DTPA o koncentraci 1 mM. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris–glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorky se nanášejí v množství 5, 10 a 20 μl , každé množství do dvou jamek. Gel se exponuje s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a jedna z drah se snímá s použitím denzitometru. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#2) je 96,2 %.

Obrázek 9. Denzitometrický záznam autoradiogramu obdržného po době 48 h na základě SDS–PAGE 2B8–MX–DTPA značené ^{90}Y a inkubované při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem, pH 7,4, obsahujícím lidský serumalbumin o koncentraci 75 mg/ml a DTPA o koncentraci 1 mM. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris–glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorky se nanášejí v množství 5, 10 a 20 μl , každé množství do dvou jamek. Gel se exponuje s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a jedna z drah se snímá s použitím denzitometru. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#2) je 95,5 %.

Obrázek 10. Autoradiogramy obdržné z analýzy SDS–PAGE 2B8–MX–DTPA značené ^{111}In inkubované při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem o pH 7,4 obsahujícím lidský serumalbumin o koncentraci 50 mg/ml. V daných časech se vzorky podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris–glycinových gelech za neredukčních podmínek. Vzorky se nanášejí v množství 5 μl (dráhy 1, 2), 10 μl (dráhy 3, 4) a 20 μl (dráhy 5, 6). Gely se exponují s rtg. fil-

mem po dobu zhruba 15 min při teplotě okolí a fotografují. (Poznámka: Autoradiogram po době 48 h se obdrží s použitím zesilovacích štítů, které poskytují vyšší signál, ve srovnání s autoradiogramem času nula).

5 Obrázek 11. Denzitometrický záznam autoradiogramu časem nula obdrženého z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{100}In inkubované při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem, pH 7,4, obsahujícím lidský serumalbumin o koncentraci 50 mg/ml. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorky se nanášejí v množství 5, 10 a 20 μl , každé množství do dvou jamek. Gel se
10 exponuje s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě místnosti a jedna z drah se snímá s použitím denzitometru. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#3) je 95,9 %.

15 Obrázek 12. Denzitometrický záznam autoradiogramu času 48 h obdrženého z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{100}In inkubované při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem, pH 7,4, obsahujícím lidský serumalbumin o koncentraci 50 mg/ml. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorek se nanáší v množství 5, 10 a 20 μl , každé množství do dvou jamek. Vzorek se
20 exponuje s 5 rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a jedna z drah se snímá s použitím denzitometru. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem je 97,0 % (kombinované plochy píků #2, 3 a 4).

25 Obrázek 13. Autoradiogramy obdržené z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y inkubované při teplotě 37 °C v lidském séru. Při udaných časech se vzorky podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinových gelech za neredukčních podmínek. Vzorky se nanášejí v množství 5 μl (dráhy 1, 2), 10 μl (dráhy 3, 4) a 20 μl (dráhy 5, 6). Gely se exponují s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a fotografují.

30 Obrázek 14. Denzitometrický záznam autoradiogramu času nula obdrženého z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y inkubované při teplotě 37 °C v lidském séru. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorek se nanáší v množstvích 5, 10 a 20 μl , každé množství do dvou jamek. Gely se exponují s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a jedna z drah se snímá s použitím denzitometru. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#2) je 97,9 %.

35 Obrázek 15. Denzitometrický záznam autoradiogramu času 98 h obdržené z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y inkubované při teplotě 37 °C v lidském séru. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorek se nanáší v množství 5, 10 a 20 μl , každé množství do dvou jamek. Gely se exponují s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a jedna z drah se snímá s použitím denzitometru. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#2) je 94,7 %.

45 Obrázek 16. Autoradiogramy obdržené z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In inkubované při teplotě 37 °C v lidském séru. V daných časech se vzorky podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinových gelech za neredukčních podmínek. Vzorky se nanášejí v množstvích 5 μl (dráhy 1, 2), 10 μl (dráhy 3, 4) a 20 μl (dráhy 5, 6). Gely se exponují s rtg. filmem zhruba po dobu 16 až 20 h při teplotě okolí a fotografují.

50 Obrázek 17. Denzitometrický záznam autoradiogramu času nula obdrženého z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In inkubované při teplotě 37 °C v lidském séru. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorek se nanáší v množstvích 5, 10 a 20 μl , každé množství do dvou jamek. Gely se exponují s rtg. filmem po dobu zhruba 16 až 20 h při teplotě okolí a jedna z drah se snímá

s použitím denzitometru. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#3) je 95,3 %.

Obrázek 18. Denzitometrický záznam autoradiogramu času 96 h obdrženého z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y inkubované při teplotě 37 °C v lidském séru. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorek se nanáší v množstvích 5, 10 a 20 μl , každé množství do dvou jamek. Gely se exponují s rtg. filmem po dobu zhruba 16 až 20 h při teplotě okolí a jedna z drah se snímá s použitím denzitometru. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#3) je 94,0 %.

Obrázek 19. Opice *Cynomolgus* obdrží intravenózně každých 48 h celkem 7 injekcí. Jsou znázorněna podaná množství. Hladiny T-buněk a B-buněk v oběhu se stanoví analýzou FACS s použitím protilátek proti CD2 (T-buňky), proti Mo-IgG (2B8), proti CD20 (Leu 16) a proti lidskému IgG (B-buňky). Hladiny T-buněk zůstávají neovlivněné (Skupina zvířat V obdrží jednu dávku).

Obrázek 20. Zotavení hladin B-buněk v oběhu u zvířat, která dostávala 2B8 sledované analýzou FACS s použitím protilátek značených fluorescenčním prostředkem popsáným stručně v popisu obrázku 19. Zvířata skupin III a IV se nemonitorují a usmrtí se v den 13.

Obrázek 21. Opice *Cynomolgus* dostávají intravenózně 2B8-MX-DTPA značenou radionuklidem ^{89}Y připravenou s použitím 2B8-MX-DTPA pro klinické použití. Zvířata obdrží dávky výše popsaných množství každých 48 h, celkem 7 dávek. Ve dnech 0, 2, 7, 10 a 14 se po odběru krve vyhodnotí sérové chemické a hematologické faktory a hladiny B-buněk v krevním oběhu (sérum dne 10 se nehodnotí ohledně obsahu B-buněk). V průběhu studia se nevyskytují žádné význačné abnormality kromě sníženého počtu celkových lymfocytů u všech zvířat vyjma jednoho zvířete ve skupině II.

Obrázek 22. Clearance myši protilátky 2B8 proti CD20 z opic *Cynomolgus* se stanoví rozbořem ELISA po jedné injekci 10 mg/kg dne nula. Jak ukazuje část A, protilátka vykazuje hodnotu $\beta_{t_{1/2}}$ zhruba 4,5 d. Clearance protilátky 2B8 a jejího konjugátu s MX-DTPA z krevního oběhu myši BALB/c ukazuje část B. Myši obdrží intravenózně 25 μg nativní či konjugované 2B8 a vzorky krve se odebírají v různých časech až do doby 264 h po injekci. Séra se poté analyzují enzymatickou imunoesejí s použitím buněk SB jako vychytávacího prostředku. Nativní i konjugované protilátky vykazují hodnoty clearance 8,75 d.

Obrázek 23. 20 myši BALB/c, každá obdrží 40,7 kBq (1,1 μCi) konjugátu značeného radionuklidem (100 μl) ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem o pH 7,4 s obsahem HSA 50 mg/ml. Skupiny po 5 zvířatech se usmrtí v časech 1, 24, 48 a 72 h a poté se připraví krev a různé tkáně a stanoví se v nich připojená aktivita.

Obrázek 24. 20 myši BALB/c, každá obdrží intravenózně zhruba 37 kBq (1,0 μCi) (ve 100 μl) značeného konjugátu v 1X PBS, pH 7,4, s obsahem 75 mg/ml lidského serumalbuminu s obsahem 1 mM MDPA. Skupiny po pěti myších se utratí v časech 1, 24, 48 a 72 h a poté se připraví krev a různé tkáně a stanoví se v nich připojená aktivita.

Obrázek 25. Athymické myši s Ramosovými B-buněčnými tumory obdrží intravenózně 888 kBq (24 μCi) 2B8-MX-DTPA značeného ^{111}In a skupiny po třech myších se utratí v časech 0, 24, 48 a 72 h. Po přípravě tkání a stanovení připojené aktivity se vyhodnotí procenta podané dávky na g tkání a vynesou do grafu.

Obrázek 26. Imunoesej pro stanovení imunoreaktivity „mix-&-shoot“ 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y , inkubované s PBS při pH 7,4 s obsahem 50 až 75 mg/ml lidského serumalbuminu (inkubace 48 h). Část A) Konstantní množství protilátky značené ^{90}Y (zhruba 1 ng/ml)

se inkubuje s rostoucími množstvími SB buněk. Aktivita vyjádřená jako četnost impulzů (impulzů/min) navázaná na buňky se vynáší proti koncentraci buněk. Část B) Celková podaná aktivita ^{90}Y ve srovnání s navázanou aktivitou (AT/B) se vynáší do grafu. Lineární extrapolace umožňuje výpočet úseku na ose y (1,139). Převrácená hodnota úseku na ose y x 100 poskytuje hodnotu imunoreaktivity 87,9 % při nekonečném přebytku antigenu. Nedochází k žádné vazbě s CD20 negativními buňkami (HSB).

Obrázek 27. Autoradiogramy obdržené z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y , inkubované při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem o pH 7,4 s obsahem 75 mg/ml lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA. Při udaných časech se vzorky podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinových gelech za neredukčních podmínek, denaturačních podmínek (SDS). Vzorky se nanášejí v množstvích 5 μl (dráhy 1, 2), 10 μl (dráhy 5, 6). Gely se exponují s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a fotografují.

Obrázek 28. Denzitometrický záznam autoradiogramu času nula obdržného z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y , inkubované při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem o pH 7,4 obsahujícím koncentraci 75 mg/ml lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorek se nanáší v množstvích 5, 10 a 20 μl , každé množství do dvou jamek. Gel se exponuje s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a jedna z drah se snímá s použitím denzitometru. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#2) je 96,1 %.

Obrázek 29. Denzitometrický záznam autoradiogramu času 48 h obdržného z analýzy SDS-PAGE 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y , inkubované při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem při pH 7,4 obsahujícím koncentraci 75 mg/ml lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA. Vzorek se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinovém gelu za neredukčních podmínek. Vzorek se nanáší v množstvích 5, 10 a 20 μl , každé množství do dvou jamek. Gel se exponuje s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a jedna z drah se snímá s použitím denzitometru. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#2) je 94,1 %.

Obrázek 30. Autoradiogramy obdržné z analýzy SDS-PAGE pro „mix-&-shoot“ protilátku 2B8-MX-DTPA značenou radionuklidem ^{90}Y , inkubovanou při teplotě 37 °C v lidském séru. V udaných časech se vzorky podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinových gelech za neredukčních podmínek. Vzorky se nanášejí v množstvích 5 μl (dráhy 1, 2), 10 μl (dráhy 3, 4), 20 μl (dráhy 5, 6). Gely se exponují s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě místnosti a fotografují.

Obrázek 31. Denzitometrický záznam autoradiogramu času nula obdržného z analýzy SDS-PAGE pro „mix-&-shoot“ protilátku 2B8-MX-DTPA značenou radionuklidem ^{90}Y , inkubovanou při teplotě 37 °C v lidském séru. Vzorky se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinových gelech za neredukčních podmínek. Vzorky se nanášejí v množstvích 5 μl , 10 a 20 μl do dvou jamek. Gely se exponují s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a jedna z drah se snímá denzitometrem. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#2) je 89,1 %.

Obrázek 32. Denzitometrický záznam autoradiogramu času 72 h obdržného z analýzy SDS-PAGE pro „mix-&-shoot“ protilátku 2B8-MX-DTPA značenou radionuklidem ^{90}Y , inkubovanou při teplotě 37 °C v lidském séru. Vzorky se podrobí elektroforéze na 4 až 20% Tris-glycinových gelech za neredukčních podmínek. Vzorky se nanášejí v množstvích 5 μl , 10 a 20 μl do dvou jamek. Gely se exponují s rtg. filmem zhruba po dobu 15 min při teplotě okolí a jedna z drah se snímá denzitometrem. Relativní plocha píku konjugátu značeného radionuklidem (#2) je 88,8 %.

Obrázek 33. 20 myši BALB/c, každá obdrží intravenózně 185 kBq (5 μ Ci) 2B8–MX–DTPA značené ^{90}Y v 1 X PBS, pH 7,4 s obsahem 75 $\mu\text{l/ml}$ lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA. Skupiny po pěti zvířatech se usmrtí v časech 1, 24, 48 a 72 h a jejich krev a různé tkáně se připraví a analyzují ohledně připojené aktivity.

Obrázek 34. Vyrůstající množství protilátky 2B8 odvozené od CHO a označené se inkubují spolu s pevnými koncentracemi čerstvě získaných CD20–pozitivních B–buněk (SB) nebo CD20–negativních T–buněk (HSB). Protilátka navázaná na buňky se vyjádří kvantitativně s použitím analýzy FACS pomocí kozi protilátky proti myším IgG–FITC F(ab) $^{\prime}_2$, jak se zde popisuje. Srovnání se provádí s irelevantní isotypickou protilátkou (S004). Pouze odvozenou od CHO. Protilátka 2B8 vykazuje zřetelnou vazbu na CD20–pozitivní SB buňky.

Obrázek 35. Imunoreaktivita 2B8 odvozené od CHO se srovnává s mateřskou protilátkou 2B8–49 vytvářenou v buněčné linii hybridomu přímou kompeticí v esejí ORIGIN. Vyrůstající množství protilátky se inkubují s pevnou koncentrací CD20–pozitivních B–buněk (SB) a stopovým množstvím CHO 2B8 značené rutheniem. Po inkubaci po dobu 3 h při teplotě místnosti se navázané množství vyjádřené jako relativní elektrochemiluminiscence (ECL) stanoví pomocí přístroje ORIGIN, jak se popisuje v oddílu Materiály a způsob provedení. Hodnoty představují průměry z dvojic stanovení. Střední afinitní konstanty pro CHO 2B8 a 2B8–49 jsou podle výpočtu $1,3 \times 10^{-10}$ M respektive $2,5 \times 10^{-10}$ M. Pro srovnání se používá irelevantní isotypická protilátka (S004).

Obrázek 36. Vazba konjugátů 2B8–MX–DTPA připravených z 2B8 odvozené od CHO se srovnává s nekonjugovanou protilátkou přímou kompeticí v esejí ORIGIN. Konjugáty se připraví inkubací 2B8 s MX–DTPA po dobu 8, 17 a 24 h před odstraněním nezreagovaného chelátu. Pro hodnocení vazby se protilátky inkubují s pevnými koncentracemi CD20–pozitivních B–buněk (SB) a stopovým množstvím CHO 2B8 značené rutheniem. Po inkubaci po dobu 3 h při teplotě okolí se stanoví vazba vyjádřená jako relativní elektrochemiluminiscence (ECL) s použitím přístroje ORIGIN, jak se popisuje v oddílu Materiály a způsoby provedení. Hodnoty představují průměry z dvojic stanovení. Přípravky konjugátu vykazují podobnou vazbu ve srovnání s volnou protilátkou 2B8.

Obrázek 37. A) SB buňky se promyjí a resuspendují na koncentraci 90×10^6 buněk/ml zředovacím pufrem (1X PBS, pH 7,4) obsahujícím 1 % (hmotnost/objem) bovinního serumalbuminu. Vyrůstající koncentrace buněk se inkubují po dobu 3 h se 7,5 ng/ml In2B8, která se připraví s použitím 2B8–MX–DTPA, šarže 0165A. B) Dvojitě inverzní vynesení koncentrace buněk proti poměru vázaná aktivita/celková aktivita (B/AT). Imunoreaktivita se vypočítá jako úsek $1/y \times 100$. Zjištěné hodnoty imunoreaktivity a korelačního koeficientu (R) jsou 80,6 % respektive 0,981.

Obrázek 38. A) SB buňky se promyjí a resuspendují na koncentraci 90×10^6 buněk/ml zředovacím pufrem (1X PBS, pH 7,4) obsahem 1 % (hmotnost/objem) bovinního serumalbuminu. Vyrůstající koncentrace buněk se inkubují po dobu 3 h s 2 ng/ml Y2B8, která se připraví s použitím 2B8–MX–DTPA, šarže # 0165A. B) Dvojitě inverzní vynesení buněčné koncentrace proti poměru vázaná aktivita/celková aktivita (B/AT). Imunoreaktivita se vypočítá jako úsek $1/y \times 100$. Zjištěné hodnoty imunoreaktivity a korelačního koeficient (R) jsou 72,2 % respektive 0,999.

Podstata vynálezu

Pokud se nedefinuje jinak, mají veškeré technické a vědecké pojmy stejný význam, jako je význam, který obvykle chápe ten, kdo má běžnou zkušenost v oboru, kterému tento vynález náleží. I když lze v praxi nebo testování tohoto vynálezu použít jakékoliv způsoby a materiály podobné

nebo ekvivalentní těm, které se zde popisují, popisované materiály a způsoby se preferují. Pro účely tohoto vynálezu se definují níže následující pojmy.

5 S nízkým obsahem kovu – znamená činidla zpracovaná pro snížení kontaminace kovem na hladinu, která neovlivňuje inkorporaci radioaktivního nuklidu.

Antigen–pozitivní – znamená antigen, který je rozpoznáván konkrétní protilátkou podle tohoto vynálezu takovým způsobem, že tato protilátka je schopná se s ním vázat.

10 % radioinkorporace (inkorporace radionuklidu) – se týká množství radioaktivní značky z reakce značení radionuklidem, která se konjuguje protilátkou, vztažené na celkové množství radioaktivní značky přidané na počátku reakce.

15 % vazby se týká množství protilátky ze vzorku, která se váže na cílový antigen, specificky nebo nespecificky.

% imunoreaktivity neboli specifická vazba se týká toho množství vzorku protilátky, který se váže na cílový antigen specificky.

20 Diagnostická protilátka se týká protilátky konjugované s radioaktivní značkou, jako je radionuklid ^{111}In , která může poskytnout diagnostické zobrazení tumorů a antigen–pozitivních buněk.

Terapeutická protilátka se týká protilátky konjugované s některým zářičem alfa nebo beta (jako je ^{90}Y), který může uskutečnit usmrcování buněk při vazbě na cílový antigen.

25

Popis vynálezu

30 Preklinický vývoj myší monoklonální protilátky proti CD20, 2B8, konjugované 2B8, 2B8 značené radionuklidem ^{111}In a 2B8 značené radionuklidem ^{90}Y

I. Materiály a způsoby vývoje myší monoklonální protilátky proti CD20, 2B8, konjugované 2B8–MX–DTPA, 2B8–MX–DTPA značené radionuklidem ^{111}In a ^{90}Y MX–DTPA purifikované vysokýkonnou kapalinovou chromatografií

35

A. Materiály

1. Buňky

40 Lidské buněčné linie SB a HSB se obdrží od American Type Culture Collection a pěstují se v RPMI–1640 obsahujícím 10% fetální bovinní sérum. CD20–pozitivní buněčná linie SB je B lymfoblastoidní buněčná linie odvozená od periferního „buffy coat“ (tenká žlutavá vrstva leukocytů nad vrstvou červených krvinek v centrifugované krvi) pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií (1). Antigen–negativní buněčná linie HSB je T–lymfoblastoidní buněčná linie odvozená
45 od tumorů indukovaných u novorozenečských syřských křečků (2). Buněčná linie myšího myelomu SP2/0 se udržuje podobně v RPMI–1640 s obsahem 10% fetálního bovinního séra.

2. Protilátky

50 Protilátky B1 a Leu 16 proti CD20 pochází od Coulter Immunology respektive Becton/Dickinson. Kozí protilátky proti myšimu IgG a kozí protilátky proti lidskému IgG značené ^{125}I se obdrží od ICN. Kozí F(ab')₂ proti myšimu IgG se obdrží od Cappel.

3. Činidla

- Freundovy úplné a neúplné adjuvantní látky se obdrží od Sigma Chemical Company. Polyethylenglykol, koncentrát HAT a HT pocházejí vesměs od Boehringer Mannheim. Fluoresceinisothiokyanát (FITC) pochází od Sigma Chemical Company. Radionuklid ^{111}In ve formě chloridu a radionuklid ^{90}Y ve formě chloridu se obdrží od Amersham nebo NEN Dupont. ^{89}Y ve formě chloridu se obdrží od Aldrich Chemical Company. Všechny ostatní chemikálie pocházejí ze standardních zdrojů.
- Chemikálie použité pro konjugaci a značení radionuklidem se zpracují pro odstranění kontaminujících iontů těžkých kovů, které by konkurovaly s radioizotopy v průběhu kroku značení radionuklidem. Chemikálie se obvykle zpracovávají průchodem roztoků sloupcem iontoměniče Chelax 100 (BioRad Industries) nebo vsádkovým zpracováním přidavkem Chelex 100 k připravenému roztoku. Voda s nízkým obsahem kovů buď „Milli-Q“ nebo „Water for Irrigation“ (WFIr) se používá pro všechny přípravky a všechna zředění. Roztoky neobsahující kovy se podrobí sterilní filtraci a shromažďují se v plastických nádobách.

B. Způsoby provedení

20 1. Příprava a screening supernatantů hybridomu 2B8 pomocí radioimunoeseje

- Myši BALB/c se imunizují s 20 miliony SB buněk suspendovanými ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem s použitím Freundova kompletního adjuvantního prostředku. Buňky se podávají podkožně i intraperitoneálně do více míst zvířete. Po 2 týdnech klidového období se myším podávají podruhé SB buňky emulgované ve Freundově neúplném adjuvantním prostředku. Následné zesilovací imunizační injekce se podávají na základě týdenního rozpisu s použitím SB buněk suspendovaných ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem. Myši se imunizují po dobu 6 týdnů až 4 měsíců.
- Vždy se současně usmrcují dvě zvířata cervikální dislokací a jejich sleziny se vyjmou pro fúzi s myším myelomem SP2/0. Zvířata se volí na základě schopnosti post-imunitního séra účinně inhibovat vazbu radioaktivně značené Coulter B1 protilátky proti CD20 s lidskými SB buňkami. Tři dny před každou fúzí se zvolená zvířata podrobí jedné poslední intravenózní (do ocasní vény) injekci 20 milionů SB buněk v PBS. Při usmrcení se sleziny vyjmou za aseptických podmínek a splenocyty se podrobí fúzi s buňkami SP2/0 v poměru 5:1 (splenocyty:SP2/0). Buňky po fúzi se promyjí médiem pro tkáňové kultury a rozdělí do 96 jamek obsahujících selekční média HAT. Hybridomy se podrobí skreeningu inhibiční radioimunoesejí s použitím protilátky Coulter B1 po 10 až 14 dnech.
- Screening hybridů vylučujících protilátku proti CD20 se uskuteční s použitím zavedených způsobů radioimunoeseje. Ve stručnosti se protilátka Coulter B1 proti CD20 purifikuje Protein A afinitní chromatografií. 50 μg purifikované protilátky se naváže na radionuklid ^{125}I rychlou oxidací za přítomnosti prostředku Iodobeads (Pierce Chemical Co.) podle návodu výrobce. Označená protilátka se zbaví soli na amberlitové pryskyřici a uloží ve zředovacím pufru (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem, pH 7,4, s obsahem 0,2 % želatiny, 0,02 % azidu sodného a 1,0 % bovinního serumalbuminu). 10 ng protilátky označené radionuklidem se umístí do každé jamky předběžně blokované filtrační desky (blokovací pufr: zředovací pufr obsahující 10 % fetálního bovinního séra) spolu s 50 μl supernatantu hybridomu z testovacích jamek a 10000 SB buňkami suspendovanými v 50 μl zředovacího pufru. Suspenze se inkubuje po dobu 1 h při teplotě okolí. Desky se důkladně promyjí promývacím pufrům (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem, pH 7,4 s obsahem 0,2 % želatiny a 0,02 % azidu sodného) na vakuovém sběrném zařízení V&P Scientific a filtrační dna obsahující zachycené buňky se převedou na čítač gama. Jamky obsahující pouze média HAT a značenou protilátku B1 se použijí jako kontroly pozadí a identické jamky obsahující SB buňky se použijí jako pozitivní kontroly. Inhibiční kontroly obsahují proti-

látku B1 značenou radionuklidem a různá množství neznačené protilátky B1 v rozmezí od 2 μg do 2 ng.

2. Průtokově cytometrické studie

a. Buněčné linie

Předběžné průtokově cytometrické studie se provádějí se supernatanty z kultur hybridomu 2B8. 100 μl supernatantu hybridomu se inkubuje s SB buňkami po dobu 1 h při teplotě okolí. Poté se přidá sekundární protilátka [koží F(ab')₂ proti myším IgG, Cappel] použitá při zředění 1/400 a inkubace pokračuje ve tmě po dobu 1 h. Buňky se promyjí 5x. Kontroly zahrnují pouze buňky (nikoliv primární či sekundární protilátku), pro které se stanoví autofluorescence, buňky se sekundární protilátkou pouze pro stanovení nespecifické vazby a komerčně dostupnou B1 konjugovanou s fluoresceinisothiokyanátem (B1-FITC) pro kontrolu populace CD20.

Při některých experimentech se fluorescein kopuluje s purifikovanou protilátkou 2B8 reakcí aminoskupin s fluoresceinisothiokyanátem (FITC). Ve stručnosti se inkubuje protilátka 2B8 (1,2 mg/ml) při pH 9,5 v 0,1M pufru uhličitanu sodného se 150 až 200 μg FITC na mg proteinu. Roztok se inkubuje při teplotě místnosti po dobu 2 h a výsledný konjugát 2B8-FITC se purifikuje na sloupci Sephadex G-25. Ostatní chemikálie použité v těchto studiích, jako je B1 a Leu 16 se obdrží jako fluoresceinové konjugáty přímo od firmy Coulter nebo Becton Dickinson.

Buňky k analýze se odeberou a promyjí 3x fyziologickým roztokem pufovaným fosfátem s obsahem 0,2 % bovinního serumalbuminu a 0,1 % azidu sodného. Životnost se stanoví exkluzí trypanové modři s požadavkem na životnost >90 %. Buněčné koncentrace se upraví na 3 miliony na ml 50 μl přidáním na jamku do 96-jamkových misek se dnem U. Primární protilátka (50 μl) se přidá k příslušným jamkám a směs se inkubuje po dobu 30 min až 1 h při teplotě místnosti. Poté se buňky promyjí 5x fyziologickým roztokem pufovaným fosfátem, 200 μl /jamka, s obsahem 0,2 % BSA a 0,02 % azidu sodného. Buňky se centrifugují v miskách při frekvenci otáčení 1300 min⁻¹ v centrifuze Sorvall a supernatanty se jemně odstraní „klepnutím“ na misky. Druhá protilátka se přidává podle potřeby a inkubuje se po dobu dalších 30 min až 1 h při teplotě okolí ve tmě. Misky se poté promyjí jako výše. Konečně se ke každému vzorku přidá 200 μl fixačního pufru (0,15M roztok chloridu sodného s obsahem 1 % paraformaldehydu při pH 7,4) a zpracované buňky se přenesou do zkumavek 12x75 mm k analýze.

B. Celková krev opic Cynomolgus

Po odstranění plazmy se buňky promyjí 2x centrifugací a resuspendují v HBSS. Přidá se fetální bovinní sérum (2 ml) a buňky se resuspendují. 100 μl resuspendovaných buněk se poté přidá do každé ze 6 15ml kónických centrifugačních zkumavek. Fluorescenčně značené monoklonální protilátky se přidají následujícím způsobem:

Zkumavka 1: myší protilátka proti CD2-FITC (AMAC), 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 μg

Zkumavka 2: koží protilátka proti lidskému IGM-FITC (Fisher) 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 μg ,

Zkumavka 3: koží protilátka proti myším IgG-RPE (Fisher) 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 μg ,

Zkumavka 4: koží protilátka proti myším IgM-FITC + koží protilátka proti myším IgG-RPE (absorbovaná) 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 μg ,

Zkumavka 5: protilátka proti lidskému CD20-FITC (anti-Leu 16, Becton Dickinson) 5 μg ,

Zkumavka 6: pouze buňky (autofluorescence).

Značené protilátky a buňky se centrifugují po dobu 2 min při frekvenci otáčení 1500 min^{-1} pro promíchání buněk a protilátek a všech 6 vzorků se poté umístí na led a inkubuje po dobu 30 min. Následně se zkušavky odstraní z ledu a přidá se cytolytický pufr (předehřátý na 37°C) do dosa-
 5 žení objemu 12 ml. Vzorky se poté inkubují po dobu 15 min při teplotě místnosti, centrifugují po dobu 5 min při teplotě 4°C při frekvenci otáčení 1500 min^{-1} a supernatanty se odeberou. Buněčné pelety se poté promyjí 2x značkovacím pufrem (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem s obsahem 1 % bovinního serumalbuminu a 0,05 % azidu sodného).

10 Následně se buňky fixují přidavkem 0,5 ml fixačního pufru (0,15M roztok chloridu sodného, pH 7,4 s obsahem 1 % paraformaldehydu) na zkušavku a analyzují se na přístroji Becton Dickinson FACScan s použitím autokompence a předběžné kalibrace prostředkem Calibrite. Zelená fluorescence fluoresceinu se měří v režimu FL1 a červená fluorescence fykoeretherinu se měří v režimu FL2. Data se vyjadřují v logaritmické formě. Populace životných lymfocytů se
 15 nejprve identifikují rozptylem světla v pravém úhlu ke směru vpřed v dot plot bitmap. Celková populace lymfocytů se poté izoluje eliminací všech ostatních případů. Následná měření fluorescence odrážejí pouze ty specifické případy, které nastanou v rámci vymezené oblasti.

Pro studie farmakologie/toxikologie vysokých dávek se stanoví předběžné hladiny lymfocytů pro
 20 každou opici Cynomolgus a použijí se jako výchozí hodnoty. Přítomnost T buněk a B buněk a poměry T:B se vypočítají a použijí jako údaje o vyčerpání. Populace B buněk před studií se vyhodnotí pomocí protilátek Leu 16 a protilátek proti lidskému IgM.

Po injekčním podání protilátky 2B8 opicím, kdy se antigen CD20 nasatí 2B8, se procento B
 25 buněk v celkové populaci aproximuje s použitím kozí protilátky proti lidskému IgM-FITC, protilátky proti myšimu IgG-RPE a dvojité označené populace obsahující tyto dva markery. Dvojité označená populace se použije pro kvantitativní vyhodnocení až do vyčištění veškeré 2B8 z periferní krve zvířat. Procento T buněk v celkové populaci lymfocytů se určí s použitím protilátky proti CD2-FITC. Údaje se obdrží jako průměry ze tří hodnot, 10 000 měření se provede
 30 s každým vzorkem. Buňky z každého z určených vzorků krve se vyhodnotí následně s vyčíslením v každém případě T-buněčných a B-buněčných populací v rámci celkové populace lymfocytů. Zkoumají se poměry T:B. Vyčerpání B buněk se vypočítá jako procento snížení B buněk vzhledem k původním hladinám B buněk pro každou jednotlivou opici.

35 3. Značení radioaktivním jodem a imunoprecipitace CD20

Sto milionů SB buněk se rozdělí na dvě stejné části po povrchovém jodování radionuklidem ^{125}I a
 prostředkem Iodobeads (Pierce Chemical Co.). Buňky se opakovaně promyjí centrifugací prováděnou tak dlouho, až se hladiny radioaktivity v supernatantu vrátí na hodnotu pozadí. 100 μg
 40 protilátky 2B8 nebo B1 (Coulter Immunology) se přidá k oběma vzorkům značených B buněk. Protilátky a SB buňky se inkubují přes noc a poté se promyjí třikrát centrifugací tak, aby se odstranila veškerá volná protilátka. Buněčné pelety obsahující vázané protilátky 2B8 a B1 se poté podrobí cytolýze a extrahují přidavkem 1% detergentního prostředku NP-40 v 0,01 M pufru Tris-HCl, pH 8,0, s následnou inkubací při teplotě místnosti po dobu 1 h. Extrakt se centrifuguje
 45 v mikrocetrifuze při vysoké rychlosti po dobu 30 min a supernatanty se přenesou do nových zkušavek. Přidá se protein A-sefaroza (300 μl) do každé zkušavky a pryskyřice se peletuje centrifugací. Poté se protein A-sefaroza promyje 20x pro odstranění nespecificky vázaného jodovaného proteinu. Když dosáhne poměr aktivity tuhé látky k supernatantu hodnoty 100, extrahuje se peleta pufrem SDS PAGE a zahřívá se k varu. Po ochlazení se přidává množství extraktu
 50 o četnosti impulzů zhruba 15000 imp/min do jamek v 10% polyakrylamidovém gelu. Předem označený nízkomolekulární standard (BioRad-Inc.) se přidává do samostatné jamky a použije se pro určení molekulové hmotnosti. Proteiny se rozdělí elektroforézou a gel se vysuší a exponuje s rtg. filmem po dobu 24 h při teplotě -70°C . Poté se film vyvolá a analyzuje.

4. Scatchardova analýza vazby 2B8

Purifikovaná 2B8 se vyhodnotí ohledně zdánlivé afinity Scatchardovou analýzou. 2B8 označená radionuklidem se připraví reakcí s radionuklidem ^{125}I za přítomnosti prostředku Iodobeads. Po odstranění volného jodu se protilátka označená radionuklidem jodu inkubuje při různých koncentracích po dvojicích v rozmezí od 5000 mg/jamka do 35 ng/jamka s 10 000 SB buňkami. Míra vazby protilátky k buňkám se vypočítá ze specifické aktivity protilátky 2B8 označené radionuklidem ^{125}I . Poměr vázaná protilátka/volná protilátka se vynese proti molární koncentraci vázané protilátky a zdánlivá konstanta afinity se stanoví z poměru úseků na ose X a Y.

5. Příprava 2B8–MX–DTPA

a. Zdroj MX–DTPA

Pro některé preklinické studie se získává 1–isothiokyanátobenzyl–3–methyldiethylentriamin–pentaoctová kyselina (MX–DTPA) značená radioaktivním nuklidem uhlíku ^{14}C ve formě tuhé látky podle Dr. Otto Gansowa z National Institute of Health a ukládá se ve vysušeném stavu při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, chráněná před světlem. Zásobní roztoky chelátu se připraví ve vodě Milli–Q a koncentrace se stanoví vyhodnocením aktivity a použitím specifické aktivity sloučeniny. Zásobní roztoky mají obecně koncentraci 2 až 5 mM a ukládají se při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ v polypropylenových zkumavkách. Pro další studie se obdrží MX–DTPA od Coulter Immunology ve formě dvojsodné soli ve vodě a ukládá se při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

b. Udržování podmínek prostředí bez kovů

Navíc k použití chemikálií bez kovů se veškeré manipulace s chemikáliemi provádějí takovým způsobem, aby se omezila možnost kontaminace kovem. Pokud je to možné, používají se polypropylenové plastové nádoby, jako jsou baňky, kádinky a kalibrované válce. Ty se promyjí prostředkem Alconox a vyčerpávajícím způsobem se opláchnou před použitím vodou Milli–Q. Navíc se používají špičky pipet (BioRad) bez kovů pro přesné odměření malých objemů. Pro zpracování velkých objemů nebo chemikálií se používají sterilní plastové serologické pipety (lze obdržet od 1 do 25 ml). Reakce se vhodným způsobem provádějí v polypropylenových mikrocetrifugačních zkumavkách se šroubovým uzávěrem (Sardstedt Industries, 1,5 ml) nebo polypropylenových kónických zkumavkách (Costar, 15 ml a 50 μl). Při manipulaci s dialyzačními trubicemi se používají chirurgické rukavice pro jednorázové použití předem promytí vodou Milli–Q.

c. Příprava protilátky

Myší protilátka 2B8 proti CD20 se nejprve purifikuje z ascitů Protein A a QAE chromatografií. Pro další pokusy se 2B8 purifikuje ze supernatantů bioreaktoru s dutými vlákny s použitím téhož purifikačního způsobu. Protilátka odvozená od dutých vláken se nyní nahradí pro účely komercializace protilátkou odvozenou od CHO popsanou v příkladu 2.

Tato protilátka se připraví pro konjugaci přenesením do 50mM roztoku bicin–NaOH bez kovů, pH 8,6, s přítomností chloridu sodného o koncentraci 150 mM s použitím dialýzy nebo opakované výměny pufru. V některých studiích se výměna pufru provádí s použitím opakované ultrafiltrace s filtry Centricon 30 (Amicon) (30000D MWCO). Obecně se na filtrační jednotku přenesou 50 až 200 μl proteinu (10 mg/ml) a 2 ml bicinového pufru. Filtr se centrifuguje při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ v rotoru Sorval SS–34 při frekvenci otáčení 6000 min^{-1} po dobu 45 min. Objem retence je zhruba 50 až 100 μl . Tento krok se opakuje dvakrát s tímto filtrem. Zbývající látka se přenesou do polypropylenové zkumavky se šroubovým uzávěrem o obsahu 1,5 ml, analyzuje se pro stanovení proteinu, zředí na 10,0 mg/ml a ukládá při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do použití pro konjugaci. Pro některé studie se protein převádí do 50mM roztoku citrátu sodného, pH 5,5, s obsahem chloridu sodného o

koncentraci 150 mM a azidu sodného o koncentraci 0,05 % s použitím stejného způsobu jako se popisuje výše.

d. Způsob konjugace

Konjugace 2B8 s MX-DTPA se provádí v polypropylenových zkumavkách při teplotě okolí. Zmrazené zásobní roztoky MX-DTPA se před použitím ponechají roztát. Obvykle reaguje 50 až 200 μ l protilátky při koncentraci 10 mg/ml s chelátem v molárním poměru chelát k proteinu 4:1. Reakce se zahájí přidávkem chelátového zásobního roztoku a jemným promícháním. Konjugace se ponechá probíhat přes noc, obecně po dobu 14 až 20 h při teplotě okolí. Nezareagovaný chelát se z konjugátu odstraní dialýzou nebo opakovanou ultrafiltrací, jak se popisuje výše, do normálního fyziologického roztoku bez kovů (0,9 % hmotnost/objem) s obsahem 0,05 % azidu sodného. Koncentrace proteinu se upraví na 10 mg/ml a roztok se ukládá při teplotě 4 °C v polypropylenové zkumavce až do doby značení radionuklidem.

e. Stanovení inkorporace chelátu

Inkorporace chelátu se stanoví scintilačním měřením četnosti impulzů a srovnáním hodnoty obdržené s purifikovaným konjugátem se specifickou aktivitou chelátu značeného radionuklidem ^{14}C . Pro další studie, ve kterých se používá neradioaktivní chelát obdržený od Coulter Immunology, se inkorporace chelátu hodnotí inkubací konjugátu s přebytkem roztoku radioaktivního nosiče radionuklidu ^{90}Y o známé koncentraci a specifické aktivitě.

Ve stručnosti se zásobní roztok chloridu yttritého o známé koncentraci připraví v 0,05N roztoku kyseliny chlorovodíkové prostém kovů, ke kterému se přidá beznosičový radionuklid ^{90}Y (ve formě chloridu). Alikvot tohoto roztoku se měří na scintilačním počítači pro stanovení přesné specifické aktivity této látky. Předpokládaný objem chloridu yttritého pro připojení k protilátce, který se rovná dvojnásobku počtu molů chelátu, obvykle 2 mol/mol protilátky, se přidá do polypropylenové zkumavky a pH se upraví na 4,0 až 4,5 2M roztokem octanu sodného. Poté se přidá konjugovaná protilátka a směs se inkubuje po dobu 15 až 30 min při teplotě okolí. Reakce se ukončí přidávkem 20 mM roztoku EDTA do konečné koncentrace 1 mM a pH roztoku se upraví zhruba na 6 2 M roztokem octanu sodného.

Po 5 min inkubace se celý objem purifikuje vysokovýkonnou gelovou permeační chromatografií, jak se popisuje níže. Eluovaná frakce obsahující protein se spojí, stanoví se koncentrace proteinu a měří se aktivita alikvotu. Inkorporace chelátu se zjišťuje s použitím specifické aktivity ^{90}Y ve formě chloridu a koncentrace proteinu.

f. Immunoreaktivita 2B8-MX-DTPA

Imunoreaktivita konjugované 2B8 se vyhodnotí na základě ELISA pro celkové buňky. SB buňky fáze Mid-log se odebírají z kultury centrifugací a promyjí dvakrát 1X HBSS. Buňky se zředí na 1 až 2 $\times 10^6$ buněk/ml v HBSS a alikvoty se nanesou do 96-jamkových polystyrenových mikrolitrových misek v množství 50 000 až 100 000 buněk/jamka. Miska se suší ve vakuu po dobu 2 h při teplotě 40 až 45 °C pro fixaci buněk k plastu. Misky se ukládají a suší při teplotě -20 °C do doby použití. Pro analýzu se misky ohřejí na teplotu okolí bezprostředně před použitím, poté se blokují 1X PBS, pH 7,2 až 7,4 s obsahem 1 % bovinního serumalbuminu (2 h). Vzorky pro rozbor se zředí v 1X PBS/1 % BSA, nanesou do misek a sériově zředí (1:2) tímžéž pufrem. Po inkubaci misek po dobu 1 h při teplotě okolí se promyjí třikrát 1X PBS. Sekundární protilátka (koží HRP konjugovaná specifická protilátka proti myším IgG1) (50 μ l) se přidá do jamek (zředění 1:1500 v 1X PBS/1 % BSA) a provede se inkubace po dobu 1 h při teplotě okolí. Misky se promyjí 4x 1X PBS s následným přidávkem roztoku substrátu ABTS (50mM citrát sodný, pH 4,5, s obsahem 0,01 % ATBS a 0,001 % peroxidu vodíku). Misky se odečítají při vlnové délce 405 nm po inkubaci po dobu 15 až 30 min. Antigen-negativní HSB buňky se použijí v rozbořech pro monitorování nespecifické vazby. Imunoreaktivita konjugátu se vypočítá vynesením hodnot

absorbance proti příslušnému faktoru zředění a srovnáním těchto dvou hodnot obdržených s použitím nativní protilátky (představující 100% imunoreaktivitu) testované na téže misce. Několik hodnot na lineární části titračního profilu se srovnává a stanoví se střední hodnota.

5 g. Stabilita nativní 2B8 a 2B8–MX–DTPA in vitro

Pro toto 12–týdenní stanovení stability protilátky a konjugátu se formulují protilátka 2B8 a 2B8–MX–DTPA buď v normálním fyziologickém roztoku, nebo ve fyziologickém roztoku obsahujícím glycinhydrochlorid o koncentraci 10 mM, pH 6,8. Duplikátní soubory vzorků se inkubují při 10 4 a 30 °C a vzorky se analyzují týdně s použitím následujících způsobů: SDS–PAGE (redukční i neredukční), imunoreaktivita na základě enzymatické imunoeseje pro celkové buňky s použitím buď SB (antigen–pozitivních), nebo HSB (antigen–negativních) buněk pro zachycení a isoelektrická fokusační gelová elektroforéza (v rozmezí pH 3 až 10). Navíc se hodnotí účinnost značení radionuklidem v týdnech 4, 8 a 12 označením konjugátu radionuklidem ⁹⁰Y a analýzou produktu 15 způsobem SDS–PAGE a autoradiografií. Konečně se v oddělené studii inkubují alikvoty 2B8–MX–DTPA při teplotách 4 a 30 °C po dobu 10 týdnů, označí se radionuklidem ¹¹¹In a vyhodnotí v biodistribuční studii u myši BALB/c, jak se popisuje níže.

h. Imunohistologická studie

20 Imunohistologické studie s nativní i konjugovanou (2B8–MX–DTPA) protilátkou se provádějí v laboratořích IMPATH s použitím řezů lidských tkání fixovaných acetonem. Protilátka se purifikuje ze supernatantů bioreaktoru s dutými vlákny chromatografií na protein A a Q sefaraže. Konjugát kvality pro klinické použití se připraví pomocí MX–DTPA z Coulter Immunology 25 podle výše popsaného způsobu.

i. Imunoreaktivita 2B8–MX–DTPA označené radionuklidem in vitro

Pro některé pokusy se používá způsob ELISA pro celkové buňky pro neznačenou 2B8–MX–DTPA. V dalších experimentech se stanoví imunoreaktivita konjugátů označených radionuklidy 30 ¹¹¹In a ⁹⁰Y (každý se připraví v IDEC Pharmaceuticals nebo alternativně v MPI Pharmacy Services, Inc.) s použitím modifikované verze imunoeseje pro celkové buňky popsané Lindmoem (3). Ve stručnosti se přidávají do duplikátních souborů zkumavek antigen–pozitivní SB buňky nebo antigen–negativní HSB buňky [20 až 30 x 10⁶ buněk/ml ve zředěovacím pufru (fyziologický roztok pufovaný fosfátem, pH 7,4, obsahujícím 1 % BSA, 0,1 % želatiny a 0,02 % azidu sodného)]. 35 Konjugát označený radionuklidem se zředí do konečné koncentrace protilátky 1 až 5 ng/ml zředěovacím pufrům a do každé zkumavky se přidá 0,35 ml. Po 75 až 90 min inkubační doby při teplotě místnosti se buňky peletují centrifugací a sbírají se supernatanty. Radioaktivita zbývající v supernatantové frakci se stanoví čítačem gama nebo scintilačním počítacem. Data se vynesou 40 jako kvocient celkové přidané aktivity dělený aktivitou vázanou na buňky proti převrácené hodnotě počtu buněk na zkumavku. Úsek na ose y tedy představuje imunoreaktivní frakci.

j. Stabilita 2B8–MX–DTPA značené radionuklidem v lidském séru in vitro

45 Stabilita in vitro 2B8–MX–DTPA značené radionuklidy ¹¹¹In a ⁹⁰Y se vyhodnotí inkubací v lidském séru při teplotě 37 °C po dobu 96 h. Konjugované protilátka se připraví a označí radionuklidem ¹¹¹In (způsob „mix–and–shoot“) nebo radionuklidem ⁹⁰Y, jak se popisuje výše. Specifické aktivity označených konjugátů s radionuklidy ¹¹¹In a ⁹⁰Y jsou 92,5 respektive 540 MBq/mg (2,5 respektive 14,6 mCi/mg). Konjugáty označené radionuklidem se suspendují v pufru obsahujícím 50 75 mg/ml lidského serumalbuminu (HSA) a koncentraci 1 mM DTPA (konjugát značený yttriem) nebo v pufru obsahujícím 50 mg/ml HSA (konjugát značený indiem). Konjugáty označené radionuklidy se zředí 1:10 normálním lidským sérem (nikoliv tepelně inaktivovaným) a alikvoty se umístí asepticky do sterilních zkumavek se zátkami. Tyto zkumavky se poté inkubují při teplotě 37 °C po doby až 96 h. Při zvolených časech se vzorky konjugátů odstraní a analyzují za

neredukčních podmínek způsobem SDS-PAGE v gelech s gradientem 4 až 20 % autoradiograficky a chromatografií na předem připravené tenké vrstvě.

5 k. Stabilita klinicky formulované protilátky 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In in vitro

Konjugát 2B8-MX-DTPA se označí radionuklidem ^{111}In a použije se bez purifikace HPLC (způsob „mix-and-shoot“). Protilátka označená radionuklidem se zředí do fyziologického roztoku pufrovaného fosfátem a přidá se lidský serumalbumin (HSA) do konečné koncentrace 50 mg/ml. Specifická aktivita formulovaného konjugátu značeného radionuklidem je 81 MBq/mg (2,2 mCi/mg). Tento formulovaný konjugát se následně inkubuje při teplotě 4 °C po dobu 48 h a alikvoty se analyzují v časech 0, 24 a 48 h s použitím neredukčního způsobu SDS-PAGE ve 4 až 20% gelech s následnou autoradiografií a chromatografií na předem připravené tenké vrstvě. Imunoreaktivita se pro každý čas vyhodnotí s použitím eseje suspenze celkových buněk, která se popisuje v oddílu 1 výše.

1. Stabilita klinicky formulované protilátky 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y in vitro

Konjugát 2B8-MX-DTPA se označí radionuklidem ^{90}Y a purifikuje vysokovýkonnou gelovou permační chromatografií s použitím 1X PBS jako elučního pufru. Označená frakce konjugátu se spojí a přidá se lidský serumalbumin a DTPA do konečné koncentrace 75 mg/ml respektive 1 mM. Specifická aktivita tohoto formulovaného konjugátu označeného radionuklidem je 540 MBq/mg (14,6 mCi/mg). Tento formulovaný konjugát se následně inkubuje při teplotě 4 °C po dobu 48 h a alikvoty se analyzují v časech 0, 24 a 48 h s použitím neredukčního způsobu SDS-PAGE ve 4 až 20% gelech s následnou autoradiografií a chromatografií na předem připravené tenké vrstvě. Imunoreaktivita v každém času se vyhodnotí s použitím eseje suspenze celkových buněk popsané v sekci 1 výše.

2. Studie na zvířatech

30 a. Studie farmakologie/toxikologie vysokých dávek s použitím 2B8 na primátech

Protilátka 2B8 se hodnotí ve studii farmakologie vysokých dávek prováděné za podmínek dobré laboratorní praxe ve White Sands Research Center (číslo studie 920111). Používají se dospělé opice *Macaca fascicularis* (*Cynomolgus*); každá skupina se skládala z jednoho samce a jedné samice. Protilátka se podávala intravenózně každých 48 h, celkem 7 injekcí. Studie zahrnovala pět skupin: skupina I (fyziologický roztok), skupina II (0,6 mg/kg), skupina III (2,5 mg/kg), skupina IV (10 mg/kg) a skupina V (10 mg/kg pouze v den 0).

40 Před zahájením studie se všem 10 zvířatům odebere krev pro určení pozadí látky a počátečních B-buněčných populací. Veškeré následné vzorky krve se odebírají před každou injekcí protilátky. Skupiny III a IV se utratí v den 13 pro provedení úplné pitvy a histopatologie.

45 Zvířatům ve skupinách I, II a V se odebere krev ve dnech 0, 1, 3, 7, 13, 21, 37 a 52, zhruba 5 ml krve do heparinizovaných zkumavek. Celková krev se udržuje při teplotě 42 °C a analyzuje v průběhu 24 h. Krev z každého zvířete se centrifuguje při frekvenci otáčení 2000 min⁻¹ po dobu 5 min a plazma ve formě supernatantu se odebere pro stanovení hladin 2B8 v séru radioimunoesejí (viz provedení radioimunoesejí ohledně specifických způsobů esejí). Peletovaná látka obsahující PBL a RBC se resuspenduje v FCS pro provedení analýzy FACS.

50 b. Farmakokinetické studie s 2B8 a 2B8-MX-DTPA

55 Střední sérový poločas 2B8 u opic *Cynomolgus* se stanoví s použitím zvířat skupiny V (výše). Kozí protimýš IgG1 (Fisher Scientific) se zředí na 2,0 µg na ml v 10mM borátovém pufru, pH 9,6, a ke každé jamce v 96-jamkové misce se přidá 50 µl. Protilátka se ponechá navázat v průběhu

inkubace přes noc při teplotě 4 °C nebo po dobu 2 h při teplotě okolí. Každá miska se blokuje po dobu 30 min při teplotě okolí se 150 μ l na jamku fyziologického roztoku pufrovaného fosfátem obsahujícího 1 % bovinního serumalbuminu. Misky se promyjí destilovanou vodou a vzorky séra či plazmy se nanesou po trojicích do jednotlivých jamek v počátečním zředění 1:100 s následnými sériovými zředěními 1:2. Purifikovaná 2B8 se přidá k předem získaným sérům a zředí pro získání standardní křivky počínaje od 0,5 mg/ml. Vzorky se zředí 1:100 a poté se zředí sériově jako ostatní vzorky. Misky se inkubují po dobu 1 h při teplotě okolí a promyjí 4x destilovanou vodou. Poté se přidá sekundární činidlo (koží protilátka proti myšimu IgG1–HRPO) ve zředění 1:4000 a inkubuje se při teplotě místnosti po další 1 h. Misky se opět promyjí v destilované vodě a přidá se 0,1 ml peroxidázového substrátu obsahujícího peroxid vodíku. Po dobu 20 min se nechá vyvíjet zbarvení. Absorbance se poté stanoví při vlnové délce 405 nm s použitím vyhodnocovacího zařízení ELISA. Výsledky se vynášejí v μ g protilátky na ml séra.

Navíc se stanoví hodnoty β $t_{1/2}$ pro 2B8 a 2B8–MX–DTPA u myši BALB/c. Nekonjugovaná 2B8 uložená při teplotě –70 °C v 1X PBS, pH 7,4/10 % glycerolu se ponechá roztát, zředí na 0,5 mg/ml a sterilně filtruje. Konjugovaná protilátka se připraví podle standardních protokolů avšak s chelátem označeným radionuklidem ^{14} C. Inkorporace chelátu činí 1,5 mol/mol protilátky. Purifikovaný konjugát se zředí na 0,5 mg/ml v normálním fyziologickém roztoku (0,9 %), sterilně se zfiltruje a uloží při teplotě 4 °C s nativní protilátkou do použití.

Myši stáří 6 až 8 týdnů obdrží injekčně 100 μ l purifikované protilátky 2B8 při koncentraci 250 μ g/ml. Poté se odebere krev retroorbitální punkcí v různých časech od 0 do 264 h a jejich séra se analyzují ohledně přítomnosti nativní a konjugované protilátky 2B8 enzymatickou imunoesejí celkových buněk s použitím antigen–pozitivních B–buněk linie SB pro zachycení. Výsledná data se vynášejí jako koncentrace 2B8 nebo 2B8–MX–DTPA proti času. Z těchto výsledků se získá lineární regresní vynesení a směrnice se použije pro stanovení hodnot β $t_{1/2}$.

c. Farmakologická/toxikologická studie 2B8–MX–DTPA značené radionuklidem ^{89} Y u opic *Cynomolgus*

Protilátka 2B8–MX–DTPA značená radionuklidem ^{89} Y se připraví způsobem popsaným pro zavedení ^{90} Y avšak bez použití purifikace vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií. Neradioaktivní konjugát s kovem se připraví v 1X PBS obsahujícím 75 mg/ml lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA a hodnotí se ve studii dobré laboratorní praxe č. 920611 ve White Sands Research Center. Každá ze 4 skupin se skládá z jednoho samce a jedné samice. Zvřatům se podá intravenózně každých 48 h celkem 7 injekcí s celkovými množstvími látky: skupina I (fyziologický roztok), skupina II (0,003 mg/kg), skupina III (0,03 mg/kg a skupina IV (0,3 mg/kg). Zvířata se vyhodnotí v průběhu studie stanovením tělesných hmotností a teplot, spotřeby vody a potravy, eliminace, sérové biochemie, hematologie, analýzy moče a tělesné prohlídky. Zvřatům ve skupinách I až IV se odebere krev před infuzí ve dnech 0, 2, 7, 10 a 14 a analyzuje se ohledně hladin B–buněk v oběhu analýzou FACS.

d. Biologická distribuce 2B8–MX–DTPA značené radionuklidem

V předběžné studii se hodnotí 2B8–MX–DTPA značená radionuklidem ^{111} In ohledně biologické distribuce v tkáních u 6 až 8 týdnů starých myši BALB/c. Konjugát označený radionuklidem se připraví s použitím klinické kvality 2B8–MX–DTPA po provedení způsobu „mix and shoot“ popsaného výše. Specifická aktivita konjugátu je 85 MBq/mg (2,3 mCi/mg) a konjugát se formuluje ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem, pH 7,4, obsahujícím 50 mg/ml HSA. Myším se podává intravenózně 100 μ l 2B8–MX–DTPA značené radionuklidem ^{111} In, zhruba 777 kBq (21 μ Ci) a skupiny tří myši se utrati cervikální dislokací v časech 0, 24, 48 a 72 h. Po utrácení se odebere ocas, srdce, plíce, játra, ledvina, slezina, sval a femur. Rovněž se odebere pro analýzu vzorek krve. Aktivita každého vzorku se stanoví měřením počtu impulzů záření gama a

stanoví se procento injikované dávky na gram tkáně. Nevynakládá se žádná snaha na odečtení příspěvku aktivity krve obsažené v jednotlivých orgánech.

5 Ve zvláštním pokusu se inkubují alikvoty protilátky 2B8–MX–DTPA při teplotě 4 a 30 °C po dobu 10 týdnů, kdy se oba přípravky značí radioaktivním nuklidem ^{111}In do specifické aktivity 78 MBq/mg (2,1 mCi/mg). Konjugáty se potom použijí při studiích biologické distribuce u myší, jak se popisuje výše.

10 Pro dozimetrická stanovení se značí 2B8–MX–DTPA radionuklidem ^{111}In do specifické aktivity 85 MBq/mg (2,3 mCi/mg) a zhruba 41 MBq (1,1 μCi) se podává injekčně každé z 20 myší BALB/c. Následně se skupiny po 5 myších utratí v časech 1, 24, 48 a 72 h a jejich orgány se vyjmou a připraví pro analýzu. Navíc se vyjmou podíly kůže, svalů a kostí a zpracují pro analýzu. Rovněž se sbírá moč a stolice a analyzuje se pro doby 24 až 72 h.

15 S použitím podobného přístupu se též označí 2B8–MX–DTPA radionuklidem ^{90}Y a biologická distribuce se hodnotí u myší BALB/c v průběhu období 72 h. Po purifikaci vysokovýkonnou kapalinovou permeační chromatografií se 4 z 5 myším podává intravenózně po 37 MBq (1 mCi) klinicky formulovaného konjugátu [specifická aktivita 451 MBq/mg (12,2 mCi/mg)]. Skupiny se následně utratí v časech 1, 24, 48 a 72 h a orgány a tkáně se analyzují podle popisu výše. Aktivita každého vzorku tkáně se stanoví měřením energie brzdného záření scintilačním čítačem gama. Hodnoty aktivity se následně vyjádří jako procento podané dávky na gram tkáně nebo procento dávky na orgán. Orgány a další tkáně se opakovaně oplachují pro odstranění nadbytečné krve, avšak nepodrobují se perfuzi. Proto hodnoty aktivity orgánu nejsou opravené na příspěvek aktivity krve přítomné uvnitř orgánu.

25 e. Lokalizace 2B8–MX–DTPA značené ^{111}In v tumoru

Lokalizace 2B8–MX–DTPA značené radionuklidem se stanoví u athymických myší s Ramosovými B–buněčnými tumory. Šestitýdenní až osmitýdenní athymické myši se injikují podkožně 30 (zadní část levého boku) dávkou 0,1 ml RPMI–1640 obsahující $1,2 \times 10^7$ buněk Ramosova tumoru předem adaptovaných na růst v organismu athymických myší. Tumory vznikají v průběhu dvou týdnů a jejich hmotnost je v rozmezí 0,07 až 1,1 g. Myši obdrží intravenózně 100 μl 2B8–MX–DTPA značené radionuklidem ^{111}In , 618 kBq (16,7 μCi), a skupiny po třech myších se utratí cervikální dislokací v časech 0, 24, 48 a 72 h. Po utracení se odebere ocas, srdce, plíce, 35 játra, ledvina, slezina, sval, femur a tumor, promyje, zváží a rovněž se odebere pro analýzu vzorek krve. Aktivita každého vzorku se stanoví měřením četnosti impulzů gama a vyjádří se procento injikované dávky na gram tkáně.

40 3. Dozimetrické výpočty

S použitím údajů o biologické distribuci u myší BALB/c, které dostaly injekčně 2B8–MX–DTPA značenou ^{111}In nebo ^{90}Y (tabulky 1 až 4 a 5 až 8) se vypočítají odhady radiační dávky absorbované na základě aktivity 37 MBq (1,0 mCi) podané pacientovi o hmotnosti 70 kg s použitím způsobu formalizovaného Medical Internal Radiation Dose (MIRD) Committee of the Society of 45 Nuclear Medicine. Biologické poločasy konjugátů značených radionuklidem se stanoví z injikované dávky na orgán stanovené z údajů biologické distribuce pro každý radioimunokonjugát. Pro některé tkáně, například krev, se předpokládá, že biologický úbytek radiokonjugátu sleduje dvoukompartimentový model s exponenciálním úbytkem z těchto kompartmentů. Pro další tkáně, například játra, jejichž hladiny aktivity zůstávaly zhruba konstantní v průběhu biodistribuční studie po dobu 72 h, se předpokládá, že biologický poločas je velmi dlouhý a přisuzuje se mu hodnota 1000 h. 50

Tabulka I

5 Distribuce aktivity 1,0 h po intravenózní injekci ^{111}In -2B8-MX-DTPA u normálních BALB/c myši

Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka

Vzorek	Hmotnost orgánu g	% podané dávky/ g	% podané dávky/ orgán
Krev	1,47 $\pm$ 0,17	40,3 $\pm$ 5,32	58,4 $\pm$ 3,1
Srdce	0,087 $\pm$ 0,01	5,88 $\pm$ 0,76	0,51 $\pm$ 0,05
Plíce (2)	0,149 $\pm$ 0,01	14,2 $\pm$ 1,4	2,10 $\pm$ 0,17
Ledvina (1)	0,127 $\pm$ 0,02	9,82 $\pm$ 0,86	1,22 $\pm$ 0,12
Játra	1,06 $\pm$ 0,20	10,32 $\pm$ 1,58	10,76 $\pm$ 1,93
Slezina	0,090 $\pm$ 0,01	6,94 $\pm$ 1,17	0,61 $\pm$ 0,03
Sval	8,39 $\pm$ 0,98	0,70 $\pm$ 0,25	5,67 $\pm$ 1,35
Kost	3,15 $\pm$ 0,35	2,97 $\pm$ 0,71	9,10 $\pm$ 1,09
Kůže	3,15 $\pm$ 0,35	0,96 $\pm$ 0,29	3,0 $\pm$ 1,12
GI trakt	2,58 $\pm$ 0,31	6,10 $\pm$ 2,00	7,80 $\pm$ 1,80
Moč			-
Stolice			-
		Celkem	99,04 $\pm$ 4,8

Počet myši = 5

Střední hmotnost = 20,97 $\pm$ 2,46 g

10

Tabulka 2

5 Distribuce aktivity 24 h po intravenózní injekci ^{111}In -2B8-MX-DTPA u normálních BALB/c myši

Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka

Vzorek	Hmotnost orgánu g	% podané dávky/ g	% podané dávky/ orgán
Krev	1,47 $\pm$ 0,07	21,97 $\pm$ 1,87	32,22 $\pm$ 1,35
Srdce	0,128 $\pm$ 0,03	4,02 $\pm$ 0,23	0,38 $\pm$ 0,01
Plíce (2)	0,152 $\pm$ 0,02	7,90 $\pm$ 1,61	1,20 $\pm$ 0,18
Ledvina (1)	0,128 $\pm$ 0,01	5,94 $\pm$ 0,40	0,76 $\pm$ 0,04
Játra	1,11 $\pm$ 0,10	10,08 $\pm$ 1,83	11,20 $\pm$ 2,23
Slezina	0,082 $\pm$ 0,01	5,04 $\pm$ 0,75	0,40 $\pm$ 0,02
Sval	8,41 $\pm$ 0,38	1,24 $\pm$ 0,05	10,44 $\pm$ 0,76
Kost	3,15 $\pm$ 0,14	2,02 $\pm$ 0,33	6,31 $\pm$ 0,81
Kůže	3,15 $\pm$ 0,14	3,75 $\pm$ 0,39	11,77 $\pm$ 1,09
GI trakt	2,91 $\pm$ 0,27	4,50 $\pm$ 0,52	6,65 $\pm$ 0,56
Moč			0,98
Stolice			2,54
		Celkem	87,10 $\pm$ 1,68

Počet myši = 5

Střední hmotnost = 21,03 $\pm$ 0,94 g

Tabulka 3

5 Distribuce aktivity 48 h po intravenózní injekci ^{111}In -2B8-MX-DTPA u normálních BALB/c myší

Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka

Vzorek	Hmotnost orgánu g	% podané dávky/ g	% podané dávky/ orgán
Krev	1,45 $\pm$ 0,13	22,41 $\pm$ 3,95	31,90 $\pm$ 2,89
Srdce	0,090 $\pm$ 0,01	4,05 $\pm$ 0,94	0,36 $\pm$ 0,06
Plíce (2)	0,155 $\pm$ 0,02	8,45 $\pm$ 0,53	1,31 $\pm$ 0,19
Ledvina (1)	0,125 $\pm$ 0,01	6,16 $\pm$ 1,15	0,76 $\pm$ 0,07
Játra	1,040 $\pm$ 0,11	9,41 $\pm$ 2,33	9,84 $\pm$ 3,18
Slezina	0,082 $\pm$ 0,01	5,32 $\pm$ 0,71	0,48 $\pm$ 0,11
Sval	8,26 $\pm$ 0,77	1,42 $\pm$ 0,58	11,62 $\pm$ 4,67
Kost	3,10 $\pm$ 0,29	2,08 $\pm$ 0,16	6,41 $\pm$ 0,44
Kůže	3,10 $\pm$ 0,29	3,43 $\pm$ 0,59	10,54 $\pm$ 1,69
GI trakt	2,96 $\pm$ 0,20	5,05 $\pm$ 0,63	7,46 $\pm$ 0,60
Moč			1,46
Stolice			6,41
		Celkem	88,49 $\pm$ 6,87

Počet myší = 5

Střední hmotnost = 20,65 $\pm$ 1,93 g

10

Tabulka 4

5 Distribuce aktivity 72 h po intravenózní injekci ^{111}In -2B8-MX-DTPA u normálních BALB/c myši

Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka

Vzorek	Hmotnost orgánu g	% podané dávky/ g	% podané dávky/ orgán
Krev	1,52 $\pm$ 0,06	18,97 $\pm$ 1,31	28,51 $\pm$ 2,03
Srdce	0,094 $\pm$ 0,01	3,71 $\pm$ 0,31	0,35 $\pm$ 0,04
Plíce (2)	0,161 $\pm$ 0,01	7,60 $\pm$ 0,30	1,18 $\pm$ 0,09
Ledvina (1)	0,135 $\pm$ 0,01	5,55 $\pm$ 0,53	0,76 $\pm$ 0,09
Játra	1,11 $\pm$ 0,11	9,90 $\pm$ 1,77	11,00 $\pm$ 2,03
Slezina	0,095 $\pm$ 0,01	5,12 $\pm$ 0,75	0,48 $\pm$ 0,04
Sval	8,58 $\pm$ 0,34	1,04 $\pm$ 0,09	8,95 $\pm$ 0,68
Kost	3,22 $\pm$ 0,12	1,73 $\pm$ 0,34	6,04 $\pm$ 0,51
Kůže	3,22 $\pm$ 0,12	3,16 $\pm$ 0,60	10,19 $\pm$ 2,03
GI trakt	2,79 $\pm$ 0,19	4,53 $\pm$ 0,83	6,37 $\pm$ 1,38
Moč			2,49
Stolice			11,50
		Celkem	87,80 $\pm$ 4,79

Počet myši = 5

Střední hmotnost = 21,46 $\pm$ 0,84 g

Tabulka 5

Distribuce aktivity 1 h po intravenózní injekci ^{90}Y -2B8-MX-DTPA u normálních BALB/c myši

5

Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka

Vzorek	Hmotnost orgánu g	% podané dávky/ g	% podané dávky/ orgán
Krev	1,27 $\pm$ 0,06	39,23 $\pm$ 2,45	49,77 $\pm$ 1,72
Srdce	0,086 $\pm$ 0,01	5,80 $\pm$ 0,84	0,50 $\pm$ 0,09
Plíce (2)	0,137 $\pm$ 0,01	12,11 $\pm$ 1,08	1,66 $\pm$ 0,17
Ledvina (1)	0,120 $\pm$ 0,01	10,23 $\pm$ 1,30	1,15 $\pm$ 0,12
Játra	0,921 $\pm$ 0,05	12,12 $\pm$ 1,72	11,17 $\pm$ 1,66
Slezina	0,080 $\pm$ 0,01	9,27 $\pm$ 0,46	0,74 $\pm$ 0,07
Sval	7,27 $\pm$ 0,32	0,78 $\pm$ 0,13	5,72 $\pm$ 1,05
Kost	2,73 $\pm$ 0,12	4,35 $\pm$ 0,39	11,89 $\pm$ 1,47
Kůže	2,73 $\pm$ 0,12	2,12 $\pm$ 0,78	5,82 $\pm$ 2,24
GI trakt	2,22 $\pm$ 0,06	3,52 $\pm$ 1,12	4,22 $\pm$ 0,84
Moč			-
Stolice			-
		Celkem	94,85 $\pm$ 3,47

Počet myši = 5

Střední hmotnost = 18,17 $\pm$ 0,81 g

Tabulka 6

5 Distribuce aktivity 24 h po intravenózní injekci ^{90}Y -2B8-MX-DTPA u normálních BALB/c myši

Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka

Vzorek	Hmotnost orgánu g	% podané dávky/ g	% podané dávky/ orgán
Krev	1,517 $\pm$ 0,090	8,35 $\pm$ 2,547	12,83 $\pm$ 4,60
Srdce	0,092 $\pm$ 0,005	2,63 $\pm$ 0,142	0,240 $\pm$ 0,006
Plíce	0,141 $\pm$ 0,005	4,56 $\pm$ 0,393	0,644 $\pm$ 0,047
Ledvina	0,138 $\pm$ 0,007	5,63 $\pm$ 0,222	0,779 $\pm$ 0,040
Játra	0,438 $\pm$ 0,098	5,22 $\pm$ 0,335	2,259 $\pm$ 0,399
Slezina	0,081 $\pm$ 0,003	4,23 $\pm$ 0,180	0,345 $\pm$ 0,011
Sval	8,668 $\pm$ 0,514	0,976 $\pm$ 0,164	8,55 $\pm$ 1,945
Kost	3,246 $\pm$ 0,186	1,326 $\pm$ 0,102	4,289 $\pm$ 0,154

Počet myši = 3

Střední hmotnost = 21,671 $\pm$ 1,11 g

Tabulka 7

5 Distribuce aktivity 48 h po intravenózní injekci ^{90}Y -2B8-MX-DTPA u normálních BALB/c myši

Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka

Vzorek	Hmotnost orgánu g	% podané dávky/ g	% podané dávky/ orgán
Krev	1,33 $\pm$ 0,06	17,34 $\pm$ 2,0	23,03 $\pm$ 1,95
Srdce	0,088 $\pm$ 0,01	3,56 $\pm$ 0,31	0,31 $\pm$ 0,04
Plíce (2)	0,139 $\pm$ 0,01	7,54 $\pm$ 0,88	1,05 $\pm$ 0,15
Ledvina (1)	0,122 $\pm$ 0,01	6,53 $\pm$ 0,42	0,79 $\pm$ 0,01
Játra	0,968 $\pm$ 0,04	9,05 $\pm$ 1,70	8,92 $\pm$ 1,57
Slezina	0,087 $\pm$ 0,01	6,52 $\pm$ 1,13	0,57 $\pm$ 0,07
Sval	7,26 $\pm$ 0,36	1,05 $\pm$ 0,18	8,01 $\pm$ 1,17
Kost	2,86 $\pm$ 0,14	3,34 $\pm$ 0,42	9,53 $\pm$ 1,08
Kůže	2,86 $\pm$ 0,14	4,13 $\pm$ 0,76	11,75 $\pm$ 1,82
GI trakt	2,84 $\pm$ 0,19	2,74 $\pm$ 0,34	3,80 $\pm$ 0,30
Moč			4,29
Stolice			7,67
		Celkem	79,72 $\pm$ 3,23

Počet myši = 5

Střední hmotnost = 19,07 $\pm$ 0,91 g

Tabulka 8

5 Distribuce aktivity 72 h po intravenózní injekci ^{90}Y -2B8-MX-DTPA u normálních BALB/c myši

Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka

Vzorek	Hmotnost orgánu g	% podané dávky/ g	% podané dávky/ orgán
Krev	1,35 $\pm$ 0,02	15,40 $\pm$ 1,63	20,71 $\pm$ 2,13
Srdce	0,088 $\pm$ 0,01	3,12 $\pm$ 0,24	0,28 $\pm$ 0,01
Plíce (2)	0,142 $\pm$ 0,01	8,23 $\pm$ 1,05	1,17 $\pm$ 0,20
Ledvina (1)	0,123 $\pm$ 0,01	6,45 $\pm$ 0,57	0,79 $\pm$ 0,07
Játra	0,02 $\pm$ 0,06	8,39 $\pm$ 1,04	8,58 $\pm$ 1,31
Slezina	0,103 $\pm$ 0,01	5,90 $\pm$ 1,19	0,59 $\pm$ 0,08
Sval	7,68 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 0,15	7,73 $\pm$ 1,05
Kost	2,88 $\pm$ 0,05	3,20 $\pm$ 0,25	9,20 $\pm$ 0,61
Kůže	2,88 $\pm$ 0,05	3,97 $\pm$ 0,49	11,42 $\pm$ 1,36
GI trakt	2,86 $\pm$ 0,18	2,90 $\pm$ 0,65	4,06 $\pm$ 0,93
Moč			3,00
Stolice			11,08
		Celkem	78,62 $\pm$ 2,63

Počet myši = 5

Střední hmotnost = 19,21 $\pm$ 0,27 g

10

Podobným způsobem se přidělí či vypočítají další hodnoty biologického poločasu s použitím standardní rovnice pro výpočet $t_{1/2}$ pro exponenciální úbytek. Po stanovení těchto hodnot se stanoví proměnné T_{ue} , T_{el} , T_{e2} , A_1 , A_2 a A , jejich seznam je v tabulkách 9 a 10, pro každý konjugát označený radionuklidem s použitím rovnic poskytnutých v horní části těchto tabulek (výstupní proměnné). Tyto hodnoty, stejně tak jako hodnoty v následných tabulkách, se vypočítají pomocí programu v Symphony spreadsheet (Lotus Development Corp.) Phillipa Hagana, MS, Nuclear Medicine Service, VA Medical Center, LA Jolla, CA 92161.

15

Tabulka 9

Vstupní proměnné

A0 = podaná dávka, Tue = efektivní poločas vychytávání
 Tp = fyzikální poločas radionuklidu
 Tu = biologický poločas vychytávání
 Tb1 = biologický poločas úniku první složky
 Tb2 = biologický poločas úniku druhé složky
 f1 = frakce A0 s biologickým poločasem Tb1
 f2 = frakce A0 s biologickým poločasem Tb2
 S = střední dávka/jednotková kumulovaná aktivita

Výstupní proměnné

Tel = efektivní poločas úniku první složky
 Te2 = efektivní poločas úniku druhé složky
 A1 = kumulovaná aktivita první složky
 A2 = kumulovaná aktivita druhé složky
 A = celková kumulovaná aktivita
 Tue = $Tu * Tp / (Tu + Tp)$ $A1 - 1,44 * f1 * A0 * Tel * (Tue / Tu)$
 Te1 = $Tb1 * Tp / (Tb1 + Tp)$ $A2 - 1,44 * f2 * A0 * Te2$
 Te2 = $Tb2 * Tp / (Tb2 + Tp)$ $A - A1 + A2$

Příklad: A1 pro játra – $1,44 * 11,000 \% * 1000 * 63,2 * 1,00 = 10007,5 \mu Ci$ kumulované aktivity
 Tabulka vstupních a výstupních hodnot se používá k vyhodnocení kumulované aktivity (A)

	Tu (h)	f1	f2	Tb1 (h)	Tb2 (h)	Tue (h)	Tel1 (h)	Tel2 (h)	A1 ($\mu Ci-h$)	A2 ($\mu Ci-h$)	A ($\mu Ci-h$)
Nadledvinky	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Obsah moč. měchýře	2,78E-04	1,000 %	0,00 %	4	0	2,78E-04	3,8	0,0	54,4	0,0	54
Obsah žaludku	2,78E-04	6,650 %	0,00 %	1,5	0	2,78E-04	1,5	0,0	140,5	0,0	141
Obsah tenkého střeva	2,78E-04	6,650 %	0,00 %	3,5	0	2,78E-04	3,3	0,0	318,6	0,0	319
Obsah hor. tl. střeva	2,78E-04	6,650 %	0,00 %	4,5	0	2,78E-04	4,2	0,0	404,0	0,0	404
Obsah dol. tl. střeva	2,78E-04	6,650 %	0,00 %	4,2	0	2,78E-04	4,0	0,0	378,6	0,0	379
Ledviny	2,78E-04	1,220 %	0,00 %	35	0	2,78E-04	23,0	0,0	404,8	0,0	405
Játra	2,78E-04	11,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	10007,5	0,0	10008
Plice	2,78E-04	2,100 %	1,20 %	30	1000	2,78E-04	20,8	63,2	627,9	1091,7	1720
Ostatní tkáně (celkem)	2,78E-04	0,000 %									

	Tu (h)	f1	f2	Tb1 (h)	Tb2 (h)	Tue (h)	Tel1 (h)	Tel2 (h)	A1 (μ Ci-h)	A2 (μ Ci-h)	A (μ Ci-h)
Sval	2,78E-04	10,400 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	9461,7	0,0	9462
Tuková tkáň	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Krev	2,78E-04	58,400 %	32,22 %	15	1000	2,78E-04	12,3	63,2	10319,2	29313,1	39632
Mozek	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Srdce	2,78E-04	0,510 %	0,38 %	57	1000	2,78E-04	30,9	63,2	226,9	345,7	573
Vaječníky	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Slinivka	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Kostra (celkem)	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Korikální kost	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Trabekulární kost	2,78E-04	9,100 %	6,30 %	45	1000	2,78E-04	27,0	63,2	3536,8	5731,6	9268
Kostní dřev (červ.)	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Kostní dřev (žlutá)	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Chrupavka	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Ostatní složky	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Kůže	2,78E-04	11,770 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Slezina	2,78E-04	0,610 %	0,40 %	39	1000	2,78E-04	63,2	0,0	10708,1	0,0	10708
Varlata	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	24,7	63,2	217,1	363,9	581
Štitná žláza	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
Celé tělo	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0

1 μ Ci = 37 kBq

Tabulka 10

Vstupní proměnné

A0 = podaná dávka, Tue = efektivní poločas vychytávání
 Tp = fyzikální poločas radionuklidu
 Tu = biologický poločas vychytávání
 Tb1 = biologický poločas úniku první složky
 Tb2 = biologický poločas úniku druhé složky
 f1 = frakce A0 s biologickým poločasem Tb1
 f2 = frakce A0 s biologickým poločasem Tb2
 S = střední dávka/jednotková kumulovaná aktivita

Výstupní proměnné

Tel = efektivní poločas úniku první složky
 Te2 = efektivní poločas úniku druhé složky
 A1 = kumulovaná aktivita první složky
 A2 = kumulovaná aktivita druhé složky
 A = celková kumulovaná aktivita
 $Tue = Tu * Tp / (Tu + Tp)$ $A1 - 1,44 * f1 * A0 * Tel * (Tue / Tu)$
 $Te1 = Tb1 * Tp / (Tb1 + Tp)$ $A2 - 1,44 * f2 * A0 * Te2$
 $Te2 = Tb2 * Tp / (Tb2 + Tp)$ $A = A1 + A2$

Příklad: A1 pro játra – $1,44 * 9,000 \% * 1000 * 60,2 * 1,00 = 7795,5 \mu\text{Ci}$ kumulované aktivity
 Tabulka vstupních a výstupních hodnot se používá k vyhodnocení kumulované aktivity (A)

	Tu (h)	f1	f2	Tb1 (h)	Tb2 (h)	Tue (h)	Tel1 (h)	Tel2 (h)	A1 ($\mu\text{Ci-h}$)	A2 ($\mu\text{Ci-h}$)	A ($\mu\text{Ci-h}$)
Nadledvinky	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Obsah moč. měchýře	2,78E-04	1,000 %	0,00 %	4	0	2,78E-04	3,8	0,0	54,4	0,0	54
Obsah žaludku	2,78E-04	4,220 %	0,00 %	1,5	0	2,78E-04	1,5	0,0	89,1	0,0	89
Obsah tenkého střeva	2,78E-04	4,220 %	0,00 %	3,5	0	2,78E-04	3,3	0,0	201,7	0,0	202
Obsah hor. tl. střeva	2,78E-04	4,220 %	0,00 %	4,5	0	2,78E-04	4,2	0,0	255,5	0,0	255
Obsah dol. tl. střeva	2,78E-04	4,220 %	0,00 %	4,2	0	2,78E-04	3,9	0,0	239,5	0,0	240
Ledviny	2,78E-04	1,150 %	0,87 %	70	1000	2,78E-04	33,4	60,2	553,6	753,6	1307
Játra	2,78E-04	9,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	7795,5	0,0	7795
Plice	2,78E-04	1,200 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	1039,4	0,0	1039
Ostatní tkáně (celkem)	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	7552,9	0,0	7553
Sval	2,78E-04	8,720 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Tuková tkáň	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Krev	2,78E-04	49,770 %	25,90 %	13	1000	2,78E-04	10,8	60,2	7743,9	22433,7	30178

	Tu (h)	f1	f2	Tb1 (h)	Tb2 (h)	Tue (h)	Tel1 (h)	Tel2 (h)	A1 (μ Ci-h)	A2 (μ Ci-h)	A (μ Ci-h)
Mozek	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Srdce	2,78E-04	0,500 %	0,36 %	51	1000	2,78E-04	28,4	60,2	204,4	311,8	516
Vaječníky	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Slinivka	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Kostra (celkem)	2,78E-04	0,000 %									
Kortikální kost	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Trabekulární kost	2,78E-04	11,890 %	9,28 %	67	1000	2,78E-04	32,7	60,2	5604,4	8038,0	13642
Kosní dřev (červ.)	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Kosní dřev (žlutá)	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Chrupavka	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Ostatní složky	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Kůže	2,78E-04	15,600 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	13512,1	0,0	13512
Slezina	2,78E-04	0,740 %	0,56 %	60	1000	2,78E-04	31,0	60,2	330,0	485,1	815
Varlata	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Štimá žláza	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
Celé tělo	2,78E-04	0,000 %	0,00 %	1000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0

1 μ Ci = 37 kBq

S použitím celkové kumulované aktivity (A) z tabulek 9 a 10 a hodnot S z MIRD Pamphlet č. 11 (tabulky 11 a 12 a 13 a 14) se stanoví odhady absorbované dávky pro každý z konjugátů značených radionuklidem pro tkáň vyjmenované v seznamu (tabulky 15, 16, 17 a 18). Při stanovení odhadů sumární radiační dávky pro konjugát značený radionuklidem indium v tabulce 19 se dávka samoabsorpce záření v daném orgánu sumuje s absorbovanou dávkou pocházející od aktivity v přilehlých orgánech a tkáních. Avšak při výpočtu hodnot odhadu radiační dávky přisouzené konjugátu značenému yttriem (tabulka 20) určité hodnoty pro vyjmenované tkáně chybí (například nadledvinky). To vyplývá z krátké dráhy vypuštěné částice β vzhledem k délce dráhy emitovaného kvanta gama a tím zanedbatelného příspěvku aktivity z přilehlých tkání a chybících údajů o biologické distribuci pro tyto tkáně.

Tabulka 11

Sumární absorbovaná dávka na jednotku kumulované aktivity, (rad/ μ Ci-h) pro ^{111}In , poločas 67,44 h

Cílové orgány	Orgány jako zdroje záření									
	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt				Ledviny	Játra	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva	Obsah dol. tl. střeva				
Nadledvinky	7,4E-03	5,7E-07	7,3E-06	4,4E-06	2,8E-06	1,3E-06	3,4E-05	1,5E-05	7,6E-06	4,8E-06
Stěna moč. měchýře	3,6E-07	4,5E-04	7,5E-07	8,0E-06	6,4E-06	2,0E-05	9,3E-07	5,2E-07	1,5E-07	5,5E-06
Kost	5,2E-06	2,3E-06	2,3E-06	3,2E-06	2,9E-06	4,2E-06	3,7E-06	2,9E-06	3,8E-06	3,2E-06
GI (stěna žaludku)	8,8E-06	8,5E-07	3,4E-04	1,1E-05	1,2E-05	5,4E-06	1,0E-05	5,8E-06	5,7E-06	4,3E-06
GI (tenké střevo)	2,5E-06	8,6E-06	7,9E-06	2,1E-04	5,4E-05	3,0E-05	8,6E-06	5,0E-06	6,1E-07	4,8E-06
GI (stěna hor. tl. stř.)	2,8E-06	6,9E-06	1,1E-05	8,3E-05	3,3E-04	1,4E-05	8,6E-06	7,5E-05	7,4E-07	5,0E-06
GI (stěna dol. tl. stř.)	7,1E-07	2,2E-05	3,8E-06	2,4E-05	9,5E-06	4,7E-04	2,5E-06	7,3E-07	3,0E-07	5,2E-06

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt			Ledviny	Játra	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva				
Ledviny	3,7E-05	8,5E-07	1,1E-05	9,2E-06	8,3E-06	2,8E-06	1,2E-05	2,7E-06	4,4E-06
Játra	1,5E-05	6,3E-07	5,9E-06	5,6E-06	7,8E-06	8,4E-07	1,3E-04	7,7E-06	3,4E-06
Plíce	7,6E-06	8,2E-08	5,2E-06	7,5E-07	8,3E-07	2,6E-07	7,8E-06	1,4E-04	4,2E-06
Kostní dřev. (červ.)	9,4E-06	5,3E-06	4,0E-06	1,1E-05	9,1E-06	1,3E-05	4,1E-06	4,8E-06	5,3E-06
Ostatní tkáně (sval)	4,8E-06	5,5E-06	4,3E-06	4,8E-06	4,5E-06	5,2E-06	3,4E-06	4,4E-06	7,5E-06
Vaječníky	1,8E-06	2,3E-05	1,3E-06	3,3E-05	3,7E-05	6,4E-05	1,4E-06	3,6E-07	6,3E-06
Slinivka	2,6E-05	8,6E-07	5,7E-05	6,1E-06	7,1E-06	2,1E-06	1,2E-05	7,7E-06	5,7E-06
Kůže	1,8E-06	1,7E-06	1,4E-06	1,4E-06	1,4E-06	1,6E-06	1,6E-06	1,8E-06	2,5E-06
Slezina	2,0E-05	7,6E-07	3,1E-05	4,6E-06	4,2E-06	2,4E-06	2,8E-06	7,1E-06	4,6E-06
Varlata	1,4E-07	1,4E-05	1,8E-07	1,0E-06	9,8E-07	5,9E-06	2,5E-07	3,9E-08	3,6E-06
Štítná žláza	4,7E-07	1,2E-08	3,5E-07	6,9E-08	7,5E-08	2,7E-08	6,2E-07	2,6E-06	4,3E-06

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt				Ledviny	Játra	Plice	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva	Obsah dol. tl. střeva				
Děloha (netěhotná)	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
Celé tělo	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

Odkaz -MIRD Pamphlet č. 11, str. 164

1 μCi = 37 kBq, 1 rad = 10^{-2} Gy

Tabulka 12

Sumární absorbovaná dávka na jednotku kumulované aktivity, (rad/ μ Ci-h) pro ^{111}In , poločas 67,44 h

Orgány jako zdroje záření											
Cílové orgány	Vaječníky	Slinivka	Kůže					Varlata	Štitná žláza	Celé tělo	
			Kostra								
			Červ. dřeh	Kort. kost	Trab. kost						
Nadledvinky	1,1E-06	2,6E-05	7,9E-06	3,9E-06	3,9E-06	2,4E-05	2,0E-05	1,4E-07	4,7E-07	7,0E-06	
Stěna moč. měchýře	2,1E-05	4,7E-07	2,4E-06	1,5E-06	1,5E-06	1,6E-06	4,7E-07	1,5E-05	1,2E-08	6,9E-06	
Kost	3,8E-06	3,6E-06	1,2E-05	3,0E-05	2,6E-05	2,9E-06	2,9E-06	2,4E-06	2,6E-06	6,9E-06	
GI (stěna žaludku)	2,4E-06	5,9E-05	3,2E-06	1,7E-06	1,1E-06	1,7E-06	3,0E-05	1,5E-07	1,5E-07	7,1E-06	
GI (tenké střevo)	3,8E-05	5,5E-06	7,9E-06	2,3E-06	2,3E-06	1,5E-06	4,2E-06	1,2E-06	4,2E-08	7,5E-06	
GI (stěna hor. tl. stř.)	3,7E-05	6,6E-06	6,4E-06	2,2E-06	2,2E-06	1,4E-06	3,8E-06	1,1E-06	3,3E-08	7,0E-06	
GI (stěna dol. tl. stř.)	4,8E-05	1,7E-06	9,0E-06	3,2E-06	3,2E-06	1,5E-06	1,9E-06	8,3E-06	2,2E-08	6,7E-06	
Ledviny	2,9E-06	1,9E-05	6,8E-06	2,7E-06	2,7E-06	2,0E-06	2,8E-05	1,7E-07	1,2E-07	6,6E-06	
Játra	1,7E-06	1,3E-05	2,9E-06	2,0E-06	2,0E-06	1,7E-06	3,0E-06	1,2E-07	3,5E-07	6,5E-06	
Plice	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	
Kostní dřeh (červ.)	1,3E-05	6,8E-06	7,5E-05	1,3E-05	2,6E-05	2,7E-06	4,4E-06	1,9E-06	2,9E-06	7,7E-06	
Ostatní tkáně (sval)	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	

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Vaječníky	Slinivka	Kostra			Kůže	Slezina	Varlata	Štítná žláza	Celé tělo
			Červ. dřev.	Kort. kost	Trab. kost					
Vaječníky	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
Slinivka	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
Kůže	1,4E-06	1,3E-06	2,0E-06	2,3E-06	2,3E-06	3,7E-05	1,5E-06	4,9E-05	2,5E-06	3,7E-06
Slezina	1,6E-06	6,2E-05	2,7E-06	2,0E-06	2,0E-06	1,7E-06	9,1E-04	8,9E-03	3,5E-07	6,8E-06
Varlata	0,0E+00	2,1E-07	1,0E-06	1,9E-06	1,9E-06	3,4E-06	2,0E-07	3,6E-03	3,3E-09	4,9E-06
Štítná žláza	2,5E-08	4,5E-07	2,2E-06	2,8E-06	2,8E-06	2,4E-06	3,4E-07	3,3E-09	5,8E-03	5,2E-06
Děloha (netěhotná)	6,5E-05	1,9E-06	6,7E-06	1,8E-06	1,8E-06	1,2E-06	1,2E-06	0,0E+00	2,4E-08	7,8E-06
Celé tělo	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

Odkaz -MIRD Pamphlet č. 11, str. 165

1 μCi = 37 kBq, 1 rad = 10^{-2} Gy

Tabulka 13

Sumární absorbovaná dávka na jednotku kumulované aktivity, (rad/ μ Ci-h) pro ^{90}Y , poločas 64 h

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt				Ledviny	Játra	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva	Obsah dol. tl. střeva				
Nadledvinky	1,4E-01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Stěna moč. měchýře	0,0	5,0E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Kost	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (stěna žaludku)	0,0	0,0	4,0E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (tenké střevo)	0,0	0,0	2,5E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (stěna hor. tl. stř.)	0,0	0,0	0,0	4,5E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (stěna dol. tl. stř.)	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ledviny	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,4E-03	0,0	0,0	0,0	0,0
Játra	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1E-03	0,0	0,0	0,0
Plíce	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0E-03	0,0	0,0
Kostní dřev. (červ.)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Orgány jako zdroje záření

Cilové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt				Ledviny	Játra	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva	Obsah dol. tl. střeva				
Ostatní tkáně (sval)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1E-05
Vaječníky	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Slinivka	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Kůže	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Slezina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Varlata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Štitná žláza	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Děloha (netěhotná)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Celé tělo	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

Odkaz -MIRD Pamphlet č. 11, str. 144

1 μCi = 37 kBq, 1 rad = 10^{-2} Gy

Tabulka 14

Sumární absorbovaná dávka na jednotku kumulované aktivity, (rad/ μ Ci-h) pro ^{90}Y , poločas 64 h

Cílové orgány	Orgány jako zdroje záření							Štítná žláza	Celé tělo
	Vaječníky	Slinivka	Kostra				Kůže	Slezina	Varlata
			Červ. dřev.	Kort. kost	Trab. kost				
Nadledvinky	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
Stěna moč. měchýře	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
Kost	0,0	0,0	1,1E-04	4,0E-04	2,3E-04		0,0	0,0	0,0
GI (stěna žaludku)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
GI (tenké střevo)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
GI (stěna hor. tl. stř.)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
GI (stěna dol. tl. stř.)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
Ledviny	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
Játra	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
Plíce	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
Kostní dřev. (červ.)	0,0	0,0	8,6E-04	3,3E-05	5,7E-04		0,0	0,0	0,0
Ostatní tkáně (sval)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Vaječníky	Slinivka	Kostra			Kůže	Slezina	Varlata	Štítná žláza	Celé tělo
			Červ. dřev.	Kort. kost	Trab. kost					
Vaječníky	1,8E-01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Slinivka	0,0	2,0E-02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Kůže	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6E-04	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Slezina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1E-02	0,0	0,0	2,8E-05
Varlata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,7E-02	0,0	2,8E-05
Štítná žláza	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,9E-02	2,8E-05
Děloha (netěhotná)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8E-05
Celé tělo	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

Odkaz -MIRD Pamphlet č. 11, str. 145

1 μCi = 37 kBq, 1 rad = 10^{-2} Gy

Tabulka 15

Absorbovaná dávka záření ($\text{rad} = A \cdot S$) pro ^{111}In , poločas 67,44 h

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt			Ledviny	Játra	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva				
Nadledvinky	0,0E+00	3,1E-05	1,0E-03	1,4E-03	1,1E-03	1,4E-02	1,5E-01	1,3E-02	2,4E-01
Stěna moč. měchýře	0,0E+00	2,4E-02	1,1E-04	2,5E-03	2,6E-03	3,8E-04	5,2E-03	2,6E-04	2,7E-01
GI (stěna žaludku)	0,0E+00	4,6E-05	4,8E-02	3,5E-03	2,2E-02	4,0E-03	5,8E-02	9,8E-03	2,1E-01
GI (tenké střevo)	0,0E+00	4,7E-04	1,1E-03	6,7E-03	2,2E-02	3,5E-03	5,0E-02	1,0E-03	2,4E-01
GI (stěna hor. tl. stř.)	0,0E+00	3,8E-04	1,5E-03	2,6E-02	1,3E-01	3,5E-03	7,5E-02	1,3E-03	2,5E-01
GI (stěna dol. tl. stř.)	0,0E+00	1,2E-03	5,3E-04	7,6E-03	3,8E-03	1,0E-03	7,3E-03	5,2E-04	2,6E-01
Ledviny	0,0E+00	4,6E-05	1,5E-03	2,9E-03	3,4E-03	2,1E-01	1,2E-01	4,6E-03	2,2E-01
Játra	0,0E+00	3,4E-05	8,3E-04	1,8E-03	3,2E-03	4,9E-03	1,3E+00	1,3E-02	1,7E-01
Plíce	0,0E+00	4,5E-06	7,3E-04	2,4E-04	3,4E-04	1,0E-03	7,8E-02	2,4E-01	2,1E-01
Ostatní tkáně									
Sval	0,0E+00	3,0E-04	6,0E-04	1,5E-03	1,8E-03	1,8E-03	3,4E-02	7,6E-03	3,7E-01

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt				Ledviny	Jatrá	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva	Obsah dol. tl. střeva				
Tuková tkáň	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
Krev	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
Mozek	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
Srdce	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
Vaječníky	0,0E+00	1,3E-03	1,8E-04	1,1E-02	1,5E-02	2,4E-02	2,4E-02	1,4E-02	6,2E-04	2,8E-04
Slinivka	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
Kostra										
Kortikální kost	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
Trabekulární kost	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
Kostní dřev (červ.)	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
Kostní dřev (žlutá)	0,0E+00	2,9E-04	5,6E-04	3,5E-03	3,7E-03	4,9E-03	3,9E-03	4,1E-02	8,3E-03	2,6E-01
Chrupavka	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
Ostatní	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
Kůže	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

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt			Ledviny	Játra	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva				
Slezina	0,0E+00	4,1E-05	4,4E-03	1,5E-03	1,7E-03	1,1E-02	2,8E-02	1,2E-02	2,3E-01
Varlata	0,0E+00	7,6E-04	2,5E-05	3,2E-04	4,0E-04	1,4E-03	2,5E-03	6,7E-05	1,8E-01
Štitná žláza	0,0E+00	6,5E-07	4,9E-05	2,2E-05	3,0E-05	8,1E-05	6,2E-03	4,5E-03	2,1E-01
Děloha (netěhotná)	0,0E+00	3,4E-04	8,6E-04	2,3E-03	2,7E-03	2,7E-03	6,6E-02	1,0E-02	3,7E-01
Celé tělo	0,0E+00	2,7E-03	3,4E-04	9,2E-03	6,1E-03	1,3E-03	1,2E-02	4,8E-04	2,8E-01

1 μCi = 37 kBq, 1 rad = 10^{-2} Gy

Tabulka 16

Absorbovaná dávka záření (rad = A * S) pro ^{111}In , poločas 67,44 h

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Vaječníky	Slivivka	Kostra				Kuže	Slezina	Varlata	Šitná žláza	Celé tělo
			Červ. dřev		Trab. kost						
			Červ. dřev	Kort. kost	Trab. kost						
Nadledvinky	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,6E-02	2,6E-02	1,2E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Stěna moč. měchýře	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,4E-02	1,7E-02	2,7E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (stěna žaludku)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,6E-02	1,8E-02	1,7E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (tenké střevo)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,1E-02	1,6E-02	2,4E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (stěna hor. tl. stř.)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,0E-02	1,5E-02	2,2E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Vaječníky	Slinivka	Kostra				Kůže	Slezina	Varlata	Štítná žláza	Celé tělo
			Červ. dřev.	Kort. kost	Trab. kost						
GI (stěna dol. tl. stř.)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	1,6E-02	1,1E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Ledviny	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,5E-02	2,1E-02	1,6E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Játra	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,9E-02	1,8E-02	1,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Plíce	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,8E-02	2,0E-02	4,0E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Ostatní tkáně											
Sval	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-02	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Tuková tkáň	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-02	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Krev	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-02	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Mozek	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,0E-02	2,7E-02	2,7E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Vaječníky	Slinivka	Kostra			Kůže	Slezina	Varlata	Štitná žláza	Celé tělo
			Červ. dřev.	Kort. kost	Trab. kost					
Srdce	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
Vaječníky	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
Slinivka	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,9E-02	1,8E-02	3,5E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Kostra										
Kortikální kost	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
Trabekulární kost	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
Kostní dřev. (červ.)	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
Kostní dřev. (žlutá)	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
Chrupavka	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

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány

Vaječníky Slinivka Kůže Slezina Varlata Štítná žláza Celé tělo

Kostra

Červ. dřev. Kort. kost Trab. kost

Ostatní	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,4E-01	3,1E-02	1,7E-03	0,0E+00	0,0E+00
Kůže	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,1E-02	4,0E-01	8,7E-04	0,0E+00	0,0E+00
Slezina	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,9E-02	1,8E-02	5,3E-01	0,0E+00	0,0E+00
Varlata	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,8E-02	3,6E-02	1,2E-04	0,0E+00	0,0E+00
Štítná žláza	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,6E-02	2,6E-02	2,0E-04	0,0E+00	0,0E+00
Děloha (netěhotná)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,7E-02	0,0E+00	7,0E-04	0,0E+00	0,0E+00
Celé tělo	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	5,5E-02	4,1E-02	3,8E-03	0,0E+00	0,0E+00

1 rad = 10⁻² Gy

Tabulka 17

Absorbovaná dávka záření ($\text{rad} = A \cdot S$) pro ^{90}Y , poločas 64 h

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt			Ledviny	Játra	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva	Obsah dol. tl. střeva			
Nadledvinky	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
Stěna moč. měchýře	0,0E+00	2,70E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (stěna žaludku)	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
GI (tenké střevo)	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
GI (stěna hor. tl. stř.)	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
GI (stěna dol. tl. stř.)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,8E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Orgány jako zdroje záření

Cilové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt				Ledviny	Játra	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah tl. střeva	Obsah dol. tl. střeva				
Ledviny	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
Játra	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
Plíce	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
Ostatní tkáně										
Sval	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
Tuková tkáň	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
Krev	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
Mozek	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
Srdce	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

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchyře	Střevní trakt			Ledviny	Játra	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva		Obsah dol. tl. střeva		
Vaječníky	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
Slinivka	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
Kostra									
Kortikální kost	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
Trabekulární kost	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
Kostní dřev (červ.)	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
Kostní dřev (žlutá)	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
Chrupavka	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
Ostatní	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

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Nadledvinky	Obsah moč. měchýře	Střevní trakt				Ledviny	Játra	Plíce	Ostatní tkáně (sval)
			Obsah žaludku	Obsah tenkého stř.	Obsah hor. tl. střeva	Obsah dol. tl. střeva				
Kůže	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
Slezina	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
Varlata	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
Štítná žláza	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
Děloha (netěhotná)	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
Celé tělo	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

1 rad = 10⁻² Gy

Tabulka 18

Absorbovaná dávka záření ($\text{rad} = A \cdot S$) pro ^{90}Y , poločas 64h

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Vaječníky	Slinivka	Kostra			Kůže	Slezina	Varlata	Štítná žláza	Celé tělo
			Červ. dřevň	Kort. kost	Trab. kost					
Nadledvinky	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
Stěna moč. měchýře	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
GI (stěna žaludku)	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
GI (tenké střevo)	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
GI (stěna hor. tl. stř.)	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
GI (stěna dol. tl. stř.)	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
Ledviny	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
Játra	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
Plíce	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
Ostatní tkáně			0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány

Kostra

	Vaječníky	Slinivka	Kostra				Kůže	Slezina	Varlata	Štítná žláza	Celé tělo
			Červ. dřev.	Kort. kost	Trab. kost						
Sval	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Tuková tkáň	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Krev	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Mozek	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Srdce	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Vaječníky	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Slinivka	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Kostra											
Kortikální kost	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	0,0E+00
Trabekulární kost	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	0,0E+00
Kostní dřev. (červ.)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	7,8+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Kostní dřev. (žlutá)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	7,8+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
Chrupavka	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	0,0E+00
Ostatní	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	0,0E+00

Orgány jako zdroje záření

Cílové orgány	Vaječníky	Slinivka	Kostra				Kůže	Slezina	Varlata	Štítná žláza	Celé tělo	
			Červ. dřevě		Kort. kost							Trab. kost
Kůže	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,0E+01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	
Slezina	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	9,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	
Varlata	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	
Štítná žláza	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	
Děloha (netěhotná)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	
Celé tělo	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,8E-01	3,8E+01	2,3E-02	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	

1 rad = 10⁻² Gy

Tabulka 19

- 5 Radiačně dozimetrické odhady vyplývající z podání protilátky 2B8-MX značené radionuklidem ^{111}In jednotně rozložené v těle „standardního člověka“ (70 kg) s použitím distribučních údajů pro zvířata v průběhu 72 h po injekci

Aktivita =		1000 μCi /dávka pro pacienta	
	rad		rad
Nadledvinky	0,493	Vaječníky	0,387
Stěna močového měchýře	0,348	Pankreas	0,362
Žaludeční stěna	0,412	Kostra	
Tenké střevo	0,434	Kortikální kost	0,474
Stěna hor. tl. střeva	0,533	Trabekulární kost	0,474
Stěna dol. tl. střeva	0,505	Dřeň (červená)	0,602
Ledviny	0,625	Dřeň (žlutá)	0,602
Játra	1,533	Chrupavka	0,474
Plíce	0,582	Ostatní složky	0,474
Ostatní tkáň		Kůže	0,564
Sval		Slezina	0,854
Tuková tkáň		Varlata	0,239
Krev		Štítná žláza	0,276
Mozek		Děloha (negavidní)	0,473
Srdce		Celé tělo	0,417

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

Výpočty provedl s použitím Spreadsheet Template v Symphony (Lotus Development Corporation) a sestavil

- 15 Phillip L. Hagan, MS
Nuclear Medicine Service
VA Hospital
San Diego, CA 92161

- 20 $1 \mu\text{Ci} = 37 \text{ kBq}$, $1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ Gy}$

Tabulka 20

5 Radiačně dozimetrické odhady vyplývající z podání protilátky 2B8–MX značené radionuklidem ^{90}Y jednotně rozložené v těle „standardního člověka“ (70 kg) s použitím distribučních údajů pro zvířata v průběhu 72 h po injekci

Aktivita =		1000 μCi /dávka pro pacienta	
	rad		rad
Nadledvinky	0,000	Vaječníky	0,000
Stěna močového měchýře	0,271	Pankreas	0,000
Žaludeční stěna	0,356	Kostra	
Tenké střevo	0,504	Kortikální kost	3,138
Stěna hor. tl. střeva	1,150	Trabekulární kost	3,138
Stěna dol. tl. střeva	1,772	Dřeň (červená)	7,776
Ledviny	8,366	Dřeň (žlutá)	7,776
Játra	8,575	Chrupavka	3,138
Plíce	2,079	Ostatní složky	3,138
Ostatní tkáň		Kůže	10,269
Sval	2,716	Slezina	8,965
Tuková tkáň	2,716	Varlata	0,000
Krev	2,716	Štítná žláza	0,000
Mozek	2,716	Děloha (negavidní)	0,304
Srdce	2,176	Celé tělo	1,854

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

Výpočty provedl s použitím Spreadsheet Template v Symphony (Lotus Development Corporation) a sestavil

15 Phillip L. Hagan, MS
Nuclear Medicine Service
VA Hospital
San Diego, CA 92161

20 $1 \mu\text{Ci} = 37 \text{ kBq}$, $1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ Gy}$

1. II. Výsledky

25 A. Studie s protilátkami 2B8 a 2B8–MX–DTPA in vitro

1. Příprava a charakterizace protilátky 2B8 proti CD20

30 Celkem 9 fúzí vedlo ke třem hybridomům tvořícím protilátku, které účinně konkurovaly s protilátkou B1 Coulter značenou radionuklidem. V každém případě se hybridom přenesl na 24-jamkovou misku. První dvě protilátky izolované z fúzí 3 a 4 byly isotypizovány a obě byly identifikovány jako IgM. Třetí protilátka obdržená fúzí 5 a označená 2B8 byla stanovena jako IgG1 kappa isotyp a použila se pro pokračující studie. Klon 2B8.H11 se expandoval a umístil pro dlouhodobé ukládání do kapalného dusíku. Klon 2B8.H11 se subklonuje pro poskytnutí klonu 2B8.H11.G3 a dále pro poskytnutí klonu 2B8–H11.G3.G9. Tento klon se expanduje pro další
35 studii a protilátka se purifikuje protein A afinitní chromatografií.

5 Kompetitivní esej s použitím neznačené 2B8, B1 a Leu 16 a radionuklidem označené Coulter B1 ukazuje, že 2B8 je schopna inhibovat vazbu B1 na C20 účinněji než stejné koncentrace buď B1, nebo Leu 16 (obrázek 1). Podobné výsledky se obdrží (údaje se zde neznázorňují) v kompetitivní studii s použitím FITC-konjugované 2B8, nativní B1 a irelevantních protilátek UPC-10 a S-003 (isotypy IgG 2a respektive 1).

10 Přímá vazba buněčného antigenu CD20 s protilátkami 2B8 a B1 se srovnává analýzou FACS s použitím CD20-pozitivních SB buněk a CD20-negativních HSB buněk. Výsledky na obrázku 2 ukazují, že pro srovnatelná množství protilátky se s SB buňkami váže více 2B8 než B1. S irelevantními protilátkami se nepozoruje žádná vazba na SB buňky. Při použití HSB buněk se pozoruje pouze fluorescence pozadí. Tyto výsledky potvrzují specifickou interakci 2B8 s antigenem CD20 a ukazují, že 2B8 může mít vyšší afinitu k antigenu buněčného povrchu než B1.

15 Pro stanovení zdánlivé afinity 2B8 se purifikovaná protilátka označí radionuklidem ^{125}I a vzrůstající koncentrace označené protilátky se inkubují s antigen-pozitivními SB buňkami. Aktivita připojená na buňky se stanoví po 1 h inkubace (obrázek 3). Výsledky ukazují, že se protilátka 2B8 váže na antigen CD20 se zdánlivou konstantou afinity $4,3 \times 10^{-9} \text{ M}$.

20 Průtoková cytometrie s lidskými normálními periferními krevními lymfocyty ukazuje, že 2B8 je specifická pro B-buňky a nereaguje s jinými typy lymfocytů (například T-buňkami, monocyty, makrofágy). 2B8 označená FITC se srovnává s B1-FITC a Leu 16-FITC s použitím téže populace lidských lymfocytů. Výsledky v tabulce 21 ukazují, že 2B8 reaguje zhruba se 14 % periferních krevních lymfocytů ve srovnání se zhruba 12 % v případě Leu 16 a 11 % v případě B1. Populace lymfocytů založená na dalším lymfocytovém markeru (CD-19) byla mezi 11 a 14 %. Konečně, 25 pokud se inkubují lidské periferní krevní lymfocyty s 2B8 a buď B1, nebo Leu 16 a poté označí zpětně markerem CD19 (Becton/Dickinson), činí populace dvojího značení B lymfocytů 9 % s 2B8 a 10 % s uď B1, nebo Leu 16. Tyto výsledky potvrzují podobnost těchto látek.

Tabulka 21

5 Srovnání vazby 2B8 na lidské periferní krevní lymfocyty s jinými prostředky specifickými pro B- a T-lymfocyty

Marker protilátky

A. Jednoduché fluorescenční značení: % vymezených lymfocytů CD45

Žádné (autofluorescence)	0
B1-FITC (Coulter Immunology, (IgG2a, k)	11
Leu 16-FITC (Becton Dickinson, IgG1, k)	12
2B8-FITC (EDEC, IgG1, k)	14
B72.3-FITC (IgG1, k irelevantní kontrola)	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. Dvojité fluorescenční značení:

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
B72.3-FITC/anti Hu Ig RPE	2
Leucogate Simultest	99

10

Imunoprecipitace buněčného antigenu CD20 označeného radionuklidem buď protilátkou 2B8, nebo protilátkou B1 vede k precipitaci nerozlišitelného dubletu proteinů s molekulovými hmotnostmi zhruba 33 a 35 kD (údaje se neuvádějí).

15

2. Tvorba a charakterizace 2B8-MX-DTPA

Konjugát 2B8-MX-DTPA se získává reakcí protilátky s molárním přebytkem 4:1 kyseliny iso-thiokyanátobenzyl-3-methyldiethylentriaminpentaoctové (4). Obvykle se použijí 1 až 2 mol chelátu MX-DTPA na mol protilátky 2B8. Jak ukazují výsledky na obrázku 4, nevykazuje kon-

- jugát 2B8–MX–DTPA žádnou zdánlivou ztrátu imunoreaktivity, oproti tomu nativní 2B8 ve formě nativních i konjugovaných protilátek 2B8 vykazuje virtuálně identické B1 inhibiční profily. Hodnoty IC₅₀ pro 2B8 a 2B8–MX–DTPA jsou zhruba 3 respektive 4 µg/ml. Tyto výsledky lze obdržet s použitím protilátky B1 značené radionuklidem ¹²⁵I v celobuněčné radioimunoeseji provedené s SB buňkami. Podobné výsledky se obdrží s použitím 2B8 nebo 2B8–MX–DTPA jako inhibitorů vazby 2B8 značené radionuklidem ¹²⁵I s SB buňkami. 2B8 i konjugát s MX–DTPA inhibují vazbu ¹²⁵I–2B8 s SB buňkami při koncentracích zhruba 3 až 4 µg/ml (údaje se neuvádějí).
- 10 Pro vyhodnocení stability in vitro nativní protilátky 2B8 a konjugátu 2B8–MX–DTPA se vzorky v normálním fyziologickém roztoku nebo ve fyziologickém roztoku obsahujícím 10 mM roztok glycinhydrochloridu, pH 6,8, inkubují při teplotě 4 a 30 °C po dobu 12 týdnů a alikvoty se týdně analyzují s použitím následujících esejí: imunoreaktivita celobuněčnou enzymovou imunoesejí, SDS–PAGE za redukčních a neredukčních podmínek a isoelektrická fokusační gelová elektroforéza. Zatímco imunoeseje nedetekují žádnou ztrátu antigenu pro vzorky protilátky inkubované při jakékoliv teplotě (obrázek 5), isoelektrické fokusační rozmezí pro protilátku (pH 7,30 až 8,40 v týdnu nula), které je stabilní při teplotě 4 °C, vykazuje pokles 0,2 pH při 30 °C po týdnu 6 (tabulka 22). Tento výsledek však nemusí být jednoznačný, neboť je na mezi experimentální chyby eseye.

Tabulka 22

Souhrn údajů pl pro 2B8/2B8-MX-DTPA

Týden	2B8 4 Sal	2B8 30 Sal	2B8 4 Gly	2B8 30 Glyl	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					
1	7,39-8,24	7,42-8,27	7,46-8,31	7,46-8,24	6,30-8,21	6,30-8,21	6,30-8,21	6,25-8,24
2	7,38-8,27	7,45-8,34	7,45-8,40	7,45-8,34	6,39-8,26	6,39-8,26	6,32-8,24	5,95-8,27
3	7,47-8,35	7,33-8,35	7,40-8,29	7,33-8,29	6,02-8,40	6,02-8,34	6,02-8,40	6,0-8,15
4	7,38-8,24	7,38-8,24	7,38-8,35	7,38-8,28	6,0-8,29	6,0-8,29	6,0-8,22	5,99-8,35
5	7,29-8,25	7,29-8,25	7,37-8,32	7,32-8,32	5,99-8,28	5,99-8,35	5,99-8,35	5,90-8,27
6	7,24-8,12	7,20-8,27	7,27-8,27	7,20-8,12	5,60-8,32	5,90-8,27	5,90-8,32	5,85-7,95
7	7,39-8,32	7,17-8,32	7,35-8,25	7,17-8,47	5,85-8,27	5,85-8,27	5,85-8,27	5,95-8,32
8	7,33-8,29	7,26-8,36	7,40-8,36		6,02-8,25		5,95-8,32	5,86-8,21
9	7,49-8,53	7,26-8,45	7,41-8,45	7,34-8,30	5,86-8,36	5,86-8,36	5,86-8,36	5,93-8,23
10	7,26-8,27	7,19-8,27	7,26-8,27	7,19-8,27	5,93-8,45	5,93-8,45	5,93-8,45	5,95-8,13
11	7,40-8,27	7,18-8,27	7,40-8,35	7,18-8,13	5,95-8,35	5,95-8,35	5,88-8,35	5,93-8,13
12	7,26-8,18	7,04-8,18	7,26-8,18	7,19-8,11	5,93-8,35	5,93-8,27	5,93-8,27	5,90-8,18

Vzorky nativní 2B8 a 2B8-MX-DTPA se formulují v různých pufrech a inkubují při teplotě 4 nebo 30 °C po dobu 12 týdnů. V průběhu této doby se provádějí různé rozborů včetně stanovení isoelektrického bodu. Hodnoty ukázané výše udávají rozmezí isoelektrického bodu pro nativní a konjugovanou protilátku inkubovanou při každé teplotě, pro každou formuli a pro každý z těchto 12 týdnů během této studie stability. Záhlaví značí: 2B8 4 Sal – 2B8 inkubovaná při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku, 2B8 30 SAL – 2B8 inkubovaná při teplotě 30 °C ve fyziologickém roztoku, 2B8 4 Gly – 2B8 inkubovaná při teplotě 4 °C v normálním fyziologickém roztoku obsahujícím 10 mM glycinu, 2B8-MX 30 Gly – 2B8 inkubovaná oř teplotě 30 °C v normálním fyziologickém roztoku obsahujícím 10 mM glycinu, 2B8-MX 4 Sal – 2B8-MX-DTPA (konjugát) inkubovaný při teplotě 4 °C ve fyziologickém roztoku, 2B8-MX 30 Sal – konjugát inkubovaný při teplotě 30 °C ve fyziologickém roztoku, 2B8-MX 4 Gly – konjugát inkubovaný při teplotě 4 °C v normálním fyziologickém roztoku s obsahem 10 mM glycinu a 2B8-MX 30 Gly – konjugát inkubovaný při teplotě 30 °C v normálním fyziologickém roztoku s obsahem 10 mM glycinu.

Konečně při použití neredukční SDS-PAGE vykazují vzorky protilátky při 30 °C vysokomolekulární agregáty po týdnu 1 (tabulka 23). Denzitometrické analýzy gelů ukazují, že agregáty představují 8 až 17 % vzorků (tabulka 23). Avšak pokud se tyto vzorky analyzují redukční SDS-PAGE, nenachází se žádný průkaz vysokomolekulárních látek, což ukazuje na tvorbu kovalentních protilátkových agregátů při teplotě 30 °C. Opět se nepozoruje žádná ztráta imunoreaktivity.

Tabulka 23

10 Stabilita 2B8 in vitro

A. Denzitometrické záznamy neredukčních SDS gelů

Vzorek	Procento		
	Vysokomo- lekulární	Monomer	Nízkomo- lekulární
Referenční údaj	0	100,00	0
12 týdnů/4 °C/fyz. rozt.	0	95,42	4,58
12 týdnů/4 °C/glycin	0	100,00	0
12 týdnů/30 °C/fyz. rozt.	7,63	83,34	9,03
12 týdnů/30 °C/glycin	16,70	72,11	11,18

B. Denzitometrické záznamy redukčních SDS gelů

Vzorek	Procento		
	Vysokomo- lekulární	Monomer	Nízkomo- lekulární
Referenční údaj	0	100,00	0
12 týdnů/30 °C/fyz. rozt.	0	100,00	0
12 týdnů/30 °C/glycin	0	10,00	0

15

V průběhu této stabilitní studie se též testují vzorky 2B8-MX-DTPA inkubované při teplotách 4 a 30 °C ohledně inkorporace radioaktivního kovu s použitím radionuklidu ^{90}Y . Vzorky se analyzují v týdnech 4, 8 a 12, inkorporuje se >90 % ^{90}Y bez ohledu na teplotu inkubace.

20

Konečně se v samostatné studii alikvoty 2B8-MX-DTPA inkubované při teplotách 4 a 30 °C po dobu 10 týdnů označí radionuklidem ^{111}In a určuje se jejich biologická distribuce ve tkáních u myši BALB/c. Konjugát při obou inkubačních teplotách poskytuje podobné biologické distribuce (hodnoty se neuvádějí). Navíc jsou obdrženy výsledky podobné výsledkům biologické distribuce obdrženým u myši BALB/c s konjugátem označeným radionuklidem ^{111}In při teplotě 4 °C (viz

25

niže).

Způsoby značení radionuklidem jsou reprodukovatelné jak pro ^{111}In , tak pro ^{90}Y . Obvykl se obdrží inkorporace radionuklidu $>95\%$ pro ^{111}In a $>90\%$ pro ^{90}Y . Specifické aktivity konjugátů značených radionuklidů ^{111}In a ^{90}Y jsou obvykle v rozmezí 74 a 111 respektive 370 až 555 MBq/mg protilátky. Při počátečním vývoji způsobů značení radionuklidů ^{111}In a ^{90}Y se radionuklidy, které nejsou vázané ve formě komplexů, oddělí od 2B8–MX–DTPA značené radionuklidem s použitím vysokovýkonné kapalinové gelové permeační chromatografie. V dalších experimentech se purifikace vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií eliminuje vzhledem k vysokému podílu inkorporace radionuklidu ($>95\%$) obdrženého s tímto izotopem.

Imunoreaktivita přípravků 2B8–MX–DTPA značených radionuklidů ^{111}In a ^{90}Y se analyzuje způsobem Lindmoa (3). 2B8–MX–DTPA značená radionuklidem ^{111}In vykazuje 100% imunoreaktivitu (obrázek 6) a konjugát značený radionuklidem ^{90}Y vykazuje 60% imunoreaktivitu (hodnoty se neuvádějí).

3. Charakterizace 2B8–MX–DTPA značené radionuklidy ^{111}In a ^{90}Y

Předběžné experimenty s konjugátem značeným ^{90}Y prokazují význačnou degradaci protilátky a ztrátu imunoreaktivity při specifických aktivitách vyšších než 370 MBq/mg (10 mCi/mg) protilátky. Proto se poskytuje složení minimalizující účinky radiolýzy. Byla hodnocena řada účinných nízkomolekulárních prostředků pro zachycení volných radikálů, avšak nejúčinnější pro ochranu integrity protilátky a imunoreaktivity byly vysoké koncentrace lidského serumalbuminu (HSA) (obrázky 7 až 9).

Protilátka značená radionuklidem ^{90}Y se připravuje v 1X PBS, pH 7,4, s obsahem 75 mg/ml HSA. Rovněž se přidává kyselina diethylentriaminpentaoctová do dosažení konečné koncentrace 1 mM, aby se zajistilo, že jakýkoliv ^{90}Y oddělený od protilátky se naváže ve formě komplexu. Degradace 2B8–MX–DTPA označené na specifickou aktivitu 540 MBq/mg (14,6 mCi/mg) se hodnotí v časech 0 a 48 h s použitím SDS–PAGE a autoradiografie. Obrázky 8 a 9 ukazují, že protilátka označená radionuklidem nevykazuje žádnou významnou degradaci v průběhu 48 h při inkubaci při teplotě 4 °C. Chromatografie s použitím předem připravené tenké vrstvy ukazuje, že ztráta ^{90}Y je nižší než 2 % v průběhu inkubace po dobu 48 h (tabulka 24). Imunoreaktivita byla rovněž relativně konstantní, 60 % (tabulka 24).

Tabulka 24

Stabilita ^{90}Y –2B8–MX–DTPA připravené pro klinické použití

Čas (h při 4 °C)	Procent aktivity připojené na kon- jugát	Procent imunoreaktivity
0	97,2	62
24	96,2	60
48	96,2	60

Označený konjugát [specifická aktivita 540 MBq/mg (14,6 mCi/mg)] se připraví v PBS, pH 7,4 s obsahem 75 mg/ml lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA a alikvoty se inkubují při teplotě 4 °C. Stabilita konjugátu se analyzuje v časech ukázaných SDS–PAGE a autoradiografií, chromatografií na předem připravené tenké vrstvě a imunoesejí pro celé buňky. Výsledky ukazují, že zhruba 96 % radionuklidu kovu zůstává připojených ke konjugátu po 48 h při teplotě 4 °C, a že imunoreaktivita protilátky zůstává konstantní, zhruba 60 %.

Studie složení se též provádějí pomocí konjugátu značeného radionuklidem ^{111}In . Specifická aktivita je 81 MBq/mg (2,2 mCi/mg). Protilátka označená radionuklidem se vyhodnocuje v 1X PBS, pH 7,4 s obsahem 50 mg/ml HSA. Obrázek 10 ukazuje fotografie autoradiogramů pro čas nula a 48 h inkubace. Denzitometrická analýza autoradiogramů ukazuje, že nenastává žádná degradace protilátky označené radionuklidem v průběhu studie (obrázky 11 a 12). Chromatografická analýza vzorků na předem připravené tenké vrstvě nevykazuje žádnou ztrátu radionuklidu ^{111}In (tabulka 25). Navíc se udržuje imunoreaktivita zhruba 100 % (tabulka 25).

Tabulka 25

Stabilita ^{111}In -2B8-MX-DTPA připravené pro klinické použití

Stabilita ^{111}In -2B8-MX-DTPA připravené pro klinické použití

Čas (h při 4 °C)	Procent aktivity připojené na kon- jugát	Procent imunoreaktivity
0	94,0	105
24	96,5	104
48	96,0	100

Označený konjugát [specifická aktivita 81 MBq/mg (2,2 mCi/mg)] se připraví v PBS, pH 7,4 s obsahem 50 mg/ml lidského serumalbuminu a alikvoty se inkubují při teplotě 4 °C. Stabilita konjugátu se analyzuje SDS-PAGE a autoradiografií, chromatografií na předem připravené tenké vrstvě a imunoesejí pro celé buňky. Výsledky ukazují, že zhruba 96 % radioaktivní značky zůstává připojených ke konjugátu po 48 h při teplotě 4 °C, a že imunoreaktivita protilátky zůstává konstantní, zhruba 100 %.

Při inkubaci klinického přípravku 2B8-MX-DTPA označeného radionuklidem ^{90}Y na specifickou aktivitu 540 MBq/mg (14,6 mCi/mg) po dobu 96 h při teplotě 37 °C v lidském séru a analýze za neredukujících podmínek SDS-PAGE a autoradiografií se ukazuje v průběhu doby inkubace ztráta radionuklidu nižší než 4 %. Denzitometrické záznamy autoradiogramů v čase nula a 96 h neukazují žádnou významnou degradaci konjugátu označeného radionuklidem (obrázky 13 až 15). Tyto výsledky se potvrzují chromatografickými analýzami na tenké vrstvě pro vzorky časů nula a 96 h (tabulka 26). Celkem tyto výsledky ukazují, že konjugát značený yttriem je stabilní za podmínek použitých v této studii. Podobné výsledky se obdrží s konjugátem 2B8-MX-DTPA značeným radionuklidem ^{111}In (obrázky 16 až 18).

Tabulka 26

Analýza konjugátu ^{90}Y -2B8-MX-DTPA inkubovaného v lidském séru po dobu 96 h při teplotě 37 °C provedená chromatografií na tenké vrstvě

Čas (h při 37 °C)	Procento aktivity připojené na konjugát
0	95,1
24	95,2
48	93,2
72	92,0
96	91,4

Vzorky lidského séra obsahující ^{90}Y 2B8-MX-DTPA [specifická aktivita 540 MBq/mg (14,6 mCi/mg)] se analyzují v časech ukázaných nanesením 1 μl vzorků zředěných 1:20 na chromatografické pruhy s předem připravenou tenkou vrstvou, vzorky se analyzují po trojicích. Chromatografické pruhy se vyvíjejí vzestupnou chromatografií v 10% roztoku octanu amonného ve směsi methanol:voda (1:1, objemový poměr), vysuší a rozříznou v polovině napříč. Připojená aktivita ve spodní a horní polovině každého pruhu se poté stanoví a vypočítá se procento aktivity spojené s konjugátem (volný radioaktivní kov migruje s čelem rozpouštědla, zatímco aktivita připojená na protein zůstává při počátku). Udávají se průměry aktivity spojené s konjugátem pro každé stanovení.

B. Studie na zvířatech

1. Farmakologické/toxikologické studie vysokých dávek s 2B8 a 2B8-MX-DTPA

Při studii dobré laboratorní praxe provedené v White Sands Research Center (číslo studie 920111) se opicím *Cynomolgus* podávaly intravenózní injekce různých dávek 2B8. Vzorky krve se odebírají před každou novou injekcí a krev se zpracuje průtokovým cytometrickým hodnocením populací lymfocytů (tabulka 27).

Tabulka 27

5 Populace B buněk primátů stanovené proudovou cytometrií po infuzi myší monoklonální protilátky 2B8 proti CD20

	Zvíře	Dávka	Den	B buňky ^{a, b}	% vyčerpání
Skupina 1					
452	fyziol. roztok	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	fyziol. roztok	0	12,4	0	
		1	11,6	6	
		7	11,2	10	
		13	8,4	32	
		38	7,7	38	
		52	13,1	0	
Skupina II					
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	

Zvíře	Dávka	Den	B buňky ^{a, b}	% vyčerpání
		13	6,6	62
		38	5,1	71
		52	5,2	68
Skupina III				
701	2,5 mg/kg	0	21,6	0
		1	10,7	50
		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
Skupina IV				
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
Skupina V				
705	10 mg/kg	0	17,2	0
		1	5,2	70
		7	1,3	69
		13	8,2	52
		38	17,1	1

Zvíře	Dávka	Den	B buňky ^{a, b}	% vyčerpání
		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

^aProcento celkových lymfocytů.

5 ^bB–buněčná populace vyjádřená kvantitativně dvěma prostředky markeru, antigenu proti myšimu IGG–RPE a proti lidskému IG–FITC (antigen proti myšimu IgG RPE detekuje 2B8 blokovanou CD20 a antigen proti lidskému IgG FITC detekuje opičí B–buněčný povrchový Ig).

10 Zvířata ve skupinách I až IV dostávají injekčně každých 48 h celkem 7 injekcí, zvířata ve skupině V dostávají injekci pouze v den 0. Zvířata ve skupinách III a IV se utratí dne 14.

15 V průběhu této studie ani po ní se nezaznamenávají žádné významné farmakotoxické účinky na hodnocené klinické parametry související s podáváním protilátky 2B8 proti CD20. Podobně se nezaznamenávají žádné abnormality v průběhu analýzy různých histopatologických vzorků obdržených od zvířat ve skupinách III a IV.

20 Doba trvání studie je 14 d a v průběhu studie se zvířata hodnotí v následujících kategoriích: klinická pozorování, tělesná hmotnost, tělesná teplota, příjem vody a potravy, vylučování stolice, biochemie krevního séra, hematologie, analýza moče a tělesné vyšetření. Navíc se zvířatům v každé skupině odebírá krev v den 0, 1, 7 a 13 a analyzuje se ohledně hladin sérové protilátky (2B8) a hladin T–buněk a B–buněk. V den 13 se zvířata ve skupinách III a IV utratí a vybrané tkáně se zkoumají po přípravě vzorků optickou mikroskopií. Hodnocené tkáně jsou: srdce, slezina, játra, ledviny, plíce, mozková kůra, mícha, lymfatická uzlina, žaludek, ileum, kolon, kosterní sval, varlata/vaječníky, slinivka a kostní dřev.

25 Při analýze krve zvířat ohledně hladin T–buněk a B–buněk v krevním oběhu vykazují zvířata skupin II až V větší než 50% ztrátu B–buněk v oběhu do dne 13 (obrázek 19), podání protilátky nemělo žádný účinek na hladiny T–buněk (hodnoty se neuvádějí). Veškeré skupiny dostávající protilátku 2B8 vykazují nasycení B–buněk a přebytkovou protilátku v krevní plazmě (hodnota se neuvádí). Zvířata ve skupině V, která obdržela jednu dávku 10,0 mg/kg protilátky 2B8 rovněž vykazují snížení hladin B–buněk v oběhu ekvivalentní snížení u zvířat v ostatních skupinách.

35 Zvířata ve skupinách I, II a V se vyšetřují do dne 52 (obrázek 20). Hladiny B–buněk se vrací k více než 70 % normálního stavu v den 38 kromě jednoho zvířete ve skupině II (PRO804) a jednoho zvířete ve skupině V (PRO716). Hladiny oběhových B–buněk v těchto zvířatech zůstávají zhruba na 40 % normálních hladin po 52 d.

40 Navíc k této studii se farmakotoxické účinky ⁸⁹Y–2B8–MX–DTPA hodnotí u opic Cynomolgus ve studii dobré laboratorní praxe prováděné ve White Sands Research Center (Studie č. 920611). Konjugát kvality pro klinické použití se váže s neradioaktivním nuklidem ⁸⁹Y. Konjugát s yttriem se formuluje ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem, pH 6,8, s obsahem 75 mg/ml lids-

kého serumalbuminu a 1 mM DTPA (klinická formulace) a podává se intravenózně, jak se popisuje v oddílu Způsoby provedení.

- 5 Jak ukazují výsledky na obrázku 21, má 2B8–MX–DTPA označený ^{89}Y malý účinek nebo nemá žádný účinek na cirkulující B–buňky u těchto zvířat bez ohledu na podanou dávku. Navíc kromě obecného vyčerpání lymfocytů (20 až 43 %) nenastávají žádné významné abnormality klinických parametrů včetně biochemie krevního séra, analýzy moči, tělesné hmotnosti a teploty.

10 2. Farmakokinetické studie s 2B8 a 2B8–MX–DTPA

- 10 Jak se popisuje výše, zvířata ve skupině V studie dobré laboratorní praxe obdržela jednu dávku 2B8, 10,0 mg/kg. Lineární regrese výsledků ukazuje, že nativní protilátka ubývá z oběhu těchto opic s poločasem zhruba 4, 5 d. V podobné studii s použitím myši BALB/c byly hodnoty poločasu nativní a konjugované 2B8 zjištěné lineární regresní analýzou (údaje s neuvádějí) 8,75 d (obrázek 22). Tento výsledek ukazuje, že konjugace 2B8 nemá žádný účinek na její clearance u myši BALB/c.

3. Biologická distribuce a studie lokalizace tumoru s 2B8–MX–DTPA označenou radionuklidem

- 20 Na základě předběžného pokusu biologické distribuce popsaného výše (oddíl 2d) se podává injekčně konjugovaná 2B8 označená radionuklidem ^{111}In do specifické aktivity 85 MBq/mg (2,3 mCi/mg). Zhruba 41 kBq (1,1 μCi) se podává injekčně každé z 12 myši BALB/c pro stanovení biologické distribuce látky označené radionuklidem. Následně se skupiny po 5 zvířatech utratí v časech 1, 24, 48 a 72 h a jejich orgány a část kůže, svalů a kostí se vyjmou a zpracují pro
25 analýzu. Navíc se sbírá moč a stolice a analyzuje pro časy 24 až 72 h. Hladina radioaktivity v krvi klesá z 40,3 % podané dávky na g v době 1 h na 18,9 % v době 72 h (tabulky 1 až 4, obrázek 23). Hodnoty pro srdce, ledvinu, sval a slezinu zůstávají v rozmezí 0,7 až 9,8 % v průběhu druhého pokusu. Nalezené hladiny radioaktivity v plicích klesají ze 14,2 % v době 1 h na 7,6 % v době 72 h a podobně odpovídající podíly injikované dávky na g jaterní tkáně klesají z 10,3 na 9,9 %. Tyto hodnoty se používají při stanovení odhadů absorbované radiační dávky od ^{111}In –2B8–MX–DTPA (tabulka 19).

- Biologická distribuce konjugátu značeného radionuklidem ^{90}Y o specifické aktivitě 451 MBq/mg (12,2 mCi/mg) protilátky se vyhodnocuje u myši BALB/c. Obdržená inkorporace radionuklidu je
35 >90 % a protilátka značená radionuklidem se purifikuje vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií. Tkáňová depozice radioaktivity se měří v hlavních orgánech a kůži, svalů, kostí a moči a stolici v průběhu 72 h a vyjadřuje se jako procento injikované dávky/g tkáně. Výsledky v tabulkách 5 až 8 a na obrázku 24 ukazují, že zatímco hladiny radioaktivity související s krví klesají ze zhruba 39,2 % podané dávky na g v čase 1 h na zhruba 15,4 % po 72 h, hladiny radioaktivity související s ocasem, srdcem, ledvinou, sva-
40 lem a slezinou zůstávají dostatečně konstantní na hodnotě 10,2 % nebo méně v průběhu experimentu. Je důležité, že aktivita kosti je v rozmezí 1,4 % podané dávky na g kosti v čase 1 h až 3,2 % v čase 72 h. Tyto výsledky v souhrnu ukazují, že konjugát obsahuje málo volného yttria a že se volný radioaktivní kov vylučuje v průběhu studie. Tyto výsledky se používají při stanovení odhadů radiační absorbované dávky pro ^{90}Y –2B8–MX–DTPA (tabulka 20).

- Pro studie lokalizace tumoru se připravuje 2B8–MX–DTPA označený radionuklidem ^{111}In o specifické aktivitě 100 MBq/mg (2,7 mCi/mg). Poté se následně podá 100 μl označeného konjugátu [888 kBq (24 μCi)] injekčně každé z 12 athymických myši s Ramosovým B–buněčným tumor-
50 rem. Hmotnost tumorů je v rozmezí od 0,1 do 1,0 g. V časech 0, 24, 48 a 72 h po injekci se odebere 50 μl krve retroorbitální punkcí, myši se utratí cervikální dislokací a odebere se ocas, srdce, plíce, játra, ledvina, slezina, sval, femur a tumor. Po zpracování a zvážení tkání se stanoví aktivita každého vzorku tkáně s použitím čítače gama a hodnoty se vyjádří jako procento podané dávky na g.

55

Výsledky (obrázek 25) ukazují, že koncentrace ^{111}In -2B8-MX-DTPA v tumoru ustáleně rostou v průběhu experimentu. 13 % podané dávky se akumuluje v tumoru po 72 h. Oproti tomu hladiny v krvi klesají v průběhu experimentu z více než 30 % v čase nula na 13 % v čase 72 h. Všechny ostatní tkáně (kromě svalů) obsahují mezi 1,3 a 6,0 % podané dávky na g tkáně ke konci pokusu.

5 Svalová tkáň obsahuje zhruba 13 % podané dávky na g.

C. Dozimetrie

10 Souhrnné dozimetrické údaje obdržené ze studií biologické distribuce u normálních myší BALB/c jsou v tabulkách 19 a 20 pro konjugáty značené radionuklidy india a yttria a jsou ve shodě s údaji v literatuře při srovnání vztaženém na jednotku podané aktivity (5) a ukazují, že konjugáty 2B8 značené radionuklidy yttria a india lze bezpečně hodnotit ohledně klinické účinnosti u pacientů s lymfomem.

15 D. Toxikologie

1. 2B8: zkouška obecné účinnosti při jedné dávce

20 Myším a morčatům se podává jednotlivá intraperitoneální dávka 2B8 (0,5 ml nebo 5,0 ml) a zvířata se pozorují po dobu 7 d. Nedochází k žádným známkám toxicity.

2. 2B8 a 2B8-MX-DTPA: imunohistologické studie na lidských tkáních

25 Reaktivita myší monoklonální protilátky 2B8 se hodnotí s použitím souboru 32 různých lidských tkání fixovaných acetonem. Protilátka 2B8 reaguje s antigenem proti CD20, který má velice omezený typ tkáňové distribuce, takže jej lze pozorovat pouze v podsouborech buněk v lymfoidních tkáních včetně buněk hemopoetického původu.

30 V lymfatické uzlině lze pozorovat imunoreaktivitu v populaci zralých kortikálních B-lymfocytů stejně tak jako v prolifерujících buňkách v zárodečných centrech. Pozitivní reaktivitu lze též pozorovat v periferní krvi, v oblastech B-buněk mandlí, v bílé dřeni sleziny a ve 40 až 70 % medulárních lymfocytů přítomných v thymu. Pozitivní reaktivitu lze též pozorovat ve folikulech lamina propria (Peyerova ložiska) tlustého střeva. Konečně agregáty rozptýlených lymfoidních buněk ve stromatu různých orgánů včetně močového měchýře, mamy, děložního krčku, jícnu, 35 plic, parotidy, prostaty, tenkého střeva a žaludku vykazují rovněž pozitivitu při reakci s protilátkou 2B8.

40 Veškeré jednoduché buňky epithelu, stejně tak jako buňky stratifikovaného epithelu a dlaždicového epithelu různých orgánů jsou nereaktivní. Podobně nelze pozorovat žádnou reaktivitu s neuroektodermálními buňkami včetně buněk mozku, míchy a periferních nervů. Mesenchymální elementy, jako jsou buňky kosterního a hladkého svalstva, fibroblasty, buňky endothelu a polymorfonukleární zánětlivé buňky jsou rovněž negativní.

45 Tkáňová reaktivita konjugátu 2B8-MX-DTPA se hodnotí s použitím souboru 16 lidských tkání fixovaných acetonem. Jak se ukazuje výše pro nativní protilátku, rozpoznává konjugát 2B8-MX-DTPA antigen CD20, který vykazuje vysoce omezený typ distribuce, takže se nachází pouze v podsouboru buněk lymfoidního původu. V lymfatické uzlině se imunoreaktivita pozoruje u B-buněčné populace. Silná reaktivita je v bílé dřeni sleziny a v medulárních lymfocytech thymu. Imunoreaktivita se též pozoruje v rozptýlených lymfocytech močového měchýře, srdce, tlustého 50 střeva, jater, plíce a dělohy a přisuzuje se přítomnosti zánětlivých buněk přítomných v těchto tkáních. Podobně, jako se popisuje výše pro nativní protilátku, neprojevuje se reaktivita u neuroektodermálních buněk nebo mesenchymálních buněk.

III. Diskuse

Myší monoklonální protilátka 2B8 proti CD20 vytvářená klonem stejného určení vykazuje afinitu k antigenu CD20 B-buněk, která může být vyšší než aktivita pozorovaná pro protilátku B1, jak lze stanovit kompeticí s protilátkami známé specifčnosti pro antigen CD20 a Scatchardovou analýzou. Dále imunoprecipitační výsledky ukazují, že antigen precipitovaný protilátkou 2B8 je stejným antigenem jako antigen precipitovaný protilátkou B1, neboť obě protilátky precipitují dublet s relativní molekulovou hmotností 33 a 35 kD. Cytofluorografická analýza specifčnosti protilátky 2B8 pro lymfocyty periferní krve ukazuje, že tato protilátka reaguje specificky s B-buňkami a nevykazuje žádnou reaktivitu s T-buňkami nebo jinými typy lymfocytů. Konečně předběžné údaje o stabilitě ukazují, že je tato protilátka stabilní při teplotě 30 °C po dobu 12 týdnů bez ztráty imunoreaktivity.

Jestliže se protilátka 2B8 konjuguje s methylbenzyl-diethylentriaminpentaoctovou kyselinou (MX-DTPA) nepozoruje se žádné snížení imunoreaktivity ve srovnání s nativní protilátkou. Dále značení konjugátu s radionuklidy ^{111}In a ^{90}Y poskytuje značené konjugáty s imunoreaktivitami 100 % respektive 60 %. Studie stability konjugátů značených radionuklidy ^{111}In nebo ^{90}Y inkubovaných v lidském séru po dobu 96 h při teplotě 37 °C vykazují zanedbatelnou ztrátu radioaktivního kovu v průběhu této studie, což ukazuje, že tyto konjugáty zaručují stabilitu při klinickém použití.

Studie lokalizace tumorů u athymických myší s použitím přípravku 2B8-MX-DTPA značeného indiem ukazuje vzrůstající množství konjugátu navázaného na tumorové buňky v průběhu experimentu bez neobvyklých akumulací v jiných tkáních. Navíc se získávají dozimetrické odhady odvozené od biologické distribuce. Dále jsou dozimetrické odhady odvozené od biologické distribuce v souladu s údaji publikovanými v literatuře. Konečně studie zkřížené reaktivity lidské tkáně s nativními a konjugovanými protilátkami ukazují, že obě protilátky rozpoznávají antigen s vysoce omezenou tkáňovou distribucí, takže reagují pouze se souborem buněk v lymfoidních tkáních včetně buněk hemopoetického původu. V souhrnu tyto výsledky ukazují, že konjugace nepozměňuje tkáňovou specifčnost protilátky, a že konjugáty značené radionuklidem jsou stabilní in vivo a rozpoznávají antigen CD20 přítomný na povrchu tumorů pěstovaných experimentálně u athymických myší.

Jestliže se protilátka 2B8 použije při studii farmakologie/toxikologie vysokých dávek, nevykazuje žádné významné farmakotoxické účinky na žádný z vyhodnocovaných parametrů ani v průběhu studie ani po studii. Podobně se nezaznamenávají žádné abnormality v průběhu analýzy různých histopatologických vzorků zkoumaných optickou mikroskopií. Překvapivě veškeré použité dávky protilátky způsobují význačné vyčerpání B-buněk v krevním oběhu. Hladiny B-buněk v oběhu se však vrací ke zhruba normálním hodnotám při vymizení podané protilátky. Ve skupině opic, které dostaly jednu dávku (skupina V), ubývá nativní protilátka z oběhu s hodnotou $\beta_{t_{1/2}}$ zhruba 4,5 d. Při provedení této farmakologické studie u myší BALB/c ubývá protilátka 2B8 s hodnotou $\beta_{t_{1/2}}$ 8,75 d. Celkově tedy tyto údaje ukazují, že tato nativní protilátka může též poskytnout určitý klinický účinek při podání jako doprovodná složka konjugátů značených radionuklidem. Celkově tyto údaje ukazují, že protilátka 2B8 o vysoké afinitě a její MX-DTPA konjugát vykazují omezený typ reaktivity lidské tkáně. Navíc u primátů je tato nativní protilátka netoxická a poskytuje přechodnou clearance B-buněk. Avšak jakmile se protilátka odstraní z oběhu, hladiny B-buněk se dostatečně rychle obnoví. Navíc jsou konjugáty 2B8-MX-DTPA značené indiem a yttriem stabilní in vitro a nevykazují žádnou ztrátu radioaktivního kovu v průběhu dlouhodobé inkubace v lidském krevním séru. Konečně odhady radiační dávky odvozené od biologické distribuce 2B8-MX-DTPA značené radionuklidy ^{90}Y nebo ^{111}In u myší BALB/c jsou při vyjádření na jednotku podané aktivity v souladu s dávkovanými odhady odvozenými od lidských klinických studií používajících konjugované protilátky značené těmito radionuklidy.

IV. Shrnutí preklinického vývoje způsobu značení „mix-&-shoot“ pro přípravu ^{90}Y -2B8-MX-DTPA

A. Úvod

5 Myší monoklonální protilátka (2B8) proti CD20 značená radionuklidem ^{90}Y se hodnotí ve fázi I klinické zkoušky pro léčení relapsu B-buněčného lymfomu. Původní způsob použití pro přípravu protilátky značené yttriem používá vysokovýkonnou kapalinovou chromatografii pro odstranění radionuklidu, který není vázán s proteinem, před přípravou a podáním pacientům. Naneštěstí je
10 tento krok zvláště časově náročný a způsobuje dlouhou expozici protilátky radionuklidu v nechráněném stavu. To vede ke zvýšené radiolýze protilátky a poklesu imunoreaktivity. Navíc otázka pracnosti tohoto způsobu znamená obtíž při přípravě více než jedné dávky radiofarmaka denně. Zjednodušení tohoto způsobu by umožnilo provedení na klinickém pracovišti jako alternativu k použití radiofarmaceutických služeb NIPI Pharmacy Services.

15 V souladu s tím se provádí způsob značení radionuklidem nazývaný „mix-and-shoot“, který předchází nutnosti purifikace vysokého stupně inkorporace radionuklidu a zlepšení retence imunoreaktivity. Studie stability in vitro stejně tak jako studie biologické distribuce u myši ukazují, že protilátka označení radionuklidem způsobem „mix-and-shoot“ je srovnatelná s látkou získanou s použitím současného způsobu vysokovýkonné kapalinové chromatografie. Výsledky těchto
20 preklinických studií ukazují, že tento nový způsob „mix-&-shoot“ lze použít při přípravě 2B8-MX-DTPA značené ^{90}Y vhodné pro použití v klinických zkouškách.

B. Materiály a způsoby provedení

25 Materiály

1. Buňky

30 Lymfoblastické buněčné linie SB (CD20 pozitivní) a HSB (CD20 negativní) pocházejí od American Type Culture Collection a udržují se v RPMI-1640 s obsahem 10 % fetálního bovinního séra s přísadkou glutaminu.

2. Protilátka

35 Protilátka 2B8 se purifikuje ve výrobním oddělení ze supernatantu z bioreaktoru s dutými vlákny s použitím způsobů dříve popsanych v IND (BB-IND 4850/4851).

3. Další chemické prostředky

40 ^{90}Y ve formě chloridu pochází z Amershamu. Všechny ostatní chemikálie pocházejí ze zdrojů popsanych v připojených zprávách citovaných níže. Chemikálie použité pro způsoby značení radionuklidem jsou zpracované pro odstranění kontaminujících iontů těžkých kovů, které by konkurovaly s radionuklidy v průběhu stupně značení (viz oddíl Způsoby provedení). Chemikálie
45 se vyrábějí za podmínek dobré výrobní praxe ve výrobním oddělení IDEC podle zavedených záznamů o vsádkové produkci.

Způsoby provedení

50 1. Příprava 2B8-D4X-DTPA

MX-DTPA kvality pro klinické použití pochází od Coulter Immunology ve formě dvojsodné soli ve vodě a uchovává se při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Konjugát (2B8-MX-DTPA) se připraví ve výrobním oddělení. V těchto studiích se používají dvě různé šarže konjugátu, obě v normálním fyziologic-

kém roztoku při koncentraci 10 mg/ml. Konjugáty se plní do sterilních polypropylenových injekčních stříkaček o obsahu 2 ml a ukládají při teplotách 2 až 8 °C.

2. Udržování podmínek bez přítomnosti kovů

5

Veškeré zpracování chemikálií se provádí tak, aby se minimalizovala možnost kontaminace kovem. Používají se polypropylenové nebo polystyrenové plastové nádoby, jako jsou baňky, kádinky a kalibrované válce. Ty se promyjí prostředkem Alconox a dostatečně vypláchnou vodou Milli-Q nebo Water for Irrigation (WFIr) před použitím. Pro přesné zacházení s malými objemy se používají špičky pipet neobsahující kov (BioRad). Větší objemy chemikálií se zpracovávají s použitím sterilních plastových serologických pipet. Reakce se vhodným způsobem provádějí v mikrocentrifugačních zkumavkách o obsahu 1,8 ml zhotovených z polypropylenu se šroubovým uzávěrem.

3. Stanovení inkorporace radionuklidu

15

Inkorporace radionuklidu se stanoví s použitím chromatografie na předem připravené tenké vrstvě (ITLC) po trojicích od každého vzorku podle SOP SP-13-008. Obecně se tento způsob provádí následujícím způsobem: konjugát značený radionuklidem se zředí 1:20 v 1X PBS s obsahem 1 mM DTPA nebo 5 mM EDTA a poté se nanese 1 μ l 1,5 cm od jednoho konce pásu 1 x 5 cm papíru ITLC SG (Gelman Sciences). Tento papír se vyvíjí s použitím 10% octanu amonného ve směsi methanol:voda (1:1, objemový poměr). Pásky se vysuší, přeříznou v polovině napříč a radioaktivita každé části se stanoví scintilačním počítacem. Radioaktivita odpovídající spodní polovině pásu (radioaktivita připojená k proteinu) se vyjádří v procentech celkové aktivity stanovené jako součet hodnot pro vrchní a horní poloviny.

25

4. Způsob „mix-and-shoot“ pro 2B8-MX-DTPA značenou radionuklidem ^{90}Y .

Protilátky se označí beznosičovým radionuklidem ^{90}Y ve formě chloridu od Amersham v 0,04 M roztoku kyseliny chlorovodíkové. Alikvot radionuklidu (370 až 740 MBq/mg protilátky) se přeneše do polypropylenové trubice a přidá se 0,02-násobek objemu 2M roztoku octanu sodného prostého kovu pro úpravu pH roztoku na 3,6. Ihned se přidá 2B8-NDTPA (0,3 mg, 10,0 mg/ml v normálním fyziologickém roztoku) a roztok se jemně zamíchá. pH roztoku se ověří papírkem pro kontrolu pH v rozmezí 3,8 až 4,1 a inkubuje se po dobu 5 min. Reakce se ukončí přenosem reakční směsi do samostatné polyethylenové zkumavky s obsahem 1XPBS se 75 mg/ml lidského serumalbuminu (HSA) a 1 mM kyseliny diethylenetriaminpentaoctové (DTPA) a jemně se zamíchá. Protilátka značená radionuklidem se ukládá při teplotách 2 až 8 °C.

35

Specifické aktivity se stanoví měřením aktivity příslušného alikvotu konjugátu značeného radionuklidem. Tato hodnota se opraví na účinnost čítače, vztáhne se ke koncentraci proteinu konjugátu stanovené absorbancí při vlnové délce 280 nm a vyjádří se v MBq/mg (mCi/mg) proteinů.

40

5. Imunoreaktivita ^{90}Y -2B8-MX-DTPA in vitro

Imunoreaktivita konjugátu značeného radionuklidem ^{90}Y se stanoví s použitím SOP SP13-009 na základě modifikované verze celobuněčné imunoeseje popsané Lindmoem. Vyrůstající koncentrace CD20-pozitivních SB buněk nebo CD20-negativních HSB buněk v log fázi se přidávají k duplikátním souborům polypropylenových zkumavek o obsahu 1,5 ml. Konečný objem buněk je 0,40 ml. Konjugát značený radionuklidem se zředí na konečnou koncentraci protilátky 1 až 2,5 ng/ml a do každé zkumavky se přidá 0,35 ml. Po 90 min inkubace se buňky peletují centrifugací a sbírají se supernatanty. Radioaktivita zbývající ve frakci supernatantu se stanoví scintilačním počítacem. Data se vynášejí jako kvocient celkové přidané aktivity dělené aktivitou připojenou na buňky proti převrácené hodnotě počtu buněk na zkumavku. Úsek na ose y představuje imunoreaktivní frakci.

55

6. Stabilita ^{90}Y -2B8-MX-DTPA připraveného pro klinické použití in vitro

Konjugát 2B8-MX-DTPA se označí radionuklidem ^{90}Y a připraví se podle způsobu „mix-&-shoot“ popsaného výše. Připraví se dvě šarže značeného konjugátu. Jedna šarže se použije pro
 5 vyhodnocení stability inkorporace radionuklidu a druhá šarže se použije pro vyhodnocení retence imunoreaktivity. Připravené konjugáty se inkubují při teplotě 4 °C po dobu 48 h a alikvoty se analyzují v časech 0, 24 a 48 h s použitím neredukční SDS-PAGE a autoradiografie. Imuno-reaktivita v každém čase se vyhodnotí s použitím eseje popsané výše.

10 7. Stabilita in vitro ^{90}Y -2B8-NTX-DTPA v lidském séru

Stabilita 2B8-NTX-DTPA označené radionuklidem ^{90}Y se vyhodnotí inkubací v lidském séru při teplotě 37 °C po dobu 72 h. Konjugovaná protilátka se označí radionuklidem ^{90}Y a připraví se podle popisu výše. Konjugát označený radionuklidem se zředí 1:10 normálním lidským sérem
 15 (nikoliv tepelně inaktivovaným) a alikvoty se inkubují v plastových zkumavkách při teplotě 37 °C. Ve vybraných časech se vzorky odeberou a analyzují neredukční SDS-PAGE a autoradiografií.

20 8. Biologická distribuce ^{90}Y 2B8-MX-DTPA

2B8-MX-DTPA značená radionuklidem ^{90}Y se vyhodnocuje ohledně biologické distribuce v průběhu 8 až 10 týdnů na myších BALB/c. Konjugát značený radionuklidem se připraví, jak se popisuje výše. Myším se podává intravenózně 185 kBq (5 μCi) 2B8-MX-DTPA značené radio-
 25 nuklidem ^{90}Y a skupiny po 5 myších se utratí v časech 1, 24, 48 a 72 h. Po utrácení se odebere ocas, srdce, plíce, játra, ledvina, slezina, sval, femur, promyje se a zváží. Pro analýzu se též odebere vzorek krve a kůže. Radioaktivita každého vzorku tkáně se stanoví měřením brzdného záření s použitím čítače gama a stanoví se procento z podané dávky na g tkáně a procento z podané dávky na orgán.

30 9. Dozimetrie

Údaje o biologické distribuci obdržené na základě aplikace myším 2B8-MX-DTPA značené radioaktivním nuklidem ^{90}Y se používají pro výpočet odhadů absorbovaných radiačních dávek pro aktivitu 37 MBq (1,0 mCi) podanou pacientovi o hmotnosti 70 kg. Odhady se provedou způ-
 35 soby přijatými výborem Medical International Radiation Dose Committee (MIRD) Společnosti nukleární medicíny. Tyto výpočty provedl pan Phillip Hagan, Nuclear Medicine Service, VA Medical Center, LaJolla, CA 92161.

40 10. Validace způsobu přípravy klinických dávek ^{90}Y -2B8-MX-DTPA

(Odkaz na zprávu R&D s názvem „Validation of „Mix-and-Shoot“ Radiolabeling Protocol for the Preparation of Clinical Doses of ^{90}Y -2B8-MX-DTPA“, autor P. Chinn, vydáno 22. dubna 1994).

45 C. Výsledky

1. Příprava 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y způsobem „Mix-&-Shoot“

Předběžné pokusy hodnotící kinetiku reakce značkování radionuklidem s 2B8-MX-DTPA a ^{90}Y ukazují, že při pH 3,6 až 4,0 se inkorporuje 95 % radionuklidu v průběhu reakční doby 5 až
 50 10 min. Reprodukovatelnost této radioinkorporace (95,7 % $\pm$ 1,7 %) se následně ověřuje ve validační studii (Reference R&D report „Validation of „Mix-and-Shoot“ Radiolabeling Protocol for the Preparation of Clinical Doses of ^{90}Y -2B8-MX-DTPA“, autor P. Chinn, vyšlo 22. dubna 1994). Příprava 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y tímto způsobem „mix-and-shoot“
 55 poskytuje produkt srovnatelný s produktem připraveným způsobem vysokovýkonné kapalinové

chromatografie (viz BB-IND 4850/4851). Způsob radioaktivního značení je reprodukovatelný při specifických aktivitách obvykle v rozmezí 370 až 555 MBq/mg (10 až 15 mCi/mg) protilátky.

Imunoreaktivita 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y připravené tímto způsobem je obvykle vyšší než 70 % oproti 55 až 60 % pozorovaným při validacích způsobu provedeního s použitím vysokovýkonné kapalinové chromatografie (obrázek 26). Tento rozdíl pravděpodobně vyplývá ze snížených účinků radiolýzy díky zkrácenému času inkubace při způsobu „mix-and-shoot“. Tento výsledek je typický a, jak se diskutuje níže, je reprezentativní pro validace způsobů pro přípravu klinických dávek konjugátu značeného radionuklidem ve větším měřítku.

2. Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značeného ^{90}Y

Předběžné pokusy s nechráněným konjugátem protilátky značeným radionuklidem ^{90}Y s použitím způsobu vysokovýkonné kapalinové chromatografie ukazuje, že radiolýza způsobuje významnou degradaci protilátky a ztrátu imunoreaktivity. Proto se vyvíjí formulační pufr pro minimalizaci účinků radiolýzy. Lidský serumalbumin (HSA) je účinný při minimalizaci degradace protilátky radiolýzou. Provádí se vyhodnocení s konjugátem označeným radionuklidem připraveným způsobem „mix-&-shoot“ pro ověření účinnosti formulace při minimalizaci radiolýzy. Protilátka značená radionuklidem ^{90}Y se specifickou aktivitou 536 MBq/mg (14,5 mCi/mg) protilátky se připravuje v pufru 1X PBS, pH 7,4, s obsahem 75 mg/ml lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA. Degradace konjugátu 2B8-MX-DTPA se hodnotí v časech 0, 24 a 48 h s použitím způsobu SDS-PAGE a autoradiografie. Obrázky 2, 3 a 4 ukazují, že konjugát značený radionuklidem nevykazuje významnou degradaci v průběhu 48 h při inkubaci při teplotě 4 °C. Chromatografie na předem připravené tenké vrstvě nevykazuje žádnou ztrátu ^{90}Y v průběhu inkubace po dobu 48 h. Tyto výsledky se potvrzují způsobem SDS-PAGE/autoradiografickou analýzou (Tabulka 28). Imunoreaktivita je též relativně konstantní, >88 % (tabulka 29).

Tabulka 28

Stabilita konjugátu ^{90}Y -2B8-MX-DTPA připraveného způsobem „Mix-&-shoot“ v PBS obsahujícím lidský serumalbumin a DTPA

Čas (h)	Procento aktivity připojené na konjugát	
	ITLC	SDS/PAGE
0	92,9	96,0
24	95,5	95,4
48	91,3	94,6

Tabulka 29

Imunoreaktivita přípravku ^{90}Y -2B8-MX-DTPA připraveného způsobem „mix-&-shoot“ v PBS
5 obsahujícím lidský serumalbumin a DTPA

Čas (h při 4 °C)	Procento imunoreaktivity
0	87,9
24	88,5
48	90,4

10 Klinicky formulovaný konjugát 2B8-MX-DTPA značený ^{90}Y o specifické aktivitě 581 MBq/mg (15,7 mCi/mg) se inkubuje po dobu 72 h při teplotě 37 °C v lidském séru. Vzorky se analyzují neredukční SDS-PAGE a autoradiografií (obrázek 30) a nevykazují žádnou ztrátu radionuklidu v průběhu inkubace (tabulka 30). Denzitometrické záznamy autoradiogramů v časech 0 a 72 h neukazují žádnou významnou degradaci konjugátu značeného radionuklidem (obrázky 31 a 32). Tyto výsledky jsou ověřené chromatografickými analýzami provedenými na tenké vrstvě (tabulka 30). Je třeba poznamenat, že radioinkorporace pro protilátku použitou v této studii je nižší než
15 ta, která se obdrží ve validačních studiích způsobu značení. Tato nižší inkorporace radionuklidu odpovídá snížené kvalitě šarže radionuklidu ^{90}Y ve formě chloridu užitě pro tuto danou přípravu protilátky značené radionuklidem. Nižší inkorporace radionuklidu nepozměňuje závěr, že konjugát značený yttriem připravený způsobem „mix-and-shoot“ je stabilní za těchto inkubačních
20 podmínek.

Tabulka 30

25 Stabilita konjugátu ^{90}Y -2B8-MX-DTPA inkubovaného v lidském séru

Čas (h při 37 °C)	Procento aktivity připojené na konjugát	
	ITLC	SDS-PAGE/autoradiografie
0	85,7	88,8
24	76,4	90,0
72	87,6	88,7

30 Vzorky lidského séra obsahující ^{90}Y -2B8-MX-DTPA [specifická aktivita 581 MBq/mg (15,7 mCi/mg)] se analyzují ohledně vázaného radionuklidu ^{90}Y v ukázaných časech s použitím proužků pro chromatografii na předem připravené tenké vrstvě a způsoby SDS-PAGE/autoradiografie.

3. Studie biologické distribuce s konjugátem 2B8-MX-DTPA značeným radionuklidem ^{90}Y
35

Biologická distribuce konjugátu značeného radionuklidem ^{90}Y o specifické aktivitě 425 MBq/mg (11,5 mCi/mg) protilátky a inkorporace radionuklidu >95 % se hodnotí na myších BALB/c. Uložení radioaktivity ve tkáních se hodnotí pro hlavní orgány, kůži, sval, kost, moč a stolici v průběhu 72 h a vyjadřuje se jako procento podaného množství na g tkáně a procento podaného množství na orgán. Výsledky znázorněné v tabulkách 31 až 34 a na obrázku 33 ukazují, že hladiny aktivity v krvi klesají zhruba z 43 % podané aktivity na g (% ID/g) v čase 1 h na zhruba 16 % po 72 h. V čase 24 h a později zůstávají hladiny aktivity v srdci, ledvině a slezině dostatečně konstantní, 4 až 8 %. Pro plíce a játra aktivita klesá z 10 až 12 % po 1 h na 8 až 10 % po 72 h. Pro kůži je aktivita relativně konstantní, zhruba 3 % mezi 24 h a 72 h. Aktivita gastrointestinálního traktu je konstantní, 0,5 až 1 % mezi 24 h a 72 h. Aktivita svalu zůstává zhruba 0,6 % v průběhu celé studie. Vychytávání aktivity ve femuru (kosti) zůstává nižší než 4 % ve všech časech, což ukazuje, že množství volného yttria v přípravku konjugátu je nepatrné, a že se v průběhu studie odštěpuje málo volného radioaktivního kovu.

Tabulka 31

Distribuce aktivity 1,0 h po intravenózní injekci ^{90}Y -2B8-MX-DTPA u normálních myši BALB/c

Vzorek	Střední hodnoty ± směrodatná odchylka		
	Hmotnost orgánu g	% ID/ g	% ID/ orgán
Krev	1,37 ± 0,053	42,74 ± 0,78	58,52 ± 1,74
Srdce	0,101 ± 0,01	8,03 ± 3,33	0,82 ± 0,37
Plíce (2)	0,126 ± 0,01	12,44 ± 0,94	1,56 ± 0,05
Ledvina (1)	0,129 ± 0,01	7,81 ± 1,24	0,997 ± 0,10
Játra	0,899 ± 0,07	10,08 ± 1,28	9,01 ± 0,52
Slezina	0,077 ± 0,004	10,74 ± 0,96	0,823 ± 0,04
Sval	7,83 ± 0,28	0,44 ± 0,08	3,43 ± 0,51
Kost	2,94 ± 0,11	3,44 ± 0,57	10,11 ± 1,80
Kůže	2,94 ± 0,11	1,46 ± 0,58	4,24 ± 1,57
GI trakt	2,33 ± 0,08	1,02 ± 0,19	2,36 ± 0,36
Moč	-	-	-
Stolice	-	-	-
Celkem			94,66 ± 3,47

Počet myší = 3

Střední hmotnost = 19,58 g ± 0,71 g

Tabulka 32

Distribuce aktivity 24 h po intravenózní injekci ^{90}Y -2B8-MX-DTPA u normálních myší
BALB/c

Vzorek	Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka		
	Hmotnost orgánu g	% ID/ g	% ID/ orgán
Krev	1,55 $\pm$ 0,12	19,77 $\pm$ 2,42	30,77 $\pm$ 6,04
Srdce	0,105 $\pm$ 0,01	4,44 $\pm$ 0,55	0,47 $\pm$ 0,08
Plíce (2)	0,127 $\pm$ 0,02	8,78 $\pm$ 1,61	1,11 $\pm$ 0,21
Ledvina (1)	0,139 $\pm$ 0,01	5,02 $\pm$ 0,52	0,69 $\pm$ 0,05
Játra	0,966 $\pm$ 0,09	8,62 $\pm$ 2,73	8,20 $\pm$ 1,97
Slezina	0,083 $\pm$ 0,01	6,75 $\pm$ 1,27	0,55 $\pm$ 0,064
Sval	8,83 $\pm$ 0,69	0,692 $\pm$ 0,01	6,12 $\pm$ 0,52
Kost	3,31 $\pm$ 0,26	2,24 $\pm$ 0,31	7,47 $\pm$ 1,53
Kůže	3,31 $\pm$ 0,26	3,33 $\pm$ 0,76	10,88 $\pm$ 1,76
GI trakt	2,89 $\pm$ 0,43	0,73 $\pm$ 0,9	1,02 $\pm$ 0,05
Moč			2,31
Stolice			1,23
Celkem			73,52 $\pm$ 6,18 %

Počet myší = 3

Střední hmotnost = 22,09 g $\pm$ 1,73 g

Tabulka 33

5 Distribuce aktivity 48 h po intravenózní injekci ^{90}Y -2B8-MX-DTPA u normálních myší BALB/c

Vzorek	Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka		
	Hmotnost orgánu g	% ID/ g	% ID/ orgán
Krev	1,50 $\pm$ 0,14	14,97 $\pm$ 5,77	22,53 $\pm$ 8,48
Srdce	0,104 $\pm$ 0,01	3,99 $\pm$ 1,43	0,415 $\pm$ 0,16
Plíce (2)	0,122 $\pm$ 0,02	8,41 $\pm$ 1,57	1,04 $\pm$ 0,31
Ledvina (1)	0,124 $\pm$ 0,01	3,99 $\pm$ 1,62	0,49 $\pm$ 0,19
Játra	0,966 $\pm$ 0,13	6,12 $\pm$ 3,21	5,69 $\pm$ 2,25
Slezina	0,079 $\pm$ 0,01	6,05 $\pm$ 2,38	0,46 $\pm$ 0,16
Sval	8,59 $\pm$ 0,82	0,54 $\pm$ 0,19	4,67 $\pm$ 1,67
Kost	3,22 $\pm$ 0,31	2,07 $\pm$ 0,84	6,65 $\pm$ 2,56
Kůže	3,22 $\pm$ 0,31	2,30 $\pm$ 0,70	7,34 $\pm$ 1,95
GI trakt	2,63 $\pm$ 0,40	0,652 $\pm$ 0,30	1,67 $\pm$ 0,64
Moč	-	-	2,83
Stolice	-	-	2,06
Celkem			57,28 $\pm$ 17,60

Počet myší = 3

Střední hmotnost = 21,48 g $\pm$ 2,05 g

Tabulka 34

Distribuce aktivity 72 h po intravenózní injekci ^{90}Y -2B8-MX-DTPA u normálních myší BALB/c

Vzorek	Střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka		
	Hmotnost orgánu g	% ID/ g	% ID/ orgán
Krev	1,45 $\pm$ 0,07	15,87 $\pm$ 4,81	23,14 $\pm$ 7,26
Srdce	0,093 $\pm$ 0,01	4,16 $\pm$ 1,27	0,392 $\pm$ 0,13
Plíce (2)	0,123 $\pm$ 0,02	10,67 $\pm$ 3,79	1,30 $\pm$ 0,45
Ledvina (1)	0,123 $\pm$ 0,01	4,79 $\pm$ 1,03	0,596 $\pm$ 0,16
Játra	0,876 $\pm$ 0,07	7,26 $\pm$ 1,79	6,39 $\pm$ 1,76
Slezina	0,081 $\pm$ 0,01	7,37 $\pm$ 2,34	0,584 $\pm$ 0,16
Sval	8,30 $\pm$ 0,39	0,67 $\pm$ 0,13	5,58 $\pm$ 1,22
Kost	3,11 $\pm$ 0,15	2,58 $\pm$ 0,51	8,05 $\pm$ 1,76
Kůže	3,11 $\pm$ 0,15	3,09 $\pm$ 0,82	9,66 $\pm$ 2,68
GI trakt	2,59 $\pm$ 0,20	0,79 $\pm$ 0,18	2,05 $\pm$ 0,53
Moč	-	-	3,56
Stolice	-	-	2,82
Celkem			65,47 $\pm$ 14,0

Počet myší = 3

Střední hmotnost = 20,76 g $\pm$ 0,97 g

4. Dozimetrie

Radiační absorbované dávky pro „standardního člověka“ o hmotnosti 79 kg vypočítané pro konjugát značený radionuklidem ^{90}Y s použitím údajů o biologické distribuci u myší (% ID/orgán v tabulkách 31 až 34) se udávají v tabulce 35. Tyto výsledky jsou srovnatelné s výsledky obdržnými dříve s konjugátem 2B8-MX-DTPA značeným radionuklidem ^{90}Y a připraveným s použitím způsobu značení s vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií.

Tabulka 15

5 Radiačně dozimetrické odhady vyplývající z podání protilátky 2B8-MX značené radionuklidem ^{90}Y jednotně rozložené v těle standardního člověka (70 kg) a založené na údajích o distribuci zvířat v průběhu 72 h po injekci

Množství aktivity =		100 μCi /dávka na pacienta	
	rad		rad
Nadledvinky	0,534	Vaječníky	0,534
Žlučový měchýř	0,534	Slinivka	0,534
Žaludeční stěna	0,534	Kostra	
Tenké střevo	1,158	Kortikální kost	1,466
Stěna hor. tl. stř.	1,657	Trabekulární kost	1,466
Stěna dol. tl. stř.	2,380	Dřeň (červená)	4,452
Ledviny	7,015	Dřeň (žlutá)	2,096
Játra	7,149	Chrupavka	1,466
Plíce	2,157	Ostatní složky	1,466
Ostatní tkáň		Kůže	6,603
Sval	2,646	Slezina	4,973
Tuková tkáň	2,646	Varlata	0,534
Krev	2,646	Štítná žláza	0,534
Mozek	2,112	Děloha (negravidní)	0,767
Srdce	2,646	Celé tělo	1,755

10 Odkaz: A Scheme for Absorbed-dose Calculation for Biologically Distributed Radionuclides, MIRDO J. of Nucl. Med./Suppl., 1, 2/68

Výpočty provedené s použitím Spreadsheet Template v Symphony (Lotus Development Corporation) a sestavené Phillip L. Haganem, MS, Nuclear Medicine Service, VA Hospital, San Diego, CA 92161

1 μCi = 37 kBq, 1 rad = 10^{-2} Gy

15 5. Validace způsobu přípravy klinických dávek konjugátu 2B8-MX-DTPA značeného radionuklidem ^{90}Y

20 Celkem deset šarží pro validaci připravených v MPI Pharmacy Services, Inc. Výsledek testování každé šarže se shrnuje v tabulce 36. Střední hodnota každého výsledku se vypočítá a udávají se standardní odchylky tam, kde je to vhodné. Pro hodnocení variability tohoto způsobu následkem různých časů značení se připraví šarže 1 až 8 s použitím času značení 10 min, šarže 9 a 10 s použitím času značení 5 min. Na základě výsledků zkoušky pro 10 validačních šarží se určují specifikace pro vypuštění výrobku. Specifikace pro vypuštění se shrnují v tabulce 37.

Tabulka 36

Analýza výsledků pro 10 validačních šarží ⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA připravených způsobem „mix-&-shoot“

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	sřed. hodn.
% imunoreaktivita	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
% radioinkorporace	97,5	97,0	93,5	96,0	94,7	94,9	95,9	96,5	97,5	93,5	95,7 ± 1,4
konec. protilátky (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
aktivita (μCi/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
spec. akt. (mCi/kg)	10,0	12,0	11,2	9,8	11,3	13,0	11,3	11,1	11,5	10,5	11,2 ± 0,9

1 mCi = 37 MBq

Tabulka 37

Specifikace pro vypuštění konjugátu ^{90}Y -2B8-MX-DTPA připraveného způsobem „mix-&-shoot“

Zkouška	Specifikace	Způsob
Imunoreaktivita	$\geq 60 \%$	RIA
Endotoxin	$< 5 \text{ EU/ml}$	LAL
Inkorporace rad. značky	$\geq 90 \%$	ITLC
Konc. protilátky	$0,075-0,150 \text{ mg/ml}$	A_{280}
Konc. aktivity ¹	$\geq 6,0 \text{ mCi/ml}$	kalibrace dávky
Spec. aktivita ¹	$\geq 9,0 \text{ mCi/mg}$ protilátky	$A_{280}/\text{kalib.}$ dávky
Celk. aktivita lahvičky ¹	$\geq 6,0 \text{ mCi}$	kalibrace dávky
pH	6,0 až 8,0	pH papírek
Celková konc. proteinu	65 až 85 mg/ml	A_{280}
Test na sterilitu	splňuje	CFR 610.12

¹ (kalibrace času nula) $1 \text{ mCi} = 37 \text{ MBq}$

D. Diskuse

Původní způsob značení radionuklidem pro přípravu ^{90}Y -2B8-MX-DTPA používá zvláště pracný a časově náročný purifikační krok vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií pro odstranění volného radionuklidu ^{90}Y z přípravku. Pro zjednodušení tohoto způsobu a jeho lepší proveditelnost při použití na klinickém pracovišti se věnovalo úsilí eliminaci kroku vysokovýkonné kapalinové chromatografie ve prospěch způsobu nazvané „mix-&-shoot“. Cílem je identifikovat podmínky značení radionuklidem, které by vedly k velmi vysoké inkorporaci radionuklidu do konjugátu, čímž se obchází potřeba purifikačního kroku. Zjišťuje se, že více než 95 % radioinkorporace lze dosáhnout při pH 3,6 inkubací po dobu 5 až 10 min. Další výhodou tohoto způsobu je zvýšená retence imunoreaktivity (větší než 70 %), pravděpodobně následkem kratšího času expozice protilátky vysokoenergetickému radionuklidu před přidávkou lidského serumalbuminu, který poskytuje ochranu proti radiolýze. Tato retence imunoreaktivity je výhodná proti retenci pozorované dříve s použitím způsobu vysokovýkonné kapalinové chromatografie.

Stabilitní studie s konjugátem značeným radionuklidem ^{90}Y s použitím způsobu „mix-&-shoot“ a inkubováním ve formulačním pufru (1XPBS s obsahem 75 mg/ml lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA) po dobu 48 h při teplotě 4 °C nevykazují žádnou ztrátu radionuklidu a vykazují úplnou retenci imunoreaktivity. Stabilitní studie prováděné s lidským sérem po dobu 72 h při teplotě 37 °C rovněž ukazují na minimální ztrátu radionuklidu. Tyto výsledky stability jsou srovnatelné s hodnotami pozorovanými dříve s konjugátem značeným způsobem s použitím vysokovýkonné kapalinové chromatografie.

Biologická distribuce u myši BALB/c s použitím konjugátu značeného radionuklidem ^{90}Y připraveného způsobem „mix-&-shoot“ neukazuje žádné neobvyklé ukládání ve tkáních. Tyto výsledky ukazují, že tato protilátka značená radionuklidem se významně nepozměňuje tak, aby se dramaticky ovlivňovaly charakteristiky protilátky in vivo. Výsledky jsou též srovnatelné s výsledky obdrženými dříve s konjugátem značeným radionuklidem s použitím způsobu značení s vysoko-

výkonnou kapalinovou chromatografií (viz BB-IND 4850/4851). Dozimetrické odhady pro „standardního“ (viz BB-IND 4850/4851). Dozimetrické odhady pro „standardního“ člověka o hmotnosti 70 kg vypočítané z údajů biologické distribuce pro myši jsou v souladu s hodnotami obdrženými s konjugátem značeným radionuklidem s použitím způsobu vysokovýkonné kapalinové chromatografie (viz BB-IND 4850/4851). Navíc jsou tyto dozimetrické výsledky srovnatelné s výsledky obdrženými pro pacienty účastníci se klinické studie (IDEC study 1315) při vztažení na jednotku podané aktivity. Pro šest pacientů v této studii jsou střední hodnoty (řady $\pm$ směrodatná odchylka) pro celé tělo, srdce, játra a slezinu $1,40 \pm 0,57$, $10,50 \pm 4,68$, $9,89 \pm 8,91$, respektive $9,75 \pm 6,00$ ($1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ Gy}$).

Před provedením způsobu značení „mix-&-shoot“ pro přípravu ^{90}Y -2B8-MX-DTPA kvality pro klinické použití je třeba vyhodnotit reprodukovatelnost protokolu. Proto se připraví validační šarže s použitím různých šarží chloridu radionuklidu ^{90}Y . Pro těchto 10 připravených šarží se hodnoty imunoreaktivity obdrží s použitím způsobu „mix-&-shoot“ v rozmezí 60,6 až 93,3 % se střední hodnotou 74,5 % a medianem 72,1 %. Tato retekce imunoreaktivity je významně lepší než zhruba 60 % obdržených dříve s použitím běžného způsobu s vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (rozmezí 54,9 až 65,1 %, střední hodnota 60,2 %). Průměrná radioinkorporace pro 10 šarží je 95,7 % (rozmezí 93,5 až 97,5 %). Tato hodnota je srovnatelná s dříve získanou hodnotou pro způsob s vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (rozmezí 91,7 až 93,7 % a střední hodnota 93,1 %). Výsledky ohledně endotoxinu, koncentrace protilátky, koncentrace aktivity, specifické aktivity, celkové aktivity, lahvičky, celkové koncentrace proteinu, pH a sterility jsou pro těchto deset šarží srovnatelné. Souhrn těchto výsledků potvrzuje reprodukovatelnost způsobu „mix-&-shoot“. Navíc se hodnotila variabilita tohoto způsobu vzhledem k různým časům značení provedením reakcí v průběhu 5 a 10 min. Jelikož nebyly zaznamenány pro tyto dva reakční časy žádné významné difference, lze rozhodnout o použití kratšího inkubačního času v konečném protokolu.

E. Souhrn

Původci tohoto vynálezu vyvinuli způsob značení nazývaný způsobem „mix-&-shoot“ pro přípravu klinických dávek konjugátu 2B8-MX-DTPA značeného radionuklidem ^{90}Y , který obchází nutnost v současné době používaného kroku vysokovýkonné kapalinové chromatografie pro odstranění volného radionuklidu. Tento zjednodušený z způsob eliminuje tento pracný purifikační krok při udržování vysoké hladiny inkorporace radionuklidu ($>95\%$) a zlepšené retence imunoreaktivity ($>70\%$). Tento klinicky formulovaný konjugát značený radionuklidem je stabilní in vitro při inkubaci při teplotě 4°C po dobu 48 h na základě retence radionuklidu a imunoreaktivity. Navíc je tento konjugát stabilní při inkubaci v lidském krevním séru při teplotě 37°C po dobu 72 h. Studie biologické distribuce u myši BALB/c neukazují žádné neobvyklé ukládání ve tkáních včetně kostí. Odhady radiačních absorbovaných dávek pro „standardního“ člověka o hmotnosti 70 kg se srovnávají s údaji obdrženými v klinické studii s použitím konjugátu 2B8-MX-DTPA značeného radionuklidem ^{90}Y . Výsledky těchto studií ukazují, že konjugát 2B8-MX-DTPA značený radionuklidem ^{90}Y získaný způsobem „mix-&-shoot“ je srovnatelný přípravkem obdrženým s použitím konvenčního způsobu s vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií. Validace způsobu pro použití ve větším měřítku pro přípravu konjugátu značeného radionuklidem kvality pro klinické použití ukazuje, že tento způsob je reprodukovatelný a že tento přípravek je srovnatelný s přípravkem získaným s použitím běžného způsobu s vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií. Výsledky těchto preklinických studií ukazují, že tento nový způsob „mix-&-shoot“ lze použít pro přípravu konjugátu 2B8-MX-DTPA značeného radionuklidem ^{90}Y pro použití v klinických zkouškách.

Příklady provedení vynálezu

Podrobný popis preferovaných ztělesnění

Příklad 1. Inkorporace radionuklidu – soupravy a eseje

I. Souhrn

5 Jedním ze záměrů tohoto vynálezu je poskytnout způsoby značení soupravy radionuklidem pro přípravu konjugátu 2B8–MX–DTPA značeného radionuklidem ^{111}In a ^{90}Y (In2B8 respektive Y2B8) a stanovit specifikace pro vypuštění těchto klinických přípravků. Způsoby značení souprav radionuklidem jsou reprodukovatelné vzhledem k inkorporaci radionuklidu a vazby antigen–pozitivních SB buněk a ukazují na vhodnost souprav pro značení radionuklidem pro použití
10 v těchto klinických zkouškách. Doporučuje se, aby specifikace pro vypuštění činily pro In2B8 a Y2B8 $\geq 95\%$ respektive $\geq 70\%$ inkorporace nuklidu a vazby.

II. Úvod

15 Myší monoklonální protilátka (Y2B8) proti CD20 značená radionuklidem ^{90}Y se v současné době hodnotí v klinických zkouškách pro léčení relapsu B–buněčného lymfomu. Radionuklid yttria postrádá složku gama, takže je nevhodný pro zobrazovací systémy. Proto se pro hodnocení lokalizace tumoru a dozimetrie u pacientů před nebo po léčení s terapeutickým prostředkem značeným yttriem používá konjugát 2B8–MX–DTPA (In2B8) značený radionuklidem ^{111}In . V současné době se používají způsoby přípravy Y2B8 a In2B8 nazývané jako způsoby „mix–&–shoot“ a poskytují protilátky značené radionuklidem vhodné pro klinické studie. Avšak zjednodušení
20 způsobu značení by znamenalo možnost přípravy dávky na klinickém pracovišti.

Nová souprava pro značení radionuklidem se přednostně skládá ze 4 složek:

- 25 1) 2B8–MX–DTPA ve fyziologickém roztoku o nízkém obsahu kovů, 2 mg/ml,
- 2) 50mM roztok octanu sodného používaný pro úpravu roztoku radionuklidu na pH 3 vhodné pro značení,
- 30 3) formulační pufr (1X PBS, pH 7,4, obsahující 7,5 % lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA),
- 4) prázdná skleněná lahvička o obsahu 10 ml (reakční lahvička). Veškeré složky se testují ohledně sterility a nepřítomnosti pyrogenů.
- 35 Tato zpráva shrnuje validaci této soupravy pro značení radionuklidem, kterou lze jednoduše a snadno používat a která poskytuje protilátky značené radionuklidy s inkorporací radionuklidů $\geq 95\%$ a s přijatelným zachováním vazby na antigen–pozitivní buňky. Doporučuje se vypuštění zkušebních specifikací pro klinické produkty.

III. Materiály a způsoby inkorporace radionuklidů

A. Prostředky v soupravě pro značení radionuklidy

- 45 1. 2B8–MX–DTPA, IDEC, šarže# 082395RM2
2. 50 mM roztok octanu sodného o nízkém obsahu kovů, IDEC, šarže # 082395RM3
3. Formulační pufr (1X PBS, pH 7,4, obsahující 7,5 % (hmotnost/objemem) lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA), IDEC, šarže# 082395RM1
- 50 4. Reakční lahvička 10 ml, IDEC

B. Materiály a zařízení

55

1. Souprava pro kontrolu inkorporace radionuklidu Biodex Tec-Control Radioincorporation Kit, Cat# 151-770

2. Rukavice: prosté prášku

3. Sterilní polypropylenové injekční stříkačky

4. Sterilní jehly pro injekční stříkačky

5. Malé zkumavky s uzávěrem, 1,5 ml

C. Způsoby provedení

1. Příprava Y2B8 a In2B8 s použitím soupravy pro značení radionuklidů

Prostředky v soupravě se připraví a plní do skleněných lahvíček se zátkou. Borosilikátové lahvičky typu I (2 nebo 10 ml) se propláchnou sterilní vodou pro injekce (WFI) a před plněním se autoklávuji. Butylkaučukové zátky se opláchnou sterilní vodou pro injekce a před použitím autoklávuji. Použité látky se plní ručně a zalemují v místnosti třídy 100 a testují ohledně přítomnosti pyrogenů a sterility s použitím způsobů USP.

a. Příprava In2B8

Prostředky

1. Radionuklid ^{111}In ve formě chloridu, beznosičový, v kyselině chlorovodíkové.

Upozornění

1. Veškeré kroky se přednostně provádějí s použitím aseptických způsobů.

2. Složky soupravy pro značení radionuklidů je třeba před použitím temperovat na teplotu místnosti.

3. Konečný produkt je třeba podávat pacientovi v průběhu 8 h od ukončení kroku 9 níže.

Způsob značení In2B8

Způsob provedení

1. Objem roztoku $^{111}\text{InCl}_3$ se přidá do reakční nádoby podle následujícího výpočtu:

a. Koncentrace radioaktivity v době značení radionuklidem v mCi/ml (1 mCi = 37 MBq)

C_0 = koncentrace radioaktivity v době kalibrace (viz výrobcovo osvědčení o analýze).

Delta t = změna času (pozitivní hodnota je po kalibraci, negativní hodnota před kalibrací).

Koncentrace radioaktivity v době značení =

$$= \frac{C_0}{e^{0,0103 (\text{delta nt})}}$$

b. Objem $^{111}\text{InCl}_3$, který se přidává do reakční lahvičky

- 203 MBq (5,5 mCi)
 ————— = objem přidávaný do reakční lahvičky
 koncentrace radioaktivity
 v době značení
2. Objem 50 mM roztoku octanu sodného pro přidání do reakční lahvičky se vypočítá následujícím způsobem:
- Přidaný objem $^{111}\text{InCl}_3$ (krok 1b) x (1,2) = objem 50 mM octanu sodného pro přidání.
3. Zátka reakční lahvičky a lahvička pro 50 mM octanu sodného se otřou alkoholem. Do reakční lahvičky se převede pomocí injekční stříkačky o obsahu 1 ml vypočítaný objem 50 mM roztoku octanu sodného (krok 2).
4. Zátka lahvičky se $^{111}\text{InCl}_3$ se otře alkoholem. Lahvička se odvzdušní jehlou opatřenou sterilním filtrem 0,2 μm . S použitím sterilní injekční stříkačky se požadovaný objem (krok 1b) roztoku $^{111}\text{InCl}_3$ přenesse do reakční lahvičky. Lahvička se několikrát zamíchá převrácením.
5. Zátka lahvičky 2B8–MX–DTPA se otře alkoholem. S použitím injekční stříkačky o obsahu 1 ml se do reakční lahvičky pomalu přenesse 1,0 ml 2B8–MX–DTPA. Lahvička se zamíchá tím, že se několikrát převrátí.
6. Reakce se nechá probíhat po dobu 30 min $\pm$ 5 min při teplotě okolí.
7. Celkový objem reakční směsi se vypočítá sečtením objemu $^{111}\text{InCl}_3$ pro přidání (krok 4), objemu 50 mM roztoku octanu sodného pro přidání (krok 3) a objemu 2B8–MX–DTPA pro přidání (krok 5).
8. Do reakční lahvičky se přidá objem formulačního pufru pro obdržení konečného objemu 10 ml, vypočítaný odečtením celkového vypočítaného množství v kroku 7 od 10.
9. Lahvička s formulačním pufrem se otře alkoholem a odvzdušní se. Vzhledem k viskozitě formulačního pufru se lahvička odvzdušňuje s použitím jehly opatřené filtrem pro injekční stříkačky 0,2 μm . S použitím sterilní injekční stříkačky o objemu 10 ml opatřené příslušnou jehlou pro odměřování se do reakční lahvičky přenesse objem formulačního pufru vypočítaný v kroku 8. Odvzdušňovací jehla se z reakční lahvičky odstraní a lahvička se promíchá několikanásobným převrácením (konečný produkt). Tato lahvička se inkubuje po dobu alespoň 5 min před provedením „Eseje inkorporace radionuklidu“. Zbarvení roztoku je jantarové a lahvička je plná, což potvrzuje přidání formulačního pufru.
10. Celková aktivita lahvičky s konečným produktem se změří s použitím příslušné měřicí soupravy pro měření radionuklidu ^{111}In .
11. Konečný produkt se ihned uloží při teplotě 2 až 8 °C pro „Imunoesej“ a „Esej inkorporace radionuklidů“.
- b. Příprava Y2B8
- Přídavné prostředky:
1. Radionuklid ^{90}Y ve formě chloridu, beznosičový, v kyselině chlorovodíkové.

Upozornění:

1. Veškeré kroky je třeba provádět aseptickým způsobem.

5 2. Součásti soupravy pro značení radionuklidem je třeba před použitím temperovat na teplotu místnosti.

3. Produkt je třeba podávat pacientovi v průběhu 8 h od ukončení kroku 8 níže.

10 Způsob značení Y2B8 radionuklidem

1. Objem roztoku $^{90}\text{YCl}_3$ pro přidání do reakční lahvičky se vypočítá následujícím způsobem:

a. Koncentrace radioaktivity v době značení radionuklidem:

15 C_0 = koncentrace radioaktivity v době kalibrace (viz výrobcovo osvědčení o analýze).

Delta t = změna času (pozitivní hodnota je po kalibraci, negativní hodnota před kalibrací).

20 Koncentrace radioaktivity v době značení =

$$= \frac{C_0}{e^{0,0108 (\text{delta } t)}}$$

25 b. Objem $^{90}\text{YCl}_3$, který se přidává do reakční lahvičky

$$\frac{1665 \text{ MBq (45 mCi)}}{\text{koncentrace radioaktivity v době značení}} = \text{objem přidávaný do reakční lahvičky}$$

30

2. Objem 50 mM octanu sodného přidávaný do reakční lahvičky se vypočítá následujícím způsobem:

35 a. Pro $^{90}\text{YCl}_3$ v 0,040M roztoku kyseliny chlorovodíkové (Amersham):
Objem roztoku $^{90}\text{YCl}_3$ (krok 1b) x (0,8) = objem přidávaného octanu sodného.

b. Pro $^{90}\text{YCl}_3$ v 0,050M roztoku kyseliny chlorovodíkové (Nordion):
Objem $^{90}\text{YCl}_3$ (krok 1b) x (1,0) = objem roztoku octanu sodného pro přidání.

40

3. Zátky reakční lahvičky a lahvičky s roztokem octanu sodného se otřou alkoholem. S použitím injekční stříkačky o obsahu 1 ml se do reakční lahvičky přenesou vypočítaný objem (krok 1a nebo 1b) 50 mM roztoku octanu sodného (krok 2). Lahvička se zamíchá několikanásobným převrácením.

45

4. Zátka lahvičky s roztokem radionuklidu $^{90}\text{YCl}_3$ se otře alkoholem. Propíchne se jehlou opatřenou sterilním filtrem 0,2 μm . S použitím sterilní injekční stříkačky 1 ml se nasaje požadovaný objem (krok 1b) $^{90}\text{YCl}_3$ pro přenesení do reakční lahvičky. Lahvička se zamíchá několikanásobným převrácením.

50

5. Zátka lahvičky 2B8–MX–DTPA se otře alkoholem. S použitím injekční stříkačky o obsahu 3 ml se přenesou 1,5 ml roztoku 2B8–MX–DTPA do reakční lahvičky. Lahvička se zamíchá několikanásobným převrácením.

6. Celkový objem reakční směsi se vypočítá jako součet množství přidaného roztoku ^{90}Y ve formě chloridu (krok 4), množství přidaného 50 mM roztoku octanu sodného (krok 3) a množství přidaného 2B8–MX–DTPA (krok 5).

5 7. Objem formulačního pufru pro přidání do reakční nádoby pro obdržení konečného objemu 10 ml se vypočítá odečtením celkového reakčního objemu vypočítaného v kroku 6 od 10.

8. Lahvička s formulačním pufrem se otře alkoholem a odvzdušní se. Vzhledem k viskozitě formulačního pufru se použije jehla opatřená filtrem pro injekční stříkačky 0,20 μm . S použitím sterilní stříkačky o obsahu 10 ml opatřené příslušnou jehlou pro odměřování se objem formulačního pufru vypočítaný v kroku 7 přenese do reakční lahvičky. Odvzdušňovací jehla se z reakční lahvičky odstraní a lahvička se zamíchá několikanásobným převrácením (konečný produkt). Lahvička se před provedením esejí inkorporace radionuklidu inkubuje alespoň po dobu 5 min. Zbarvení roztoku je jantarové a reakční lahvička je plná, čímž lze ověřit přidání reakčního pufru.

15 9. Celková aktivita lahvičky s konečným produktem se změří s použitím příslušného přístroje pro měření radionuklidu ^{90}Y .

10. Konečný produkt se ihned uloží při teplotě 2 až 8 °C do doby použití pro podání pacientovi.

20 11. Testování imunoreaktivity:

S použitím injekční stříkačky o obsahu 1 ml se z reakční lahvičky odebere asepticky objem 0,1 ml a přenese se do samostatné zkumavky se šroubovacím uzávěrem 1,5 ml. Tato zkumavka se ihned uloží při teplotě 2 až 8 °C pro použití při „Imunoeseji“ a „Eseji inkorporace radionuklidu“.

30 Validace způsobů značení soupravy radionuklidem se provádí v IDEC Pharmaceuticals (San Diego, CA), MD Anderson Health Center (Houston, TX), Mayo Clinic (Rochester, MN) a City of Hope (Duarte, CA). Veškeré součásti soupravy včetně 2B8–MX–DTPA kvality pro klinické použití se připraví za podmínek dobré výrobní praxe IDEC Pharmaceuticals (Good Manufacturing Conditions according to the Code of Federal Regulations) a stanoví se sterilita a nepřítomnost pyrogenů.

35 Protilátky značené radionuklidem se formulují v 1X PBS s obsahem 7,5 % (hmotnost/objemem) lidského serumalbuminu (HSA, kvality pro klinické použití, Bacter–Hyland) a 1 mM roztoku DTPA. Výsledky zkoušky pro vypuštění výrobku prováděné při každé validační šarži se popisují níže.

40 Šest validačních šarží, každá s In2B8 a Y2B8, připraví pět operátorů. Tyto šarže se označí následujícím způsobem a testují v následujících zařízeních:

In2B8:

- #1: IDEC Pharmaceuticals
- 45 #2: IDEC Pharmaceuticals
- #3: IDEC Pharmaceuticals
- #4: MD Anderson Health Center
- #5: Mayo Clinic
- #6: City of Hope

50

Y2B8

- #1: IDEC Pharmaceuticals
- #2: IDEC Pharmaceuticals
- #3: IDEC Pharmaceuticals

- #4: MD Anderson Health Center
 #5: Mayo Clinic
 #6: City of Hope

5 2. Příprava lyofilizovaných SB buněk a HSB buněk

Lidské buněčné linie SB (CD20–pozitivní) a HSB (CD–negativní) se obdrží od American Type Culture Collection a pěstují v T–baňkách s použitím RPMI–16040 s obsahem 10% fetálního bovinního séra s dodatkem 2 % glutaminu. Kultury se udržují při teplotě 37 °C za přítomnosti 5 % oxidu uhličitého. Buňky se obvykle štěpí 1:2 každý den a sbírají při množství 0,5 až 2,5 x 10⁶ buněk/ml a životnosti >80 %. Buněčné koncentrace se stanoví s použitím hemocytometru a životnost se stanoví vylučováním trypanové modři.

Buňky se sbírají při teplotě okolí a buněčné hustotě 0,5 až 2 x 10⁶ buněk/ml centrifugací (1300 min⁻¹, v Sorvallově centrifuze) a promyjí se dvakrát 1X HBSS. Peletované buňky se resuspendují na koncentraci 50 x 10⁶ buněk/ml v 1X HBSS obsahujícím 1 % (hmotnost/objemem) bovinního serumalbuminu (BSA) a 10 % (hmotnost/objemem) mannitolu (lyofilizační pufr), 0,5 ml se přiděluje do polypropylenových mikrocentrifugačních zkumavek o obsahu 1,5 ml opatřených těsnicím O–kroužkem a ukládají se při teplotě –70 °C a lyofilizují přes noc při tlaku 4 až 8 Pa. Zkumavky s lyofilizovanými buňkami se ukládají vysušené při teplotě 2 až 8 °C a pro eseje se rekonstituují sterilní vodou. Zkumavky s lyofilizovanými buňkami se ukládají s vysoušecím prostředkem.

25 3. Analytické eseje

Analytické způsoby používané pro validační šarže In2B8 a Y2B8 se popisují níže. S každou validační šarží se provádějí následující validace:

30 1. Imunoesej s použitím lyofilizovaných SB buněk

2. Esej inkorporace radionuklidu do Y2B8/In2B8 s použitím soupravy Biodex Kit

a. Imunoesej

Vazbu v procentech vyhodnotí každý operátor s použitím lyofilizovaných CD20 pozitivních SB buněk podle následujících způsobů pro In2B8 a Y2B8. Tyto eseje poskytují rychlý a účinný způsob ověření toho, že protilátka označená radionuklidem stále rozpoznává CD20 jako antigen. Na jednom klinickém pracovišti se též hodnotí CD20–negativní HSB buňky. Lyofilizované buňky se připraví a ukládají podle výše popsaného způsobu „Příprava lyofilizovaných SB a HSB buněk“.

i. Imunoesej In2B8

Přídavné prostředky:

45 1. ¹¹¹In–2B8–MX–DTPA.

2. Lyofilizované SB buňky, tři zkumavky obsahující 25 x 10⁶ buněk/zkumavka.

3. Lyofilizované HSB buňky, tři zkumavky obsahující 25 x 10⁶ buněk/zkumavka.

4. Sterilní voda pro irigaci nebo sterilní voda pro injekce.

5. Zřed'ovací pufr (1X PBS, pH 7,2 až 7,4 s obsahem 1 % bovinního serumalbuminu (BSA) a 0,02 % azidu sodného, filtrovaný filtrem 0,2 μm a ukládání při teplotě místnosti.

6. Skleněné či plastové zkumavky pro měření četnosti impulzů.

Způsob provedení

5 Uspořádání eseje (neradioaktivní část)

1. Obdrží se tři zkumavky s lyofilizovanými SB a HSB buňkami.

10 2. Do každé zkumavky se přidá 0,50 ml SWFI (sterilní vody pro injekce) a zkumavky se míchají vířivým pohybem do obdržení homogenních suspenzí.

3. Čtyři prázdné mikrocentrifugační zkumavky obsahu 1,5 ml. Do tří ze zkumavek se přidá 0,50 ml zředovacího pufru představujícího kontrolu bez buněk.

15 4. Do další mikrocentrifugační zkumavky o obsahu 1,5 ml se přidá 0,909 ml zředovacího pufru a tato zkumavka se označí 1:100.

5. Opatří se sterilní polypropylenová zkumavka obsahu 50 ml se závěrem a přidá se do ní 10 ml zředovacího pufru.

20

Uspořádání eseje (radioaktivní část)

1. Obdrží se protilátka označená radionuklidem ukládaná při teplotě 2 až 8 °C.

25 2. Objem 0,01 ml se odebere pomocí P20 a přidá do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky obsahující 0,99 ml zředovacího pufru (zředění 1:100). Špička se opláchne a zkumavka se jemně míchá vířivým pohybem.

30 3. Objem 0,20 ml se nasaje pomocí P200 ze zkumavky o zředění 1:100 a přidá se do kónické zkumavky obsahující 10 ml zředovacího pufru. Zkumavka se důkladně promíchá.

Způsob provedení eseje

35 1. Do všech zkumavek se přidá objem 0,50 ml zředěného konjugátu $^{111}\text{In}2\text{B8-MX-DTPA}$.

2. Závěry se bezpečně utáhnou na všech zkumavkách a zkumavky se promíchávají nepřetržitě po dobu 60 min.

40 3. Po 60 min inkubace při teplotě okolí se veškeré zkumavky centrifugují po dobu 5 min, alespoň při 2000 g.

4. Objem 0,75 ml každého supernatantu se přenese do zkumavek příslušných pro přístroj pro měření četnosti impulzů.

45 5. Radioaktivita ve zkumavkách se měří s použitím čítače gama s opravou na pozadí.

ii. Imunoesej Y2B8

Přídavné prostředky

50

1. ^{90}Y -2B8-MX-DTPA

2. Lyofilizované SB buňky

55 3. Sterilní voda pro irigace nebo sterilní voda pro injekce

4. Diluční pufr (1X PBS, pH 7.2 až 7.4 s obsahem 1 % bovinního serumalbuminu (BSA) a 0,02 % azidu sodného

5 Způsob provedení:

Příprava vzorku protilátky označené radionuklidem

1. Obdrží se protilátka označená radionuklidem ukládaná při teplotách 2 až 8 °C.

10

2. Nasaje se objem 10 μ l pomocí P20 a přidá se do mikrocentrifugační zkumavky obsahu 1,5 ml obsahující 990 μ l zředovacího pufru (zředění 1:100). Špička se opláchne a zkumavka se mírně míchá vířivým pohybem.

15

3. Použije se sterilní polypropylenová zkumavka obsahu 50 ml se závěrem a přidá se do ní 10 ml zředovacího pufru s použitím serologické pipety 10 ml.

4. Nasaje se objem 35 μ l pomocí P200 ze zkumavky o ředění 1:100 a přidá se do kónické zkumavky obsahující 10 ml zředovacího pufru. Důkladně se promíchá.

20

Příprava lyofilizovaných buněk.

1. Obdrží se tři zkumavky lyofilizovaných SB buněk.

25

2. Do každé zkumavky se přidá objem 0,5 ml sterilní vody pro injekce (SWFI) a zkumavky se míchají vířivým pohybem do obdržení jednotlivých buněčných suspenzí.

3. Použijí se tři prázdné mikrocentrifugační zkumavky o obsahu 1,5 ml. Do těchto tří zkumavek se přidá zředovací pufr představující kontrolu bez buněk.

30

Způsob provedení eseje

1. Objem 0,5 ml zředěného konjugátu ^{90}Y -2B8-MX-DTPA se přidá do každé zkumavky.

35

2. Zkumavky se umístí do míchačky na dobu 45 min po ověření, že jsou uzávěry bezpečně utaženy.

3. Po 45 min inkubace při teplotě okolí se buňky peletují mikrocentrifugací po dobu 5 min.

40

4. Objem supernatantu 0,8 ml se přenese do scintilačních lahvíček.

5. Přidá se scintilátor do každé lahvičky.

6. Aktivita v každé lahvičce se stanoví s použitím scintilačního čítače s korekcí na pozadí.

45

b. Esej radioinkorporace

Procento inkorporovaného radionuklidu se stanoví chromatografií na předem připravené tenké vrstvě s použitím soupravy Biodex Tec-Control Radiochromatographic Kit podle následujícího způsobu provedení.

50

Přídavné prostředky a zařízení:

1. Konjugát 2B8-MX-DTPA značený radionuklidy ^{111}In nebo ^{90}Y

55

2. Zkumavky pro měření četnosti impulzů radioaktivních pásů z chromatografie na tenké vrstvě

3. Nůžky

4. Sterilní injekční stříkačka, 1 ml

5. Sterilní jehly, 26G

6. Čítač gama nebo scintilační počítáč

7. Pipetovací zařízení

Způsob provedení:

1. Nejprve je třeba přečíst celou příručku Biodex Operation Manual.

2. Každý vzorek označený radionuklidem se testuje třikrát podle instrukcí soupravy, vyvíjí se jeden pás na lahvičku.

3. Pro nanesení vzorku označeného radionuklidem na chromatografický pás se použije pipetovací zařízení a nanese se 1 μ l na čáru startu. Alternativně se malá kapka nanáší z jehly 26G připojené ke sterilní stříkačce 1 ml.

4. Změří se četnost impulzů každé sekce s použitím příslušného čítače, například čítače gama pro ^{111}In a scintilačního čítače pro ^{90}Y s korekcí na pH.

5. Dodržují se instrukce pro výpočet procenta protilátky označené radionuklidem.

IV. Výsledky

Výsledky testování každé validační šarže In2B8 nebo Y2B8 se shrnují v tabulkách 38 a 39.

Tabulka 38

Validace výsledků pro vypuštění přípravku Y2B8

Číslo šarže	% radioinkorporace	% vazby
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

Střední hodnota = 98,8

Střední hodnota = 82,3

Směrodatná odchylka = 1,24

Směrodatná odchylka = 3,4

% CV = 1,25 %

CV = 4,2 %

Tabulka 39

Validace výsledků pro vypuštění přípravku In2B8

Validace výsledků pro vypuštění přípravku In2B8

Číslo šarže	% radioinkorporace	% vazby
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	96,3	83,0

5

Střední hodnota = 99,0 Střední hodnota = 85,2
 Směrodatná odchylka = 0,43 Směrodatná odchylka = 2,06
 % CV = 0,45 % CV = 2,42 %

10 V. Diskuse a závěry

Pro zjednodušení současných způsobů značení radionuklidem pro In2B8 a Y2B8 byla vyvinuta čtyřsložková souprava. Koncentrace octanu sodného a 2B8-MX-DTPA se snižují na 50 mM respektive 2 mg/ml pro umožnění přenosu přesných objemů s použitím injekčních stříkaček. Veškeré složky soupravy se přednostně plní do skleněných lahvíček se zátkou a testují ohledně sterility a pyrogenity způsobem IDEC před vypuštěním, čímž se eliminuje nutnost provádění těchto testů na klinických pracovištích. Na pracovišti se veškeré manipulace s reakčním prostředkem provádějí s použitím sterilních stříkaček a jehel. Proto dodržení aseptických způsobů běžně prováděných v radiofarmaceutickém prostředí zaručuje, že protilátky označené radionuklidem a formulované jsou vhodné pro podání pacientům.

Reprodukovatelnost a kompaktnost způsobů provedení značení radionuklidem pro In2B8 a Y2B8 se hodnotí provedením několika validací s použitím různých šarží každého radionuklidu. Pro šest validačních šarží připravené In2B8 je vazba v rozmezí od 82,1 do 86,8 % s průměrem 85,1 %, hodnoty inkorporace radionuklidu jsou zhruba 99 % (rozmezí 98,3 až 99,4 %). Pro šest validačních šarží připravené Y2B8 je procento vazby v rozmezí od 78,6 do 87,0 %, průměr 82,3 %. Hodnoty inkorporace radionuklidu pro Y2B8 jsou v průměru 98,8 % (rozmezí od 96,3 do 99,5 %). Tyto výsledky v souhrnu ověřují reprodukovatelnost a kompaktnost způsobů značení souprav radionuklidem pro přípravu obou protilátek In2B8 a Y2B8. Na základě těchto validačních výsledků se doporučuje stanovit specifikace pro vypuštění přípravku ohledně radioinkorporace a vazby jako ≥ 95 respektive ≥ 70 % pro In2B8 a Y2B8.

Navíc vzhledem ke zvýšené snadnosti použití a snížené možnosti chyb v průběhu přípravy se doporučuje použít na klinických pracovištích lyofilizované CD20-pozitivní buňky pro ověření procenta vazby a inkorporace radionuklidu.

V souhrnu všechny tyto výsledky ukazují, že In2B8 a Y2B8 připravené s použitím soupravy pro značení radionuklidem jsou vhodné pro použití v klinickém prostředí. Navíc se zjišťují pro obě protilátky značené radionuklidem specifikace pro vypuštění odrážející výsledky několika validací provedených pěti různými operátory.

Příklad 2

Inkorporace radionuklidu a vazba – soupravy a eseje

I. Souhrn

Myší monoklonální protilátka proti CD20 označená 2B8 se klonuje v buňkách CHO s obdržením
 10 vysoce expresní buněčné linie. Specifičnost protilátky odvozené od CHO pro CD20–pozitivní
 lidské buňky se demonstruje analýzou FACS a kompetitivní vazbou. Vazba na lidské T–buňky je
 zanedbatelná. Afinity protilátky k CD20–pozitivním buňkám se stanoví kompetitivní imunoesejí
 a činí $1,3 \times 10^{10}$ M. Protilátka reaguje s chelatotvorným prostředkem MX–DTPA s vytvořením
 15 konjugátu 2B8–MX–DTPA se zanedbatelnou ztrátou imunoreaktivity (hodnota afinity
 $4,4 \times 10^{-10}$ M). Optimální konjugace chelatotvorného prostředku, jak se stanoví měřením
 inkorporace radionuklidu ^{111}In , se dosahuje po 6 h reakce. Způsoby značení radionuklidem
 konjugátu 2B8–MX–DTPA se optimalizují pro ^{90}Y nebo ^{111}In vzhledem k pH a inkubačnímu
 20 času pro zajištění maximální inkorporace radionuklidu ($\geq 95\%$) a retence imunoreaktivity
 ($\geq 75\%$). Specifikace pro vypuštění přípravků In2B8 a Y2B8 s použitím 2B8–MX–DTPA odvo-
 zeného od CHO v klinických zkouškách se doporučují jako $\geq 95\%$ pro inkorporaci radionuklidu
 a $\geq 75\%$ pro vazbu na lyofilizované a rekonstituované CD20–pozitivní lidské buňky. Celkem
 tyto výsledky ukazují na vhodnost 2B8–MX–DTPA odvozeného od CHO pro použití
 v klinických zkouškách.

II. Úvod

25 Protilátka 2B8 používaná dříve se připravuje v bioreaktorech s dutými vlákny. Pro snížení výro-
 bních nákladů se tato protilátka klonuje a exprimuje v buňkách CHO s obdržením vysokoexpresní
 produkční buněčné linie. Tento příklad popisuje výsledky charakterizace in vitro protilátky odvo-
 zené od CHO 2B8 a konjugované protilátky (2B8–MX–DTPA) a přípravků značených radio-
 30 nuklidy ^{90}Y a ^{111}In obdržených s použitím klinických způsobů značení souprav radionuklidem.

III. Materiály a způsoby provedení

A. Reakční prostředky

35 Lidské buněčné linie SB (CD20–pozitivní) a HSB (CD20–negativní) se obdrží od American
 Type Culture Collection a pěstují v T–baňkách s použitím RPMI–1640 obsahujícího 10 % fetál-
 ního bovinního séra s přídavkem 2 % glutaminu. Kultury se udržují při teplotě 37 °C za přítom-
 nosti 5 % oxidu uhličitého. Buňky se obvykle štěpí 1:2 každý druhý den a sbírají při hodnotě 0,5
 40 až $2,5 \times 10^6$ buněk/ml a životnosti $>80\%$. Koncentrace buněk se stanoví s použitím hemocytomet-
 ru a životnost se stanoví vylučováním trypanové modři. Specifické údaje o šaržích buněk se
 zaznamenávají v Notebook # 1553 a v pořadači nazvaném „Cell Activity Logbook 1995 &
 1996“, autor Ron Morena.

45 2B8 odvozená od CHO se připravuje za podmínek dobré výrobní praxe ve výrobním zařízení
 IDEC. Protilátka se formuluje v normálním fyziologickém roztoku o nízkém obsahu soli při kon-
 centraci 11,5 mg/ml. Homogenita protilátek se stanovuje způsobem SDS–PAGE. Konjugát 2B8–
 MX–DTPA se připravuje za podmínek dobré laboratorní praxe podle PSBR–043 z 2B8 odvozené
 od CHO a formuluje se ve fyziologickém roztoku o nízkém obsahu kovů při koncentraci 2 mg/ml
 50 (šarže 0165A a 0165B).

^{111}In ve formě chloridu inditého kvality pro farmaceutické použití se obdrží od Amersham (U.K.)
 nebo Cyclotron Products Inc. (Coral Gables, FL). ^{90}Y ve formě chloridu yttritého se obdrží od
 Amersham (U.K.), Nordion International (Kanatta, Canada) nebo Pacific Northwest National
 55 Laboratory (Richland, WA). MX–DTPA připravený za podmínek dobré výrobní praxe se obdrží

od Hauser Chemical (Boulder, CO). Vápenatotrojsodná sůl kyseliny diethylentriaminpentaoctové (DTPA) se obdrží od Heal (Berlin, Německo). TAG-NHS se obdrží od IGEN Inc. (Rockville, MD). Myší protilátka proti CD19 se obdrží od Dynal Inc. (Lake Success, NY). Kozí protilátka proti myší F(ab')₂ označená FITC se obdrží od Jackson ImmunoResearch.

Reakční prostředky vyžadující odstranění kontaminace těžkými kovy se zpracují vsádkovým způsobem s Chelax 100 (BioRad Industries) nebo s chelatotvornou sefárovou (Pharmacia) průchodem roztoků sloupcem. Zásobní roztoky o nízkém obsahu kovů se zředí sterilní vodou pro irigace (SWFIr). Roztoky se ukládají ve sterilních plastových nádobách.

Další reakční prostředky se popisují níže pro konkrétní způsoby.

B. Materiály a zařízení

1. Original Analyzer, IGEN Inc. Model # 1100–1000, IDEC #1492

2. Scintilační počítač Top-Count, Packard, Model #A9912, IDEC #1329

3. Čítač gama, Isodata, Model #20–10, IDEC #0628

4. Souprava Tec-Control Radiochromatographic Kit, Biodex, Model #151–770

5. Lyofilizační zařízení, Virtis, Model Freezemobile 12, IDEC #0458.

Další látky a zařízení se popisují pro konkrétní způsoby.

C. Způsoby provedení

1. Příprava lyofilizovaných SB a HSB buněk

Buňky se pěstují, jak se popisují výše, a sbírají se při teplotě okolí, při hustotě buněk 0,5 až 2×10^6 buněk/ml centrifugací (frekvence otáčení 1300 min^{-1} v Sorvallově centrifuze) a promyjí se dvakrát 1X HBSS. Peletované buňky se resuspendují na koncentraci 50×10^6 buněk/ml v 1X HBSS s obsahem 1 % (hmotnost/objem) bovinního serumalbuminu (BSA) a 10 % (hmotnost/objem) mannitolu (lyofilizační pufr), po 0,5 ml se přidá do polypropylenových mikrocentrifugačních zkumavek o obsahu 1,5 ml s těsnícím O-kroužkem a tyto zkumavky se ukládají při teplotě -70°C a lyofilizují se přes noc při tlaku 4 až 8 Pa. Zkumavky s lyofilizovanými buňkami se ukládají vysušené při teplotách 2 až 8°C a rekonstituují se pro eseje ve sterilní vodě. Zkumavky s buňkami lyofilizovanými v mikrocentrifugačních zkumavkách se uchovávají spolu s vysoušecím prostředkem.

2. Imunoesej FACS

Přímá vazba protilátek na lidské B–buňky se stanoví průtokovou cytometrií. Vzárustající koncentrace protilátky se inkubují v 1X PBS, pH 7,2, s obsahem 1 % (hmotnost/objem) bovinního serumalbuminu (vazebný pufr) s 5×10^6 CD20–pozitivních (SB) nebo CD20–negativních (HSB) buněk po dobu 30 min na ledu. Buňky se promyjí centrifugací, resuspendují ve vazebném pufru a inkubují s kozí protilátkou proti myší F(ab')₂ označené FITC po dobu 30 min na ledu. Po inkubaci se sekundárním reakčním prostředkem se buňky promyjí centrifugací a resuspendují v 1X PBS s obsahem 1,1 objemových % formaldehydu pro fixaci buněk. Střední hodnota intenzity fluorescence se stanoví průtokovou cytometrií.

3. Kompetitivní imunoeseje

Imunoreaktivita 2B8 a 2B8–MX–DTPA se stanoví kompetitivní vazbou na CD20–pozitivní SB buňky s použitím elektrochemiluminiscenčního způsobu Origen (Leland a Powell). SB–buňky v log–fázi se sbírají z kultury a promyjí dvakrát 1X HBSS. Buňky se zředí v 1X PBS, pH 7,2, s obsahem 1 % (hmotnost/objem) bovinního serumalbuminu. V některých experimentech se použijí lyofilizované buňky po rekonstituci sterilní vodou.

Indikátorová protilátka označená rutheniem se připraví inkubací 2B8 odvozené od CHO (šarže 165) v 1X PBS, pH 7,2, s N–hydroxysukcimidesterem ruthenium(II) tris–bipyridinového chelatotvorného prostředku (TAG–NHS) při molárním poměru TAG–NHS k protilátce 15:1. Po 1 h inkubace při teplotě prostředí s ochranou proti světlu se reakce ukončí glycinem v průběhu 10 min. Nezreagovaný TAG se odstraní permeační chromatografií s použitím sloupce Pharmacia PD–10 v rovnováze s 1X PBS. Koncentrace proteinu se stanoví Bradfordovou proteinovou esejí. Inkorporace TAG se stanoví měřením absorbance při vlnové délce 455 nm. Vypočítaný molární poměr TAG k proteinu je 3,0.

Eseje se provedou v polypropylenových zkumavkách 12 x 75 mm. Různá množství kompetiční protilátky (0,002 až 17 $\mu\text{g/ml}$) se inkubují v 1X PBS, pH 7,2, s obsahem 1 % (hmotnost/objem) BSA s 0,08 $\mu\text{g/ml}$ CHO 2B8 značené TAG, 0,08 mg/ml protilátky proti CD19 a 167000 buněk/ml. Po inkubaci při teplotě okolí s orbitálním mícháním po dobu 3 h se stanoví relativní elektrochemiluminiscence (ECL) s použitím přístroje ORIGEN. Střední hodnoty ECL se stanoví pro dvojice vzorků a vynesou proti koncentraci kompetitivní protilátky s použitím softwaru Kaleidagraph. Pro některé experimenty se vynášejí procento inhibice. Křivky kompetice se prokládají a hodnoty EC 50 (koncentrace protilátky poskytující 50% maximální vazbu) se stanoví s použitím následujícího čtyřparametrického programu:

$$y = [(m1 - m4) / (1 + (m0 / m3) m2)] + m4, m1 =, m2 =, m3 =, m4 =$$

$m0$ = nezávislá proměnná

$m1$ = odpověď nulového signálu v relativních jednotkách ECL

$m2$ = parametr zakřivení

$m3$ = EC50 v $\mu\text{g/ml}$

$m4$ = odpověď maximálního signálu v relativních jednotkách ECL

Průměrné hodnoty afinity se vypočítají z hodnot EC50 a známé koncentrace stopové protilátky s použitím Mullerova způsobu.

4. Příprava 2B8–MX–DTPA

Chelatotvorný prostředek, 1–isothiokyanátobenzyl–3–methyldiethylentriaminpentaoctová kyselina (MX–DTPA) se používá ve formě suchého prášku (volná kyselina) a ukládá se vysušená při teplotách –20 nebo –70 °C. Zhruba 3 mg protilátky CHO 2B8 v normálním fyziologickém roztoku s nízkým obsahem kovů se upraví na pH 8,6 přidávkou jedné desetiny objemu 50 mM boritanu sodného, pH 8,6. Protilátka o koncentraci 10 až 11 mg/ml se inkubuje při molárním poměru MX–DTPA k proteinu 4:1 přidávkou MX–DTPA rozpuštěného v 50mM roztoku boritanu sodného, pH 8,6. Po inkubaci při teplotě okolí (2 až 24 h) se nezreagovaný chelatotvorný prostředek odstraní z konjugátu opakovanou diafiltrací v normálním fyziologickém roztoku s nízkým obsahem kovů s použitím rotačních filtrů Centricon 30.

5. Příprava In2B8 a Y2B8

In2B8 se připraví s použitím způsobu značení soupravy radionuklidem, jak se zde popisuje. Protilátka se označí na specifickou aktivitu 111 MBq/mg (3 mCi/mg) a formuluje se do 0,2 mg/ml. Ve stručnosti se převede 18 až 74 MBq radionuklidu ^{111}In ve formě chloridu do mikrocetrifugační zkumavky prosté kovů a upraví se na pH 4,2 s použitím 1,2 násobku objemu 50 mM roztoku octanu sodného o nízkém obsahu kovů. Přidá se 2B8–MX–DTPA o koncentraci 2 mg/ml k roztoku octanu inditého a po inkubaci při teplotě okolí po dobu 30 min se označená protilátka formuluje do 0,2 mg/ml v 1X PBS, pH 7,2, s obsahem 7,5 % (hmotnost/objem) lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA (konečná koncentrace HSA 4 % až 6 %). Veškeré vzorky se testují ohledně inkorporace radionuklidů po trojicích. Výsledky ukazují hodnotu >95 %.

Y2B8 se rovněž připraví v malém měřítku soupravy pro značení radionuklidem popsané v příkladu 1. Protilátka se označí na specifickou aktivitu 555 MBq/mg (15 mCi/mg) a formuluje do 0,3 mg/ml. Ve stručnosti se 18 až 74 MBq radionuklidu ^{90}Y ve formě chloridu přenesou do mikrocetrifugační zkumavky prosté kovů a upraví na pH 4,2 s použitím 1,2 násobku 50 mM roztoku octanu sodného o nízkém obsahu kovů. Přidá se 2B8–MX–DTPA při 2 mg/ml k acetátovému roztoku ^{90}Y a po inkubaci při teplotě okolí po dobu 5 min se označená protilátka formuluje do 0,3 mg/ml v 1X PBS, pH 7,2, s obsahem 7,5 % (hmotnost/objem) lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA (konečná koncentrace HSA, 4 % až 6 %). Všechny vzorky se testují ohledně inkorporace radionuklidu po trojicích, nalezené hodnoty jsou >95 %.

Koncentrace radioaktivity finálních produktů označených radionuklidem se vypočítají na základě přidané aktivity k reakční směsi a s odkazem na Osvědčení o analýze radionuklidů. Koncentrace protilátky v konečných reakčních směsích se vypočítají ze známého množství přidané protilátky.

Pro kinetické studie značení radionuklidu vyhodnocující účinek pH na inkorporaci nuklidu a vazbu se upravuje pH reakčních směsí. Přídavkem různých množství 50 mM roztoku octanu sodného s nízkým obsahem kovu (0,8 násobek až 2,2 násobek objemu roztoku radionuklidu).

6. Stanovení inkorporace radionuklidu pro In2B8 a Y2B8

Množství radioaktivity připojené ke konjugátu (inkorporace radionuklidu) v konečných produktech nebo inkubačních vzorcích se stanoví s použitím komerčně dostupné soupravy připravené Biodex (Tec-Control Radiochromatographic Kit, viz příklad 1). Obecně se aplikuje 1 μl zkušebních vzorků ve dvojicích nebo trojicích s použitím mikropipetovacího zařízení a vyvíjí se podle přílohy instrukcí Biodex. Poloviny pásu se použijí pro měření četnosti impulzů ve skleněných zkumavkách s použitím čítače gama Isodata nebo scintilačního počítáče Packard Top Count, jak se popisuje níže. Inkorporace radioaktivní značky se vypočítá dělením aktivity v horní polovině pásu celkovou aktivitou v obou polovinách. Tato hodnota se vyjádří jako procento a stanoví se průměr.

7. Stanovení imunoreaktivity In2B8 a Y2B8

Imunoreaktivita se vyhodnotí způsobem Lindmoa a kol., jak se popisuje výše v příkladu 1.

8. Přímá imunoesej pro In2B8 a Y2B8

Stejné způsoby, jako se popisují zde, se používají pro stanovení vazby In2B8 a Y2B8 na CD20–pozitivní SB buňky. In2B8 a Y2B8 se připraví a formulují, jak se popisuje výše. Pro eseje se vzorky In2B8 nebo Y2B8 zředí dilučním pufrům pro eseje (1X PBS, pH 7,2, s obsahem 1 % (hmotnost/objem) bovinního serumalbuminu (BSA) na 40 ng/ml respektive 11 ng/ml.

Antigen–pozitivní (SB) a antigen–negativní (HSB) buňky se udržují v RPMI 1640 s přidavkem 10% fetálního telecího séra při teplotě 37 °C a za přítomnosti 5 % oxidu uhličitého. Buňky (životnost > 90 % podle stanovení vylučování trypanové modři) se sbírají při teplotě okolí a hustotě buněk 0,5 až 2 x 10⁶ buněk/ml centrifugací (při frekvenci otáčení 1300 min⁻¹ v Sorvallo-
 5 vě centrifuze) a promyjí se dvakrát 50 ml 1X HBSS. Peletované buňky se resuspendují na 50 x 10⁶ buněk/ml v předem ochlazeném 1X HBSS s obsahem 1 % (hmotnost/objem) bovinního serumalbuminu (BSA) a 10 % (hmotnost/objem) mannitolu (lyofilizační pufr). Buněčné suspenze se rozdělují do polypropylenových mikrocentrifugačních zkumavek o obsahu 1,5 ml s těsnicím O–kroužkem při koncentraci 50 x 10⁶ buněk/ml (0,5 ml na zkumavku) a lyofilizují se přes noc při
 10 tlaku 4 až 8 Pa. Lyofilizované buňky se uchovávají vysušené při teplotě 2 až 8 °C a rekonstituují se sterilní vodou pro esej.

Lyofilizované SB a HSB buňky v polypropylenových zkumavkách obsahu 1,5 ml se rekonstituují sterilní vodou na 50 x 10⁶ buněk/ml. Zředěné In2B8 nebo Y2B8 se přidají k buňkám po trojicích
 15 a inkubují se po dobu 45 až 60 min za míchání při teplotě místnosti. Po inkubaci se buňky peletují centrifugací a aktivita vázaná na buňky se stanoví měřením četnosti impulzů vzorků v Isodata Gamma Counter nebo Packard Top Count scintillation counter, jak se popisuje níže. Aktivita vázaná na buňky (B) se vypočítá odečtením nevázané aktivity (supernatantu) od celkové přidané aktivity. Celková aktivita se stanoví na základě měření četnosti impulzů ve zkumavkách bez
 20 buněk. Procento vazby se vypočítá vyjádřením navázané četnosti impulzů jako procento celkové četnosti impulzů.

9. Měření aktivity

25 Vzorky pro inkorporaci radionuklidu se měří po dobu 1 min s použitím čítače Isodata gamma counter. Tento čítač se nastaví na energetické okno 100 až 500 keV a pozadí se upraví na nulu bezprostředně před použitím vzorků s ¹¹¹In. Používá se též čítač gama Isodata pro měření pásů ITLC s naneseným ⁹⁰Y. Energetická okna pro detekci brzděného záření činí 100 až 1000 keV.

30 Pro imunoeseje se vzorky ⁹⁰Y přenesou na 24–jamkové misky a přidá se scintilátor MicroSint 40 a vzorky se měří na Packard TopCount po dobu 1 min s nastavením minimální a maximální energie. Vzorky ¹¹¹In se měří po dobu 1 min s použitím čítače gama Isodata. Tento čítač se nastaví na energetické okno 100 až 500 keV a pozadí se nastaví na nulu bezprostředně před použitím.

35 10. Specifikace pro vypuštění přípravku pro klinické dávky In2B8 a Y2B8

Specifikace pro vypuštění týkající se inkorporace radionuklidu a vazby na CD20–pozitivní buňky se stanoví přípravou šesti dávek každé z protilátek In2B8 a Y2B8 s použitím dvou šarží 2B8–MX–DTPA o kvalitě pro klinické použití (šarže 0219 a 0220) připravených podle tohoto vynálezu a plněných za podmínek dobré výrobní praxe. Eseje pro vypuštění přípravků se provádějí
 40 podle popisu výše.

IV. Výsledky

45 A. Charakterizace 2B8 odvozených od CHO

S použitím průtokové cytometrie se prokazuje, že se CHO 2B8 váže přímo s CD20–pozitivními SB buňkami bez vazby na CD20–negativní HSB buňky (obrázek 34). Nezaznamenává se žádná významná vazba na irelevantní isotypickou (gama1K) protilátkou (SOO4).

50 Vazba CHO 2B8 na CD20–pozitivní buňky se vyhodnocuje v kompetitivní esejí s použitím chemiluminiscenčního detekčního systému ORIGEN. Lyofilizované a rekonstituované antigen–pozitivní SB buňky se inkubují se vzrůstajícími množstvími protilátky za přítomnosti CHO 2B8 označené ruthenem. Výsledky ukazují, že CHO 2B8 inkubuje vazbu na CD20–pozitivní buňky
 55 ve stejné míře jako protilátka získaná z reaktorů z dutými vlákny (2B8–49) (obrázek 35). Hod-

noty EC50 se stanoví graficky a způsobem podle Mullera (1980) použitým pro výpočet středních hodnot afinity. Stanovená afinita CHO 2B8 je $1,3 \times 10^{-10}$ M, protilátka 2B8 obdržená z bioreaktoru z dutými vlákny poskytuje hodnotu afinity $2,5 \times 10^{-10}$ M. Nespecifická vazba je zanedbatelná, jak prokazuje nedostatek kompetice s irelevantní isotypickou protilátkou S004.

5

B. Charakterizace 2B8–MX–DTPA odvozené od CHO

Konjugát 2B8 (2B8–MX–DTPA) se připraví s použitím způsobu podobnému způsobu použitému pro dříve charakterizovanou 2B8–49. Reakce se provádějí s použitím zhruba 3 mg protilátky při molárním poměru chelatotvorného prostředku k protilátce 4:1. Hodnotí se inkubační časy 2, 4, 8, 17 a 24 h pro stanovení reakčního času poskytujícího přijatelnou retenci vazby na CD20–pozitivní buňky a vysokou inkorporaci radionuklidu ^{111}In . Kompetitivní vazebné křivky srovnávající CHO 2B8 s konjugátem CHO 2B8–MX–DTPA při reakci po dobu 8 až 24 h jsou podobné, což ukazuje, že konjugací proces neovlivňuje významně vazbu protilátky na antigen CD20 (obrázek 36). S použitím hodnot EC50 stanovených graficky (obrázek 36) se zjišťují afinitní konstanty pro nekonjugované a konjugované protilátky v rozmezí $2,3 \times 10^{-10}$ M až $5,9 \times 10^{-10}$ M (tabulka 40). Inkorporace radionuklidu je vyšší než 95 % pro konjugací časy 8 až 24 h (tabulka 30).

20 Tabulka 40

Účinek reakčního času konjugace na inkorporaci radionuklidu a imunoreaktivitu CHO 2B8–MX–DTPA

Doba inkubace (h)	Inkorporace radionuklidu (%)	Afinita (M)
0	ND	$2,3 \times 10^{-10}$
2	83,5	ND
4	90,5	ND
8	96,1	$5,9 \times 10^{-10}$
17	97,3	$5,9 \times 10^{-10}$
24	98,8	$4,4 \times 10^{-10}$

25

C. Charakterizace In2B8 a Y2B8 připravené z 2B8–MX–DTPA odvozené od CHO

Konjugovaná protilátka značená ^{111}In CHO 2B8–MX–DTPA (In2B8) se připraví s použitím způsobu soupravy pro značení radionuklidem v malém množství dříve popsaného pro protilátku získanou z bioreaktoru s dutými vlákny (příklad 1). Ve stručnosti se protilátka (2B8–MX–DTPA odvozená od CHO, šarže 0165A) inkubuje se ^{111}In ve formě acetátu při určeném pH po dobu 30 min při teplotě místnosti. Reakční směsi se formulují s fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátem, pH 7,2, s obsahem 7,5 % (hmotnost/objem) lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA. Formulované vzorky In2B8 se kontrolují ohledně inkorporace radionuklidu s použitím chromatografie na předem připravené tenké vrstvě. Vazba In2B8 na CD20–pozitivní buňky se určí s použitím lyofilizovaných a rekonstituovaných SB buněk. Pro srovnání se inkubuje konjugát připravený z protilátky vytvořené hybridomem (2B8–49) se ^{111}In ve formě acetátu po dobu 30 min při pH 4,2 (podmínky stanovené dříve pro tuto protilátku).

40

Provedou se kinetické studie pro stanovení podmínek značení zajišťujících maximální retenci vazby s CD20–pozitivními buňkami a vysokou inkorporaci radionuklidu (tabulky 41 a 42).

Konjugovaná protilátka (2B8-MX-DTPA odvozená od CHO) se inkubuje při teplotě místnosti se ^{111}In ve formě acetátu při pH 4,2 pro doby určené v tabulce 42.

5 Tabulka 41

Kinetika značení In2B8 radionuklidem: účinek pH na inkorporaci radionuklidu a vazbu na CD20–pozitivní buňky

pH reakce	Radioinkorporace (%)	Vazba (%)
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
Kontrola (2B8-49)	99,3	86,5

10

Tabulka 42

15 Kinetika značení In2B8 radionuklidem: účinek doby inkubace na inkorporaci radionuklidu a vazbu na CD20–pozitivní buňky

Doba inkubace (min)	Radioinkorporace (%)	Vazba (%)
pH 2,9: 15	97,2	85,3
30	99,1	85,2
45	97,2	84,8
pH 4,6: 15	99,0	87,2
30	97,2	86,8
45	99,4	86,3
Kontrola (2B8-49)	99,4	87,8

20 Výsledky ukazují, že pro rozmezí pH 3,0 až 4,6 a dobu inkubace 30 min se dosahuje >97 % inkorporace radionuklidu při zachování vazby zhruba 84 %. Hodnoty inkorporace radionuklidu a vazby jsou invariantní pro inkubační doby 15 až 45 min a pH 2,9 až 4,6 (tabulka 42). Výsledky jsou srovnatelné s výsledky získanými při použití protilátky 2B8-49 (tabulky 41 a 42).

25 Protilátka značená radionuklidem ^{90}Y se připravuje inkubací konjugované protilátky (2B8-MX-DTPA odvozená of CHO) s radionuklidem ^{90}Y ve formě acetátu při určeném pH po dobu 5 min při teplotě okolí. Reakční směsi se formulují ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem, pH 7,2, s obsahem 7,5 % (hmotnost/objemem) lidského serumalbuminu a 1 mM DTPA. Formu-

lované vzorky Y2B8 se kontrolují ohledně inkorporace radionuklidu s použitím chromatografie na předem připravené tenké vrstvě. Vazba Y2B8 na CD20–pozitivní buňky se stanovuje s použitím lyofilizovaných a rekonstituovaných SB buněk. Pro srovnání se inkubuje konjugát připravený z protilátky tvořené hybridomem (2B8–49) s radionuklidem ^{90}Y ve formě acetátu po dobu 5 min při pH 4,2 (podmínky dříve určené pro tuto protilátku).

Provádějí se podobné kinetické studie pro hodnocení přípravy protilátky značené ^{90}Y (Y2B8). Pro reakce značení v rozmezí pH 3,9 až 4,7 při době inkubace 5 min je inkorporace radionuklidu >96 % s >80 % zachování vazby na CD20–pozitivní buňky (tabulka 43). Podobné výsledky lze obdržet pro inkubační doby 3, 5 a 10 min pro rozmezí pH 2,9 až 4,6 (tabulka 44). Poté se konjugovaná protilátka (2B8–MX–DTPA odvozená od CHO) inkubuje při teplotě okolí s ^{90}Y ve formě acetátu při pH 4,2 po doby ukázané v tabulce 44. Výsledky jsou srovnatelné s výsledky obdrženy s použitím protilátky 2B8–49 (tabulky 43 a 44).

Tabulka 43

Kinetika značení Y2B8 radionuklidem: účinek pH na inkorporaci radionuklidu a vazbu na CD20–pozitivní buňky

pH reakce	Radioinkorporace (%)	Vazba (%)
3,9	98,4	80,7
4,2	97,8	81,0
4,4	96,1	80,0
4,6	97,0	80,2
4,7	97,4	80,6
Kontrola (2B8-49)	99,3	82,6

Tabulka 44

Kinetika značení Y2B8 radionuklidem: účinek doby inkubace na inkorporaci radionuklidu a vazbu na CD20–pozitivní buňky

pH 3,9: 3	97,0	82,0
5	98,9	82,1
10	99,2	82,3
pH 4,7: 3	97,2	82,5
5	96,7	81,8
10	97,6	81,5
Kontrola (2B8-49)	99,2	84,2

- Imunoreaktivita pro In2B8 a Y2B8 připravené z CHO 2B8 se stanovují s použitím způsobu autorů Lindmo a kol. Vzájemně množství čerstvě sbíraných CD20–pozitivních SB buněk se inkubují s pevným množstvím In2B8 nebo Y2B8 za podmínek přebytku antigenu. Analýza vynesení pře-
 5 vrácené hodnoty údajů vazby poskytuje imunoreaktivitu 80,6 a 72,2 % pro In2B8 respektive Y2B8 (obrázky 37 a 38).

D. Specifikace pro vypuštění produktu pro In2B8 a Y2B8 odvozené od CHO

- 10 Používají se dvě šarže souprav pro značení radionuklidem In2B8/Y2B8 pro klinické použití pro přípravu šesti dávek In2B8 a Y2B8. In2B8 a Y2B8 se připraví s použitím verzí způsobů značení radionuklidem v malém měřítku, používaných v současné době v klinických zkouškách. Každá šarže 2B8–MX–DTPA značená radionuklidem se testuje ohledně radioinkorporace a vazby na
 15 CD20–pozitivní (SB) a CD20–negativní (HSB) lidské buňky. Tyto výsledky se shrnutí v tabulkách 45 a 46. Pro šest dávek In2B8, které se připraví, je inkorporace radionuklidu od 98,9 do 99,3 % se střední hodnotou 99,1 %. Vazba na CD20–pozitivní buňky je v rozmezí 81,9 až 85,1 % se střední hodnotou 83,6 %, vazba na CD20–negativní buňky je <4 %. Pro šest dávek Y2B8, které se připraví, je radioinkorporace v rozmezí 97,4 až 98,7 % se střední hodnotou 98,2 %. Vazba na CD20–pozitivní buňky je v rozmezí 81,4 až 82,7 % se střední hodnotou
 20 81,9 %, vazba na CD20–negativní buňky je <8 %.

Tabulka 45

- 25 Výsledky analýzy pro In2B8 odvozenou od CHO s použitím návodu soupravy pro značení radionuklidem

Stanovení	Radioinkorporace (%)	Vazba (%)	
		SB buňky	HSB buňky
1 (šarže 0219)	99,1	81,9	2,8
2 (šarže 0219)	99,3	83,2	2,8
3 (šarže 0219)	99,2	83,6	3,7
4 (šarže 0220)	99,0	83,8	2,6
5 (šarže 0220)	98,9	84,1	2,6
6 (šarže 0220)	98,9	85,1	3,3

- Průměr = 99,1 % Průměr = 83,6 % Průměr = 2,9 %
 30 Směrod. odch. = 0,2 % Směrod. odch. = 1,1 % Směrod. odch. = 0,4 %

Tabulka 46

Výsledky analýzy pro Y2B8 odvozenou od CHO s použitím návodu soupravy pro značení radionuklidem

Stanovení	Radioinkorporace (%)	Vazba (%)	
		SB buňky	HSB buňky
1 (šarže 0219)	98,7	82,1	7,4
2 (šarže 0219)	98,6	82,7	0,7
3 (šarže 0219)	98,3	82,2	7,2
4 (šarže 0220)	97,4	81,8	1,7
5 (šarže 0220)	97,6	81,4	2,2
6 (šarže 0220)	98,4	81,4	1,1

Průměr = 98,2 % Průměr = 81,9 % Průměr = 3,4 %

Směrod. odch. = 0,5 % Směrod. odch. = 0,5 % Směrod. odch. = 3,1 %

V. Diskuze a závěry

Myší monoklonální protilátka (2B8) proti myšimu CD20 klonovaná a exprimovaná v CHO buňkách (2B8 odvozená od CHO) udržuje specifčnost pro CD20–pozitivní lidské buňky, jak ukazují způsoby FACS a kompetitivní imunoeseje. Vazba na lidské T buňky je minimální. Afinita protilátky k lidským CD20–pozitivním buňkám zjištěná kompetitivní imunoesejí je $1,3 \times 10^{-10}$ M. Použitím téže eseje lze stanovit pro protilátku 2B8 odvozenou od bioreaktorů s dutými vlákny hodnotu afinity $2,5 \times 10^{-10}$ M.

Protilátka CHO 2B8 reaguje s MX–DTPA s vytvořením konjugátu 2B8–MX–DTPA při zachování vhodné retence imunoreaktivity. Optimální inkorporace chelatotvorného prostředku se určí měřením inkorporace radionuklidu se ^{111}In a dosahuje se po 8 h inkubace při teplotě okolí. Způsoby značení konjugátu 2B8–MX–DTPA radionuklidem se optimalizují pro ^{90}Y nebo ^{111}In vzhledem k pH a době inkubace pro zajištění maximální inkorporace radionuklidu a retence imunoreaktivity.

Výsledky několika příprav $\text{In}2\text{B8}$ a $\text{Y}2\text{B8}$ ukazují na reprodukovatelnost způsobu značení radionuklidem použitého pro přípravu klinických dávek. Na základě těchto výsledků značení radionuklidem se uvažuje, že specifikace pro vypuštění přípravku získaného s použitím lyofilizovaných CD20–pozitivních buněk jsou pro inkorporaci radionuklidu a vazbu ≥ 95 % respektive ≥ 70 %. V souhrnu tyto výsledky ukazují na srovnatelnost 2B8 odvozené od CHO a 2B8–49 a ukazují na vhodnost 2B8–MX–DTPA odvozené od CHO pro použití v klinických zkouškách.

Konečně tento vynález popisuje způsob značení nazývaný jako způsob „mix-and-shoot“ pro přípravu klinických dávek protilátek značených radionuklidem, který předchází nutnosti současné používaného kroku vysokovýkonné kapalinové chromatografie pro odstranění radionuklidu, který není vázaný na proteiny. Tento zjednodušený způsob eliminuje tento pracný purifikační krok při udržení vysoké úrovně inkorporace radionuklidu (>95 %) a zlepšené retence imunoreaktivity (>70 %). Klinicky formulovaný konjugát značený radionuklidem je stabilní in vitro při inkubaci při teplotě 4 °C po dobu 48 h, jak ukazují hodnoty retence radionuklidu a imunoreaktivity. Navíc je tento konjugát značený radionuklidem stabilní při konjugaci v lidském séru při teplotě 37 °C po dobu 72 h. Studie biologické distribuce neukazují žádné neobvyklé ukládání ve

tkáních a žádnou významnou akumulaci v kosti. Odhady radiační absorbované dávky pro „standardního“ člověka o hmotnosti 70 kg jsou srovnatelné s hodnotami obdrženy v pokračující klinické zkoušce s použitím 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y . Výsledky těchto studií ukazují, že 2B8-MX-DTPA značená radionuklidem ^{90}Y získaná způsobem „mix-&-shoot“ je srovnatelná s protilátkou připravenou konvenčním způsobem s použitím vysokovýkonné kapalinové chromatografie. Validace způsobu pro přípravu konjugátu značeného radionuklidem pro klinické použití ukazuje, že tento způsob je reprodukovatelný a přípravek je srovnatelný s přípravkem získaným současným způsobem s použitím vysokovýkonné kapalinové chromatografie. Výsledky těchto preklinických studií ukazují, že tento nový způsob „mix-&-shoot“ lze použít pro přípravu 2B8-MX-DTPA značené ^{90}Y vhodné pro použití v klinických zkouškách.

Odkazy na literaturu

Každá z následujících citací se zde zahrnuje formou odkazu:

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

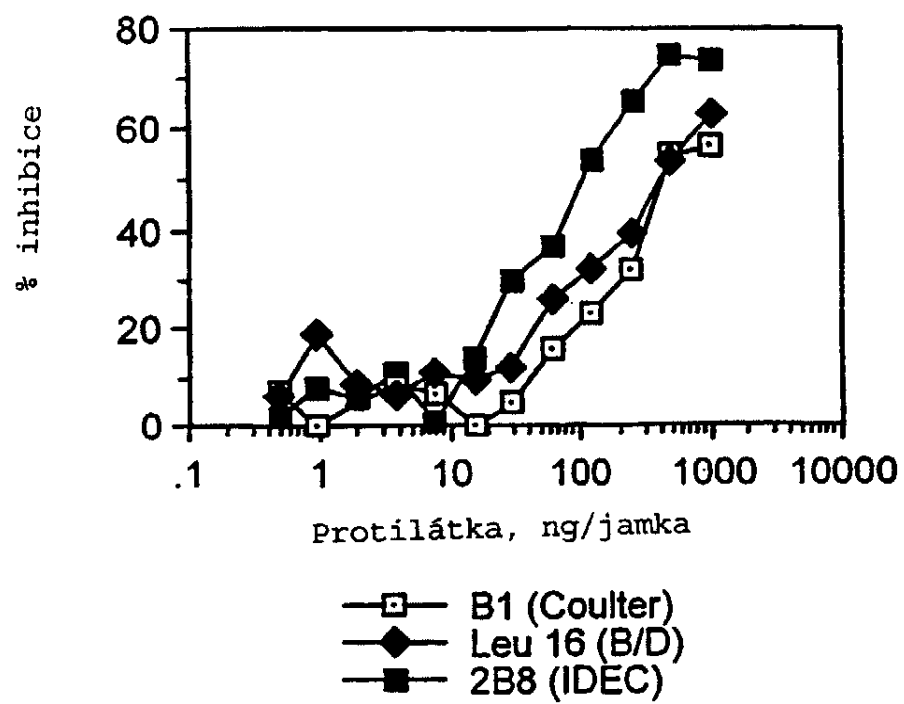
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob radionuklidového značení protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem, pro použití na podávání ^{90}Y pacientovi, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje:
 - (i) smísení protilátky konjugované s chelatotvorným prostředkem s roztokem obsahujícím ^{90}Y za vytvoření směsi,
 - (ii) inkubaci směsi při teplotě místnosti po dobu 10 minut nebo méně, pro produkci protilátky značené radionuklidem, kde tato protilátka značená radionuklidem má inkorporaci radionuklidu větší než 95 % tak, že může být podávána přímo pacientovi bez další purifikace od neinkorporovaného ^{90}Y , a
 - (iii) zředění protilátky označené radionuklidem ve formulačním pufru na příslušnou koncentraci vhodnou pro podávání pacientovi.
2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že touto protilátkou konjugovanou s chelatotvorným prostředkem je protilátka proti CD20.

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že touto protilátkou proti CD20 je 2B8-MX-DTPA.
- 5 4. Způsob podle jakéhokoli z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že se roztok obsahující ^{90}Y před smísením s protilátkou konjugovanou s chelatotvorným prostředkem upravuje na pH mezi 3 a 6.
- 10 5. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že se pH upravuje roztokem octanu sodného s nízkým obsahem kovu, který dostačuje pro úpravu pH na hodnotu mezi 3 a 6.
- 15 6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že octan sodný v roztoku má koncentraci mezi 10 a 1000 mM.
- 17 7. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že objemové množství použitého ^{90}Y je mezi $1,85 \times 10^8$ Bq a $3,7 \times 10^9$ Bq děleno koncentrací radioaktivity v době značení.
- 20 8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že objemové množství použitého ^{90}Y je $1,665 \times 10^9$ Bq děleno koncentrací radioaktivity v době značení.
- 25 9. Způsob podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že se 1 až 2 ml protilátky konjugované s MX-DTPA o koncentraci mezi 0,5 a 30 mg/ml smísí s roztokem obsahujícím ^{90}Y .
- 27 10. Způsob podle jakéhokoli z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že se přidává formulační pufr v množství nezbytném pro dosažení celkového konečného objemu mezi 10 ml a 50 ml.
- 30 11. Způsob podle jakéhokoli z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že formulační pufr obsahuje fyziologický roztok, radioprotektivní prostředek a chelatotvorný prostředek nekonjugovaný s proteinem.
- 35 12. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že radioprotektivním prostředkem je lidský serumalbumin (HSA), askorbát, kyselina askorbová, fenol, sulfity, glutathion, cystein, kyselina gentisová, kyselina nikotinová, askorbylpalmitát, $\text{HOP}(\text{:O})\text{H}_2$, glycerol, sodná sůl formaldehydsulfoxylátu, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ nebo SO_2 .
- 40 13. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že radioprotektivním prostředkem je HSA.
- 42 14. Způsob podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že HSA má koncentraci mezi 1 a 25 % (hmotn./obj.).
- 45 15. Způsob podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že koncentrace HSA je 7,5 % (hmotn./obj.).
- 47 16. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že radioprotektivním prostředkem je askorbát.
- 50 17. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že askorbát má koncentraci mezi 1 a 100 mg/ml.
- 52 18. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že chelatotvorným prostředkem nekonjugovaným s proteinem je DTPA nebo EDTA.
- 55 19. Způsob podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že koncentrace DTPA je 1 mM.

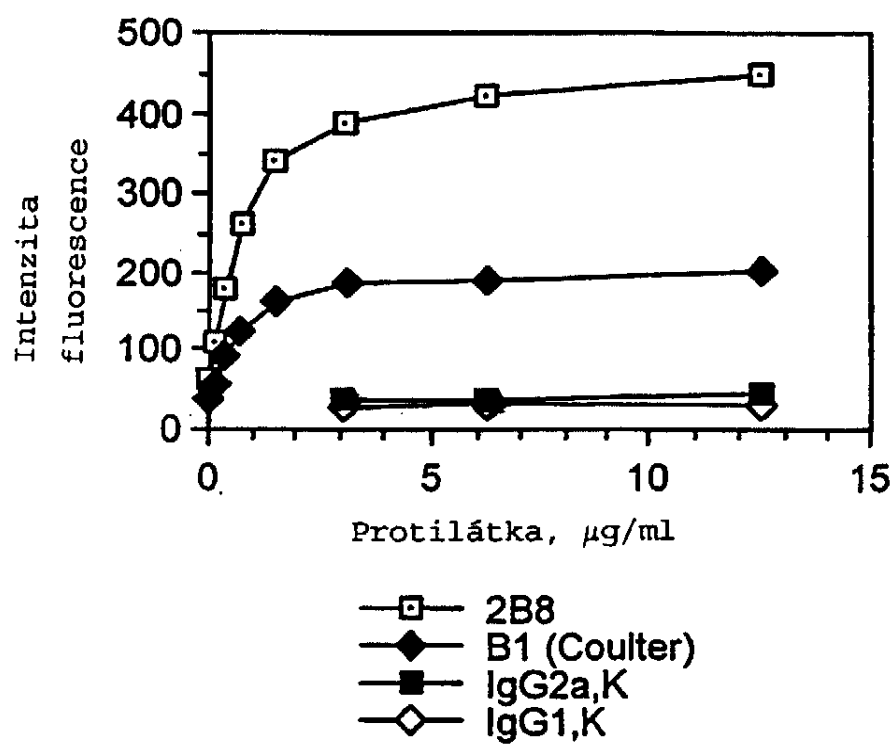
20. Vazebný test pro stanovení procenta vazby protilátky značené radionuklidem s její cílovou buňkou, **vyznačující se tím**, že zahrnuje:
- (i) značení protilátky radionuklidem podle způsobu z nároku 1 pro produkci protilátky značené radionuklidem,
 - (ii) smísení a inkubaci alespoň jednoho alikvotního protilátky značené radionuklidem s alespoň jedním alikvotem antigen–pozitivních buněk,
 - (iii) smísení a inkubaci alespoň jednoho alikvotu protilátky značené radionuklidem identického s alikvotem v kroku (ii) s alespoň jedním alikvotem zředovacího pufru téhož objemu jako je alikvot antigen–pozitivních buněk v kroku (ii) jako kontrolou,
 - (iv) peletování buněk centrifugací,
 - (v) měření radioaktivity v supernatantu peletovaných buněk a kontroly, a
 - (vi) srovnání množství radioaktivity v supernatantu buněk s rozsahem aktivity radionuklidu v kontrole.
21. Vazebný test podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že touto protilátkou je protilátka proti CD20.
22. Vazebný test podle nároku 21, **vyznačující se tím**, že touto protilátkou proti CD20 je 2B8.
23. Vazebný test podle jakéhokoli z nároků 20 až 22, **vyznačující se tím**, že tímto antigenem je CD20.
24. Vazebný test podle jakéhokoli z nároků 20 až 23, **vyznačující se tím**, že těmito antigen–pozitivními buňkami jsou SB buňky, uložené pod přírůstkovým číslem ATCC # CCL 120.
25. Vazebný test podle jakéhokoli z nároků 20 až 24, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje:
- (i) smísení alespoň jednoho alikvotu radionuklidem značené protilátky s alespoň jedním alikvotem antigen–negativních buněk,
 - (ii) peletizaci antigen–negativních buněk centrifugací,
 - (iii) měření aktivity radionuklidu v supernatantu antigen–negativních peletovaných buněk, a
 - (iv) srovnání rozsahu aktivity radionuklidu v supernatantu antigen–negativních buněk s rozsahem aktivity radionuklidu v supernatantu antigen–pozitivních buněk supernatantu a kontrolou.
26. Vazebný test podle nároku 25, **vyznačující se tím**, že těmito antigen–negativními buňkami jsou CD20–negativní buňky.
27. Vazebný test podle nároku 26, **vyznačující se tím**, že tyto CD20–negativní buňky jsou HSB buňky, uložené pod přírůstkovým číslem ATCC # CCL 120.1.

Obrázek 1



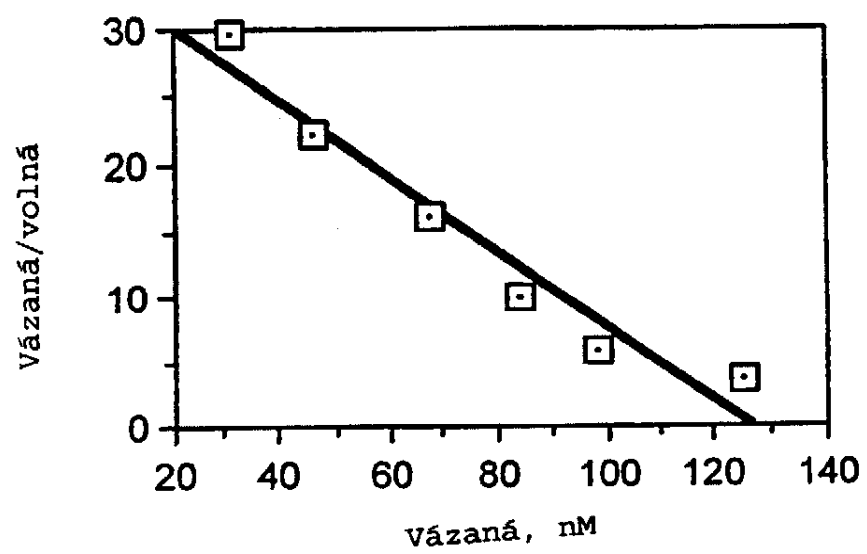
Obrázek 2

Analýza FACS vazby 2B8 na antigen CD20 vyskytující se na lidských B-buňkách



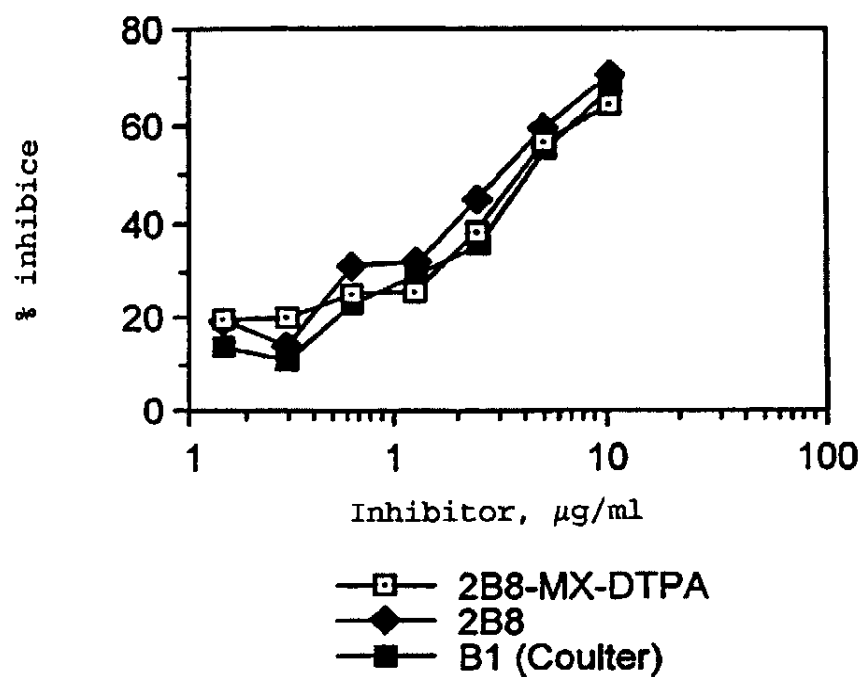
Obrázek 3

Scatchardova analýza vazby 2B8 na B-buňky



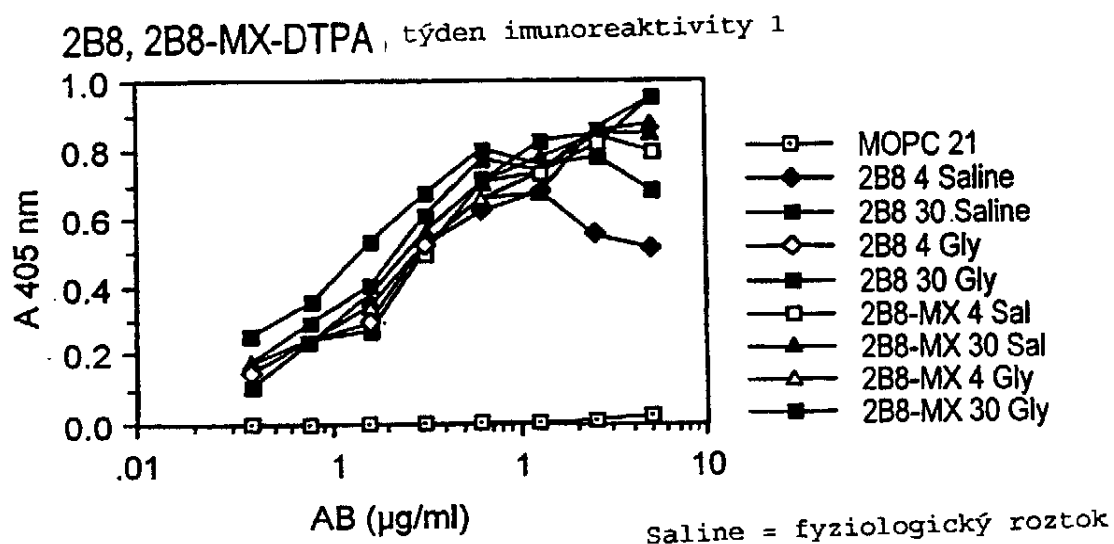
Obrázek 4

Inhibice protilátky B1 proti CD20 Mab značené radionuklidem
neznačenou B1, 2B8 a 2B8 konjugovanou s MX-DTPA



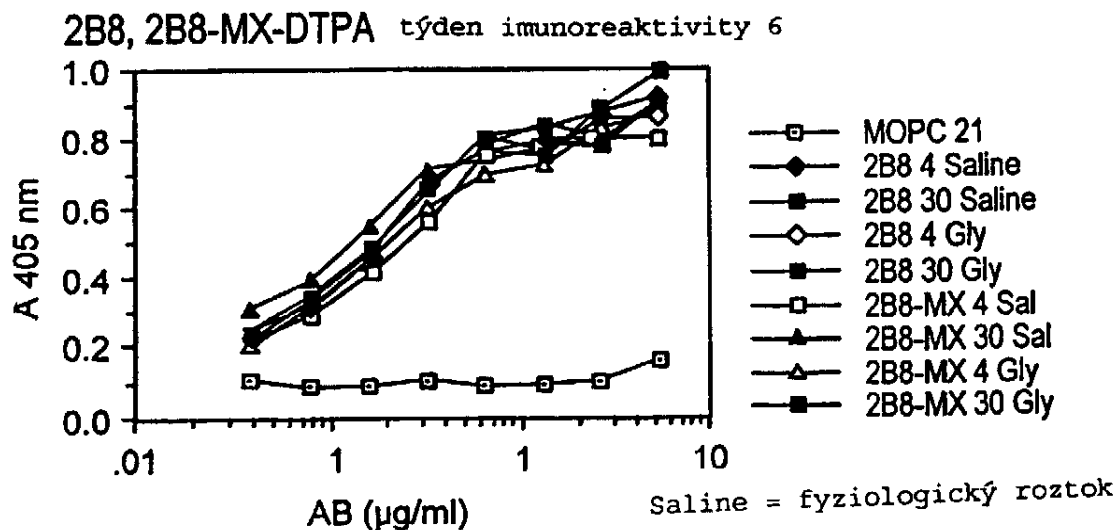
Obrázek 5A

Imunoreaktivita 2B8 v průběhu inkubace při teplotách 4 °C
a 30 °C



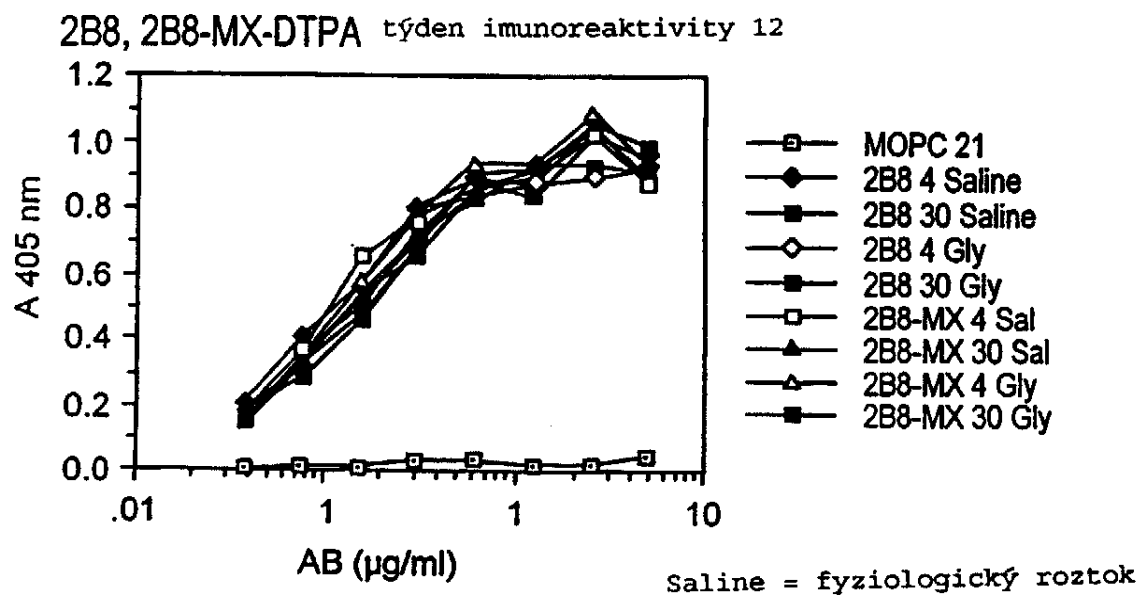
Obrázek 5B

Imunoreaktivita 2B8 v průběhu inkubace při teplotách 4 °C a
30 °C



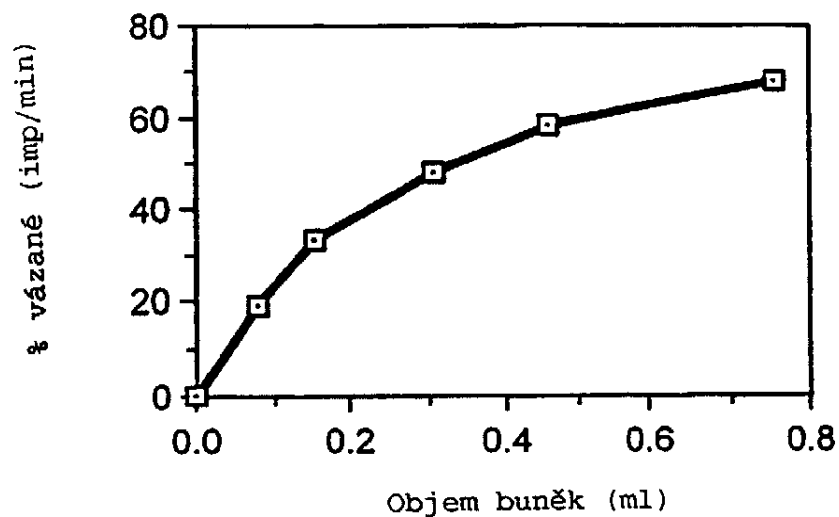
Obrázek 5C

Imunoreaktivita 2B8 v průběhu inkubace při teplotách 4 °C
a 30 °C



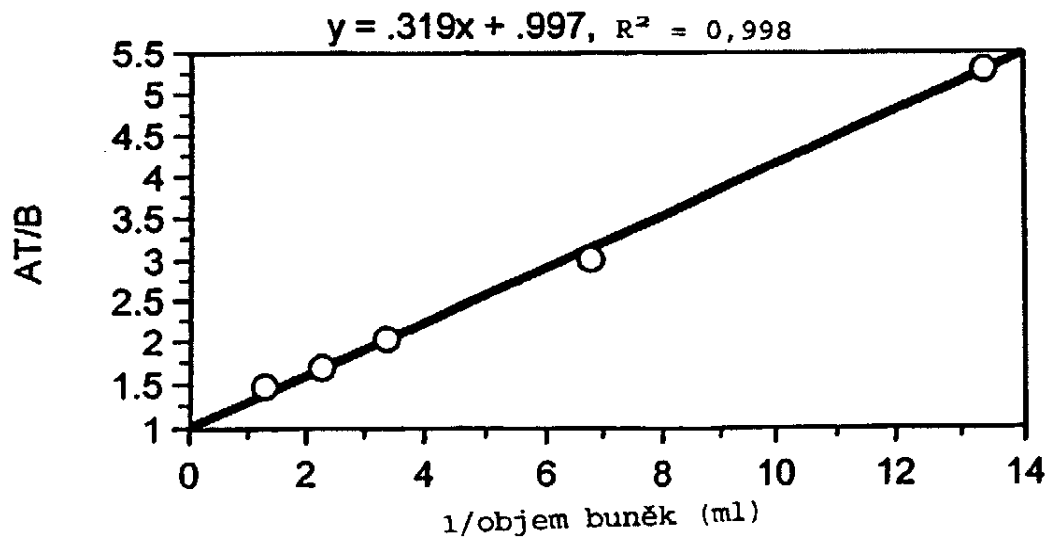
Obrázek 6A

Vazba 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In na CD-20 pozitivní lidské buňky



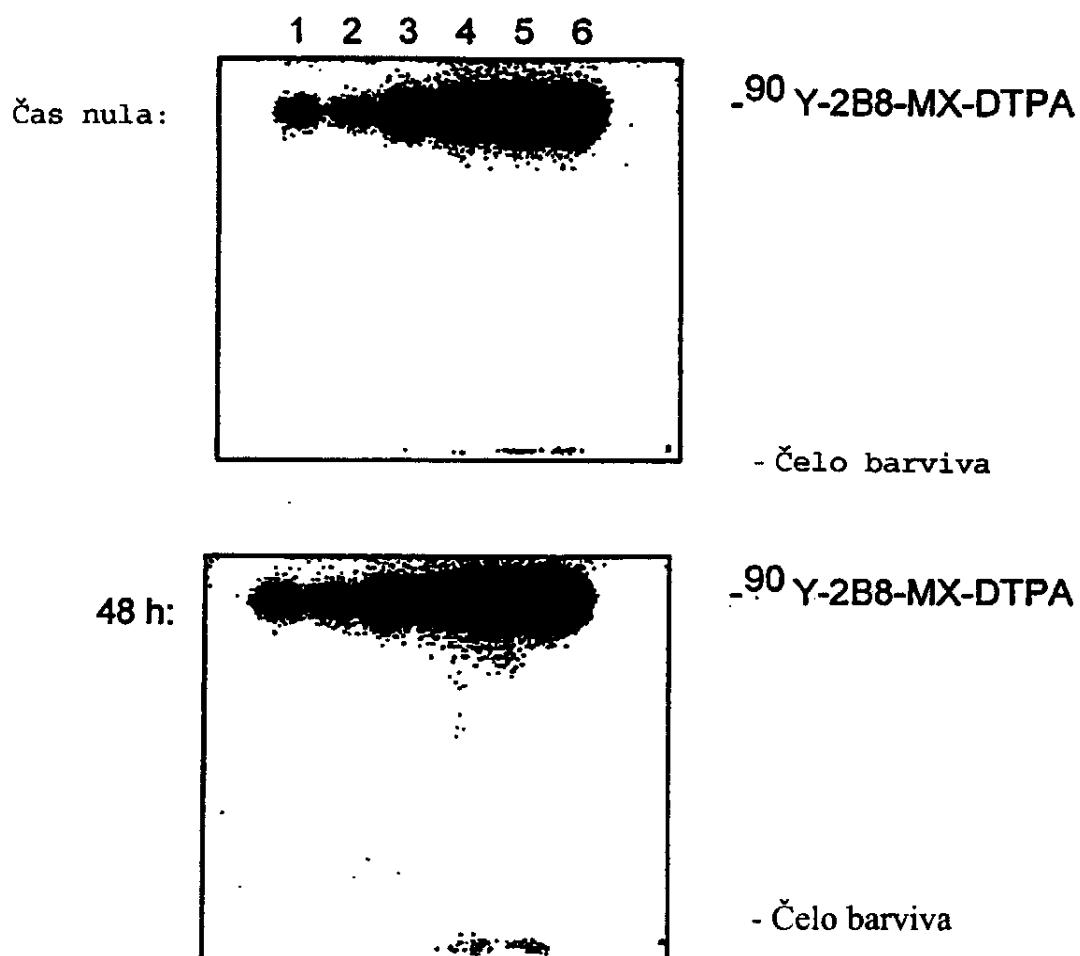
Obrázek 6B

Vazba 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In na CD-20 pozitivní lidské buňky



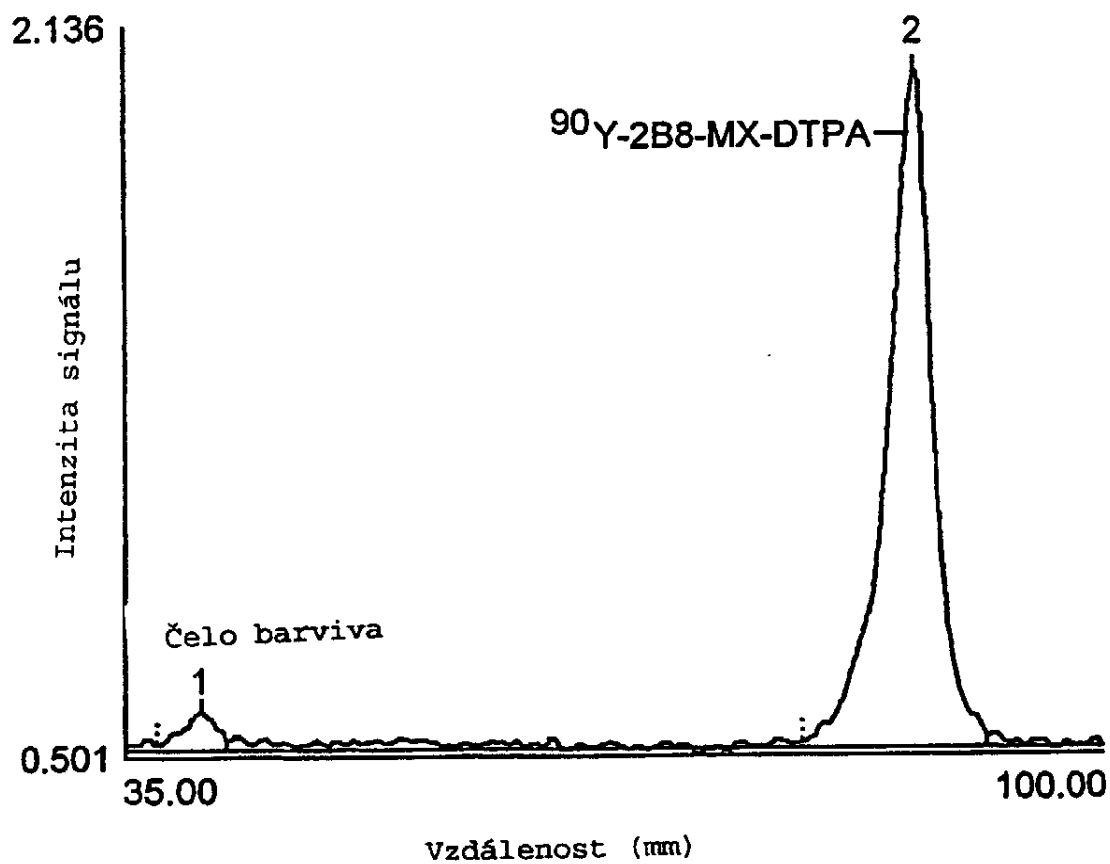
Obrázek 7

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
v PBS obsahujícím lidský serumalbumin a DTPA



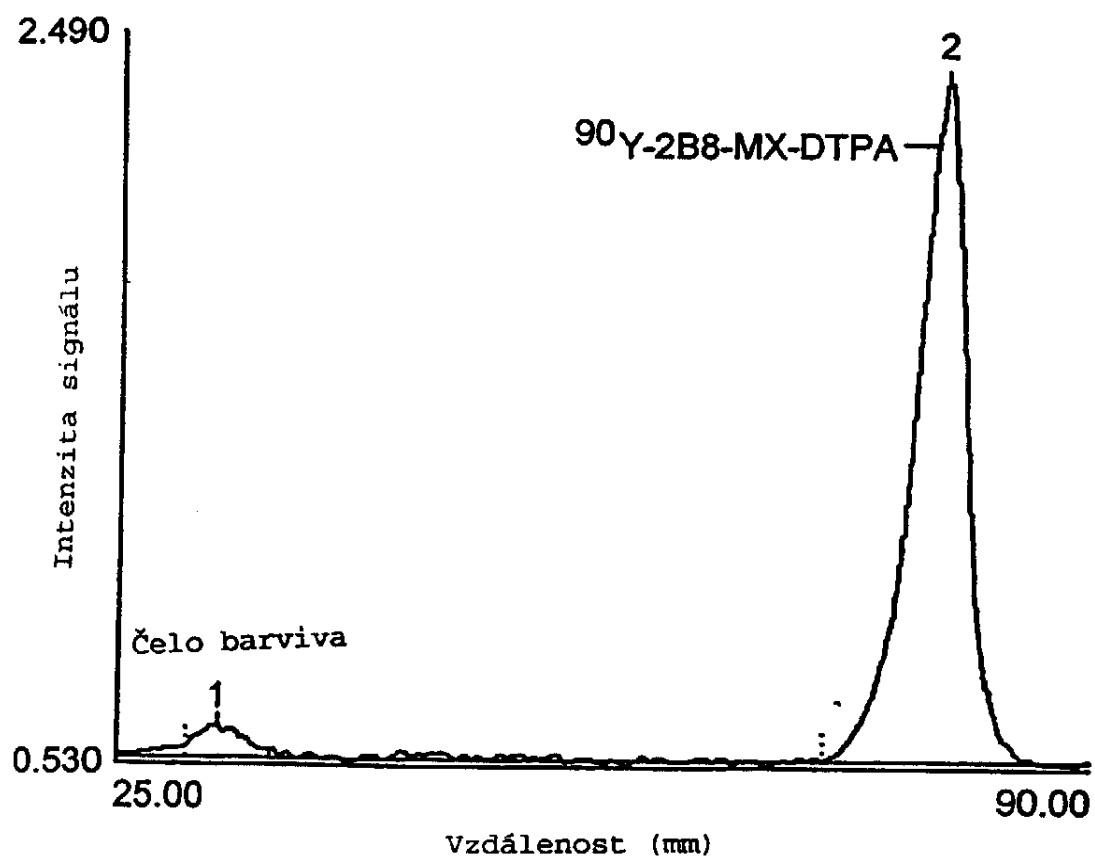
Obrázek 8

Stabilita 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y v PBS obsahujícím lidský serumalbumin a DTPA



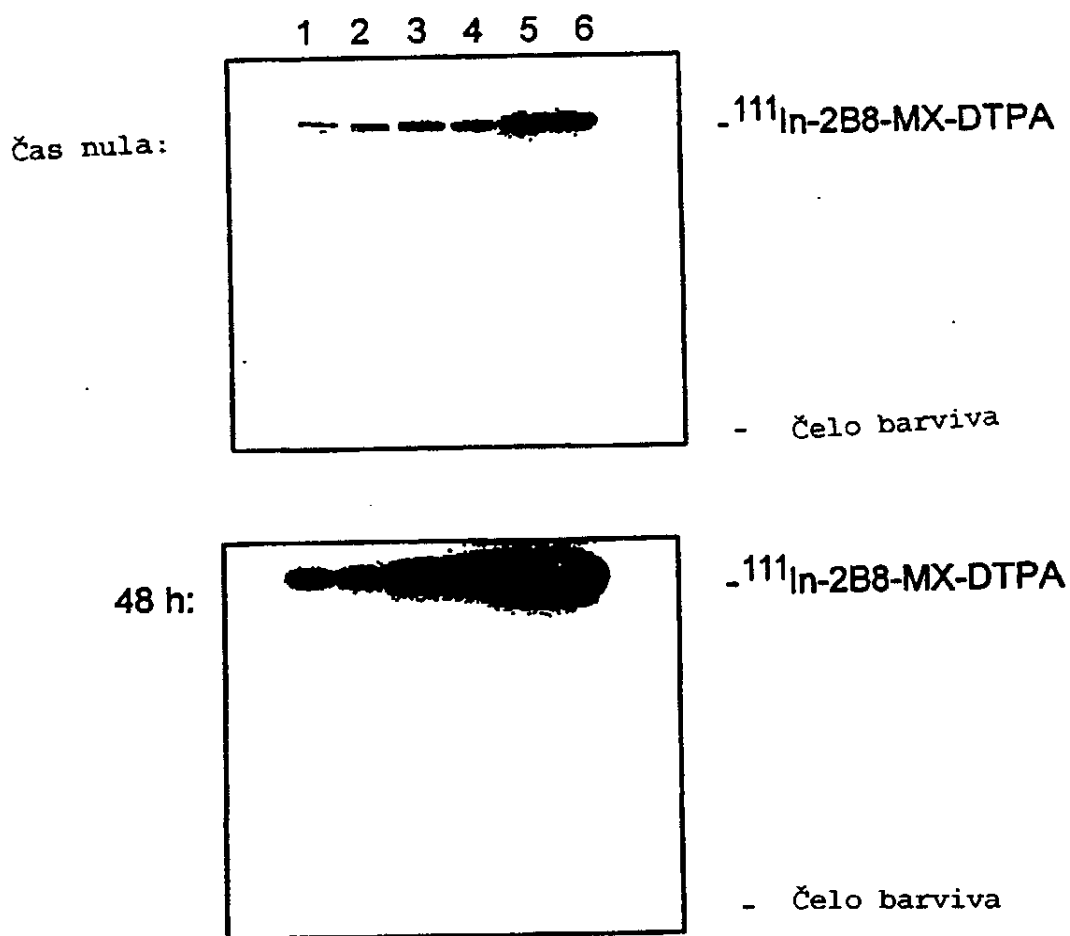
Obrázek 9

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
v PBS obsahujícím lidský serumalbumin a DTPA



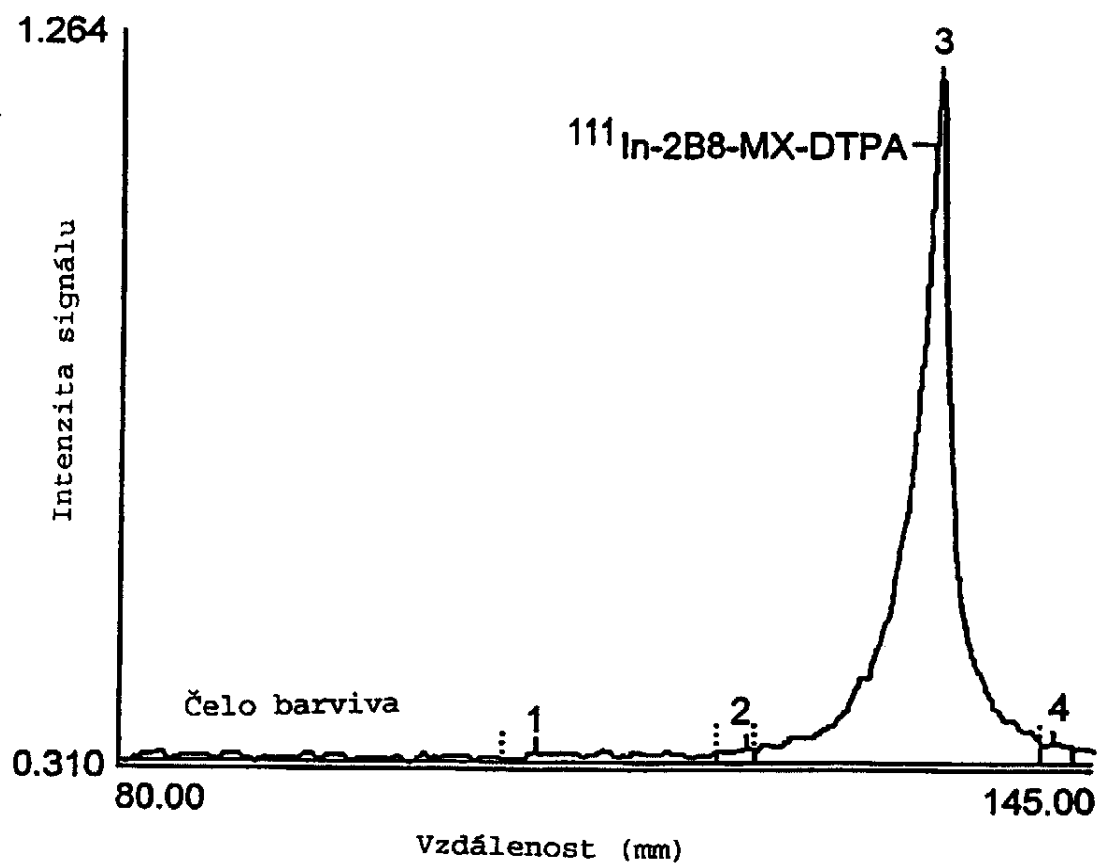
Obrázek 10

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In
v PBS obsahujícím lidský serumalbumin



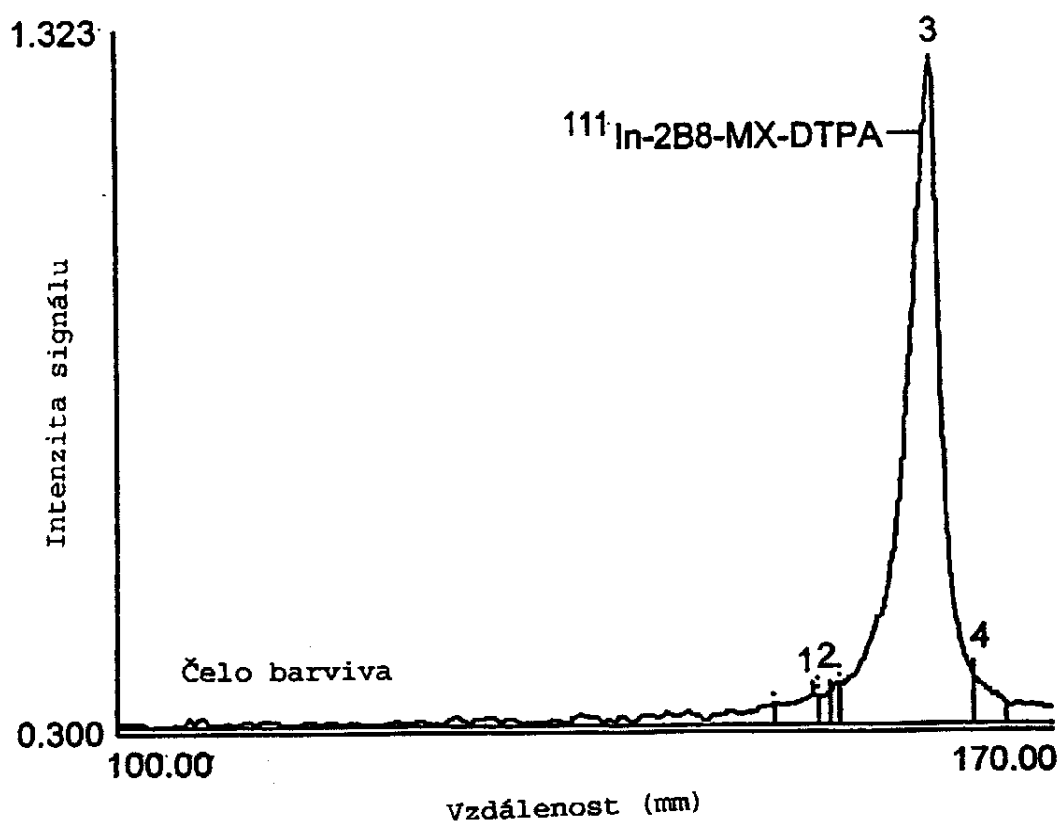
Obrázek 11

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In
v PBS obsahujícím lidský serumalbumin



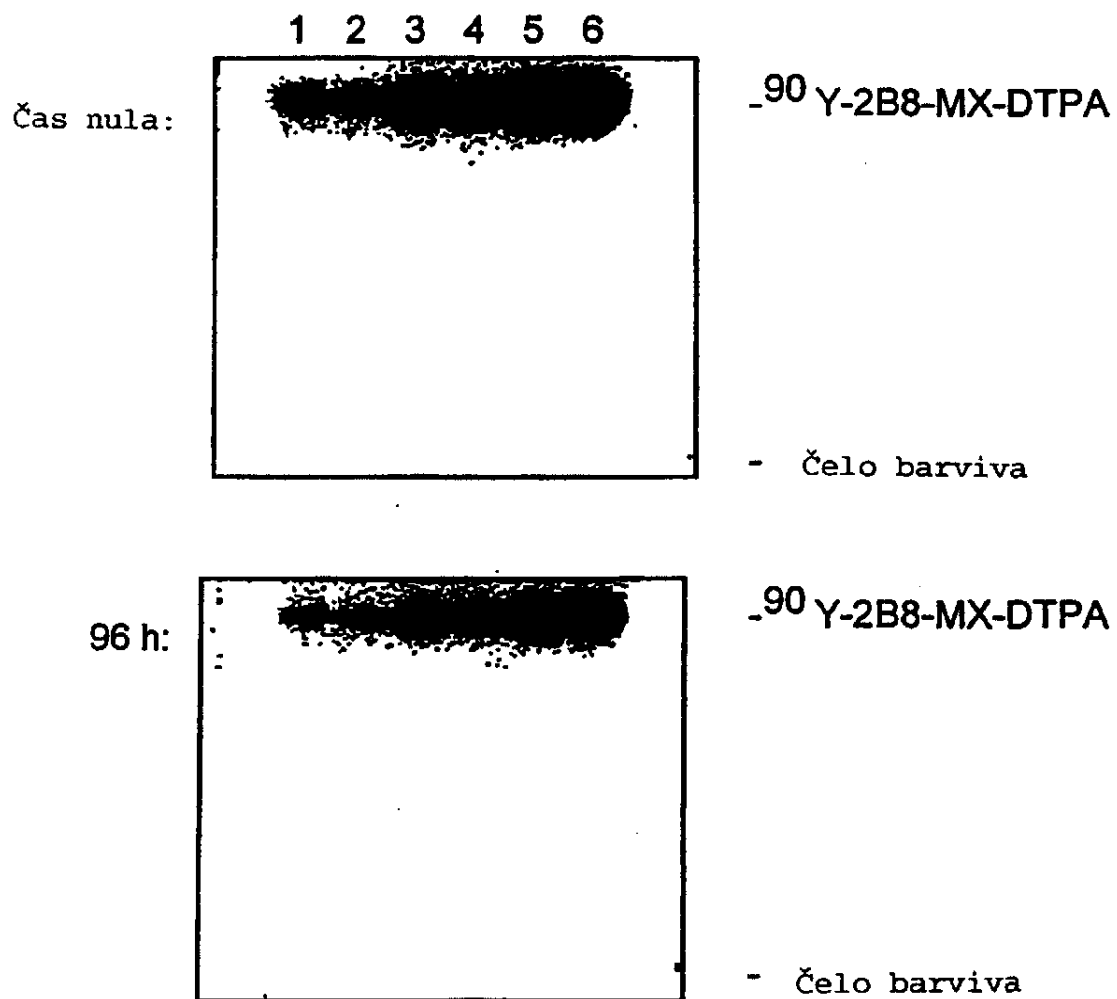
Obrázek 12

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In
v PBS obsahujícím lidský serumalbumin



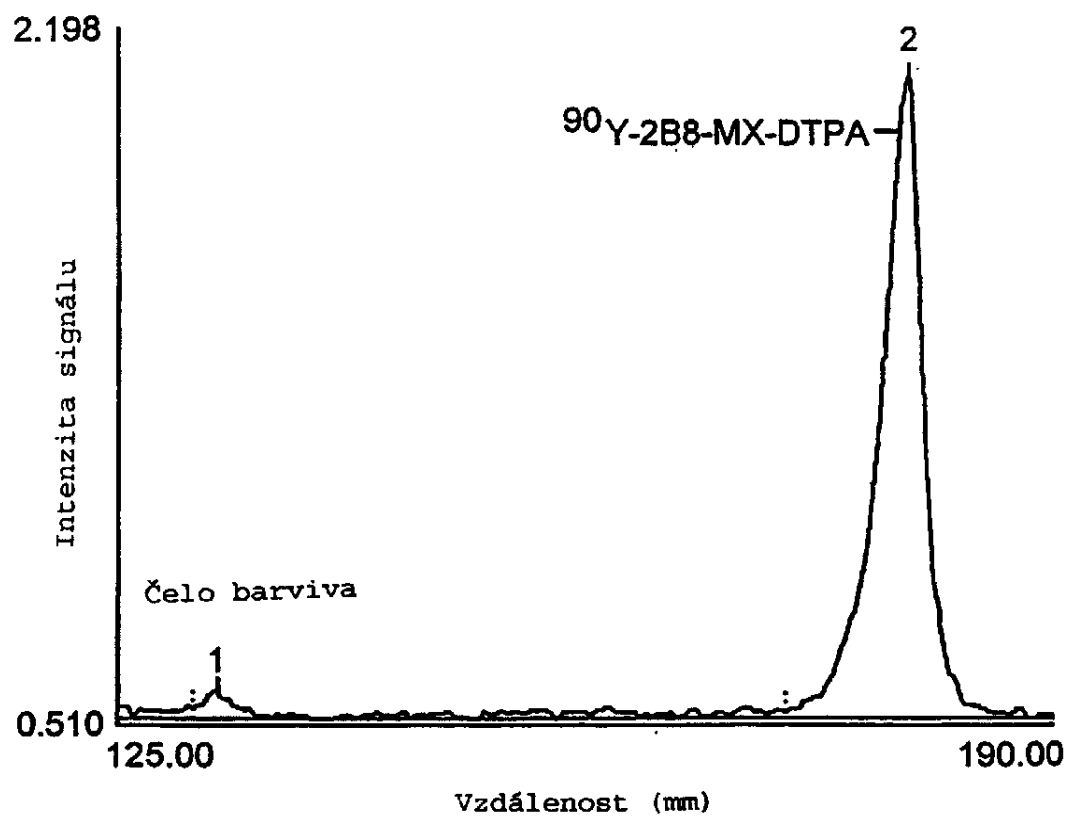
Obrázek 13

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
inkubované v lidském seru



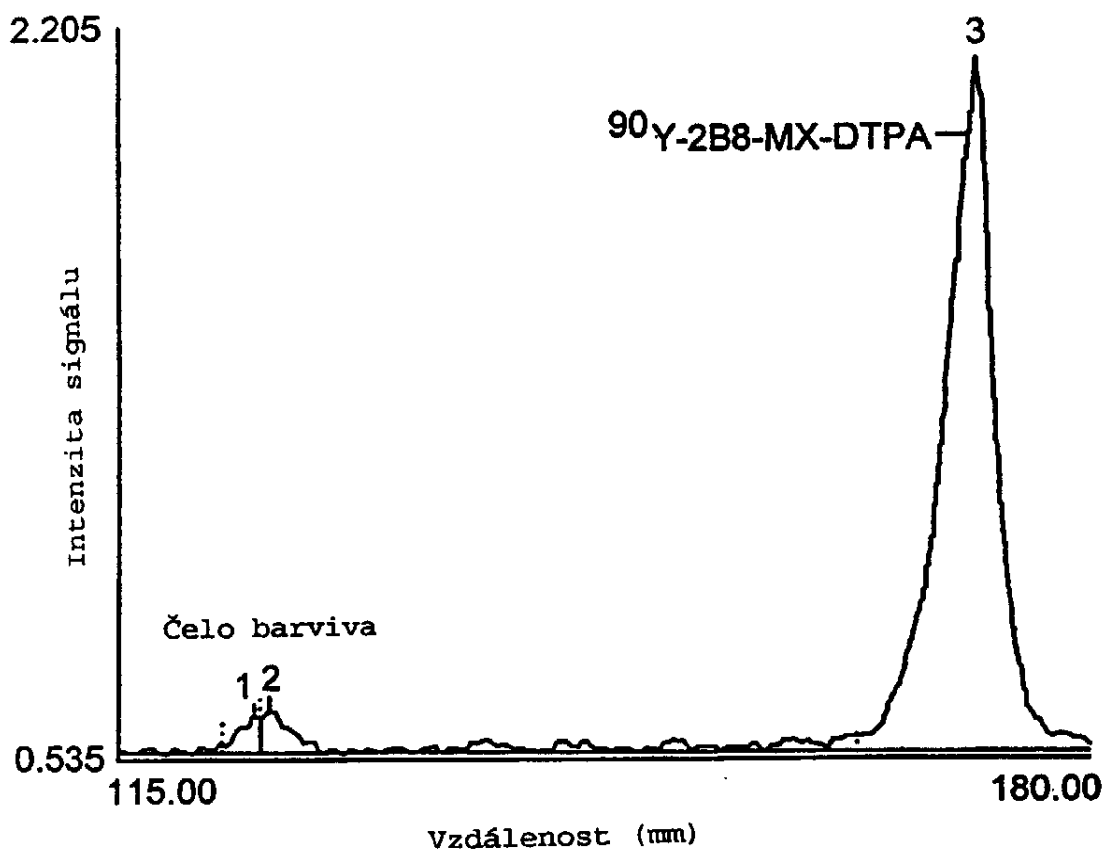
Obrázek 14

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
inkubované v lidském seru



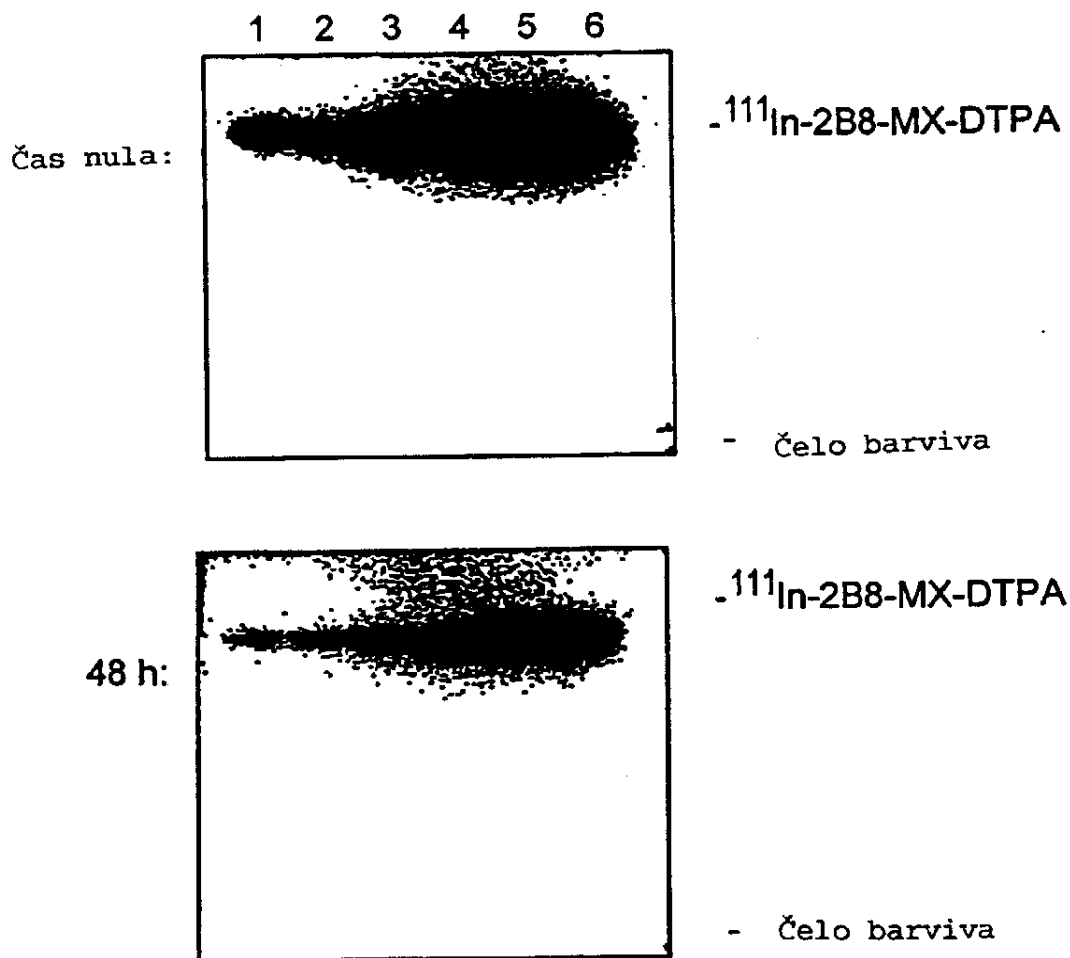
Obrázek 15

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
inkubované v lidském seru



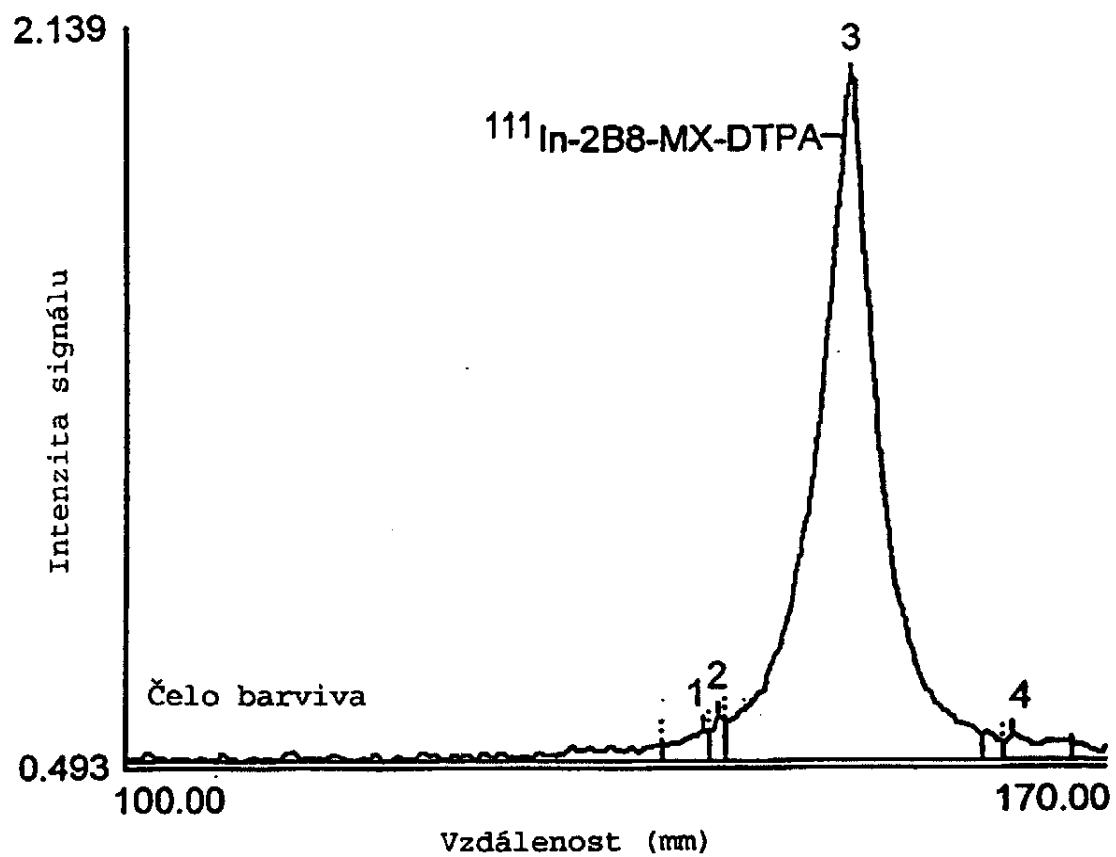
Obrázek 16

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In
v PBS obsahujícím lidský serumalbumin



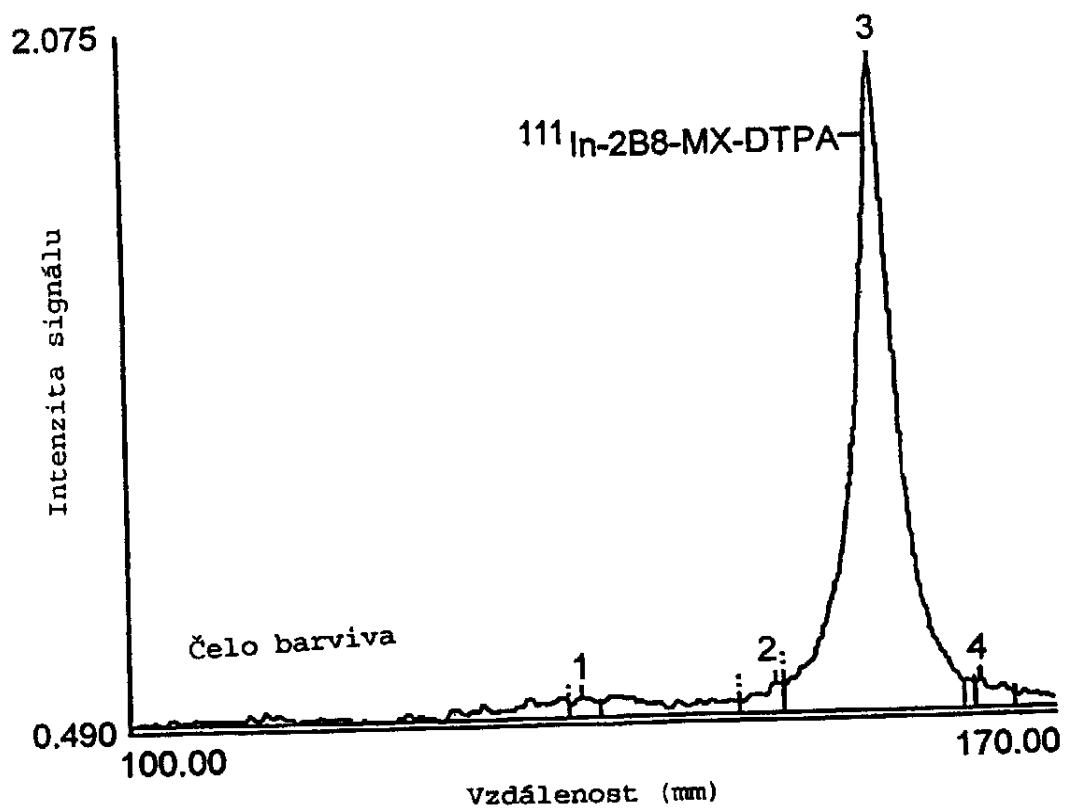
Obrázek 17

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In
inkubované v lidském seru



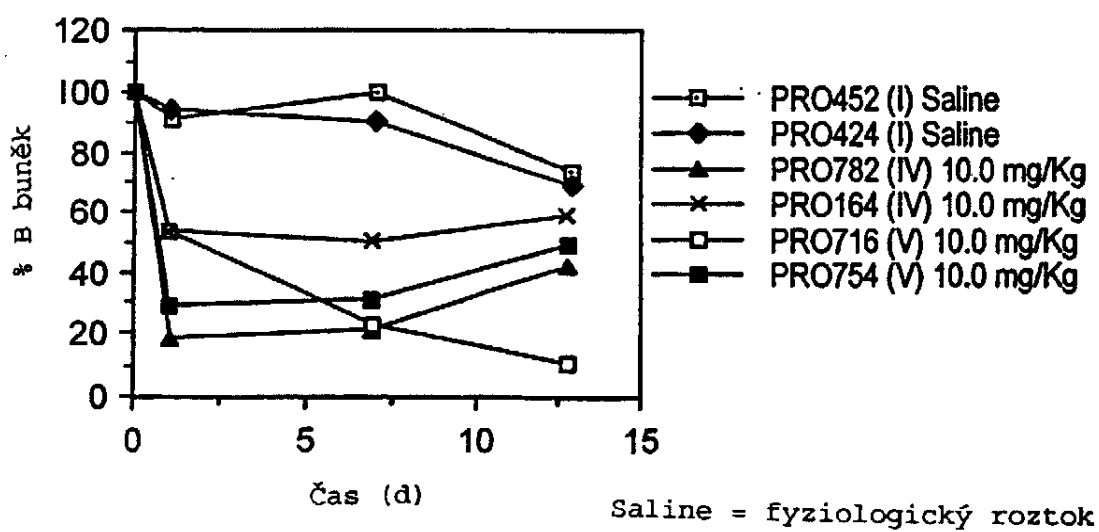
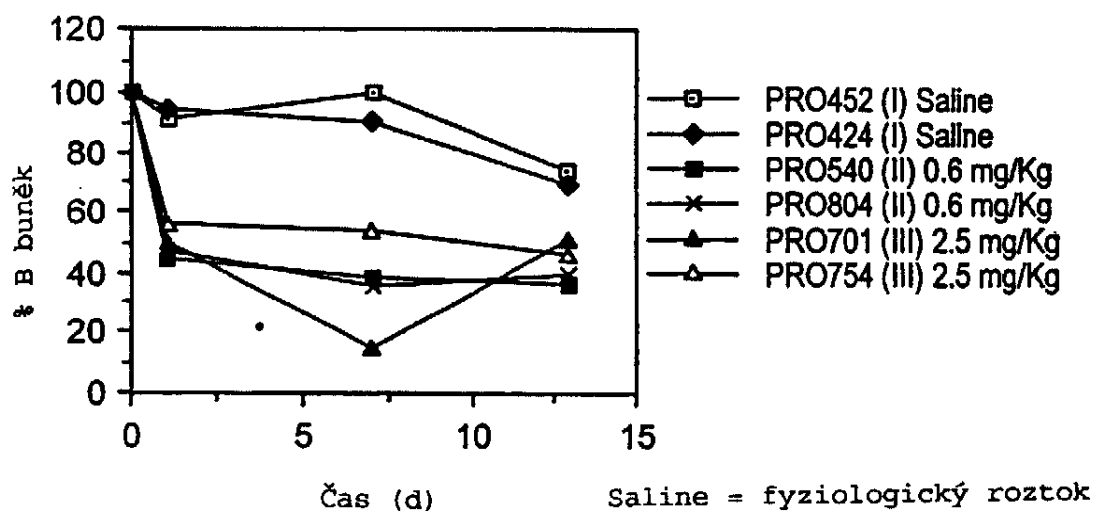
Obrázek 18

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{111}In
inkubované v lidském seru



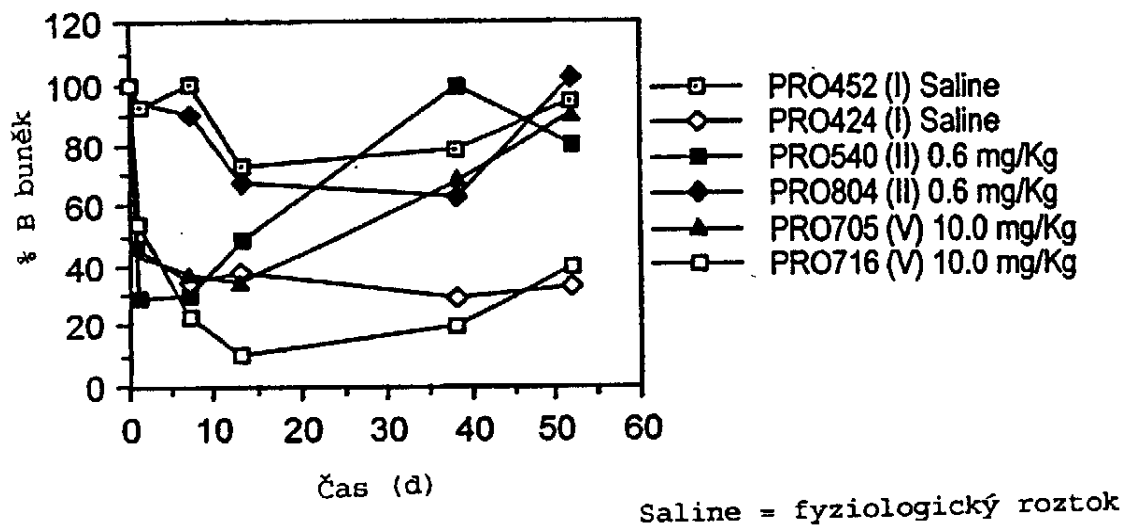
Obrázek 19

Účinek infuze 2B8 na hladiny B-lymfocytů u opic *Cynomolgus*,
den 0 až den 13



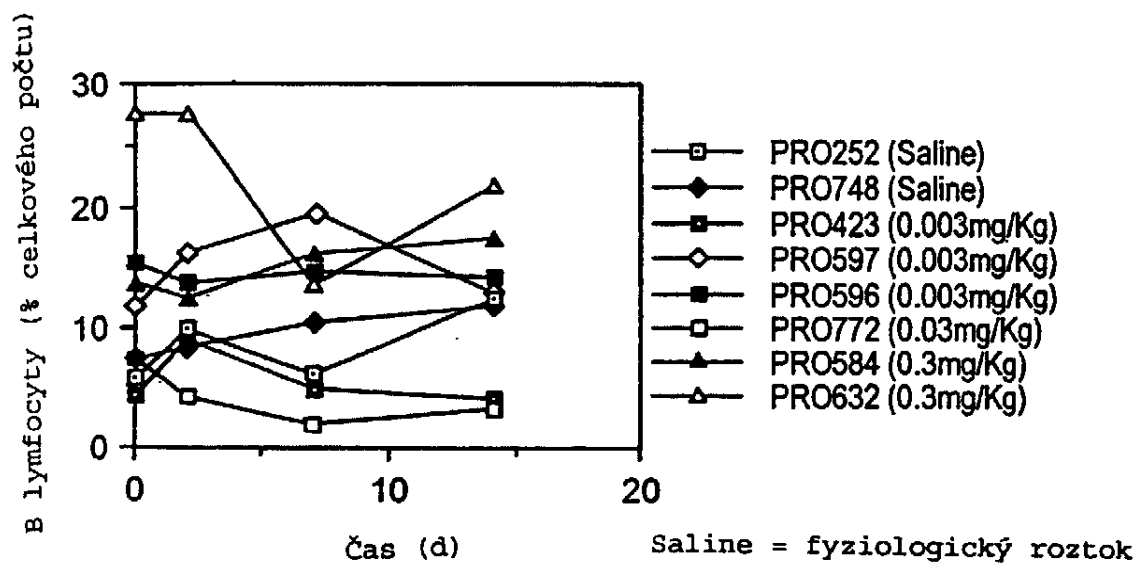
Obrázek 20

Obnovení hladin B-buněk v krevním oběhu u opic *Cynomolgus*,
které obdržely injekci myší monoklonální protilátky 2B8
proti CD20



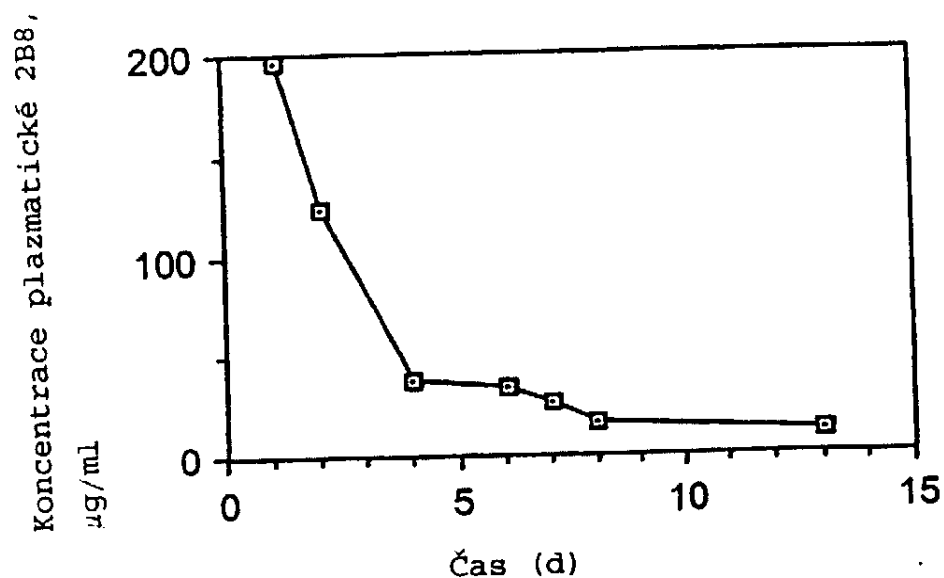
Obrázek 21

Účinek 2B8-MX-DTPA na B-buňky v krevním oběhu u opic Cynomolgus



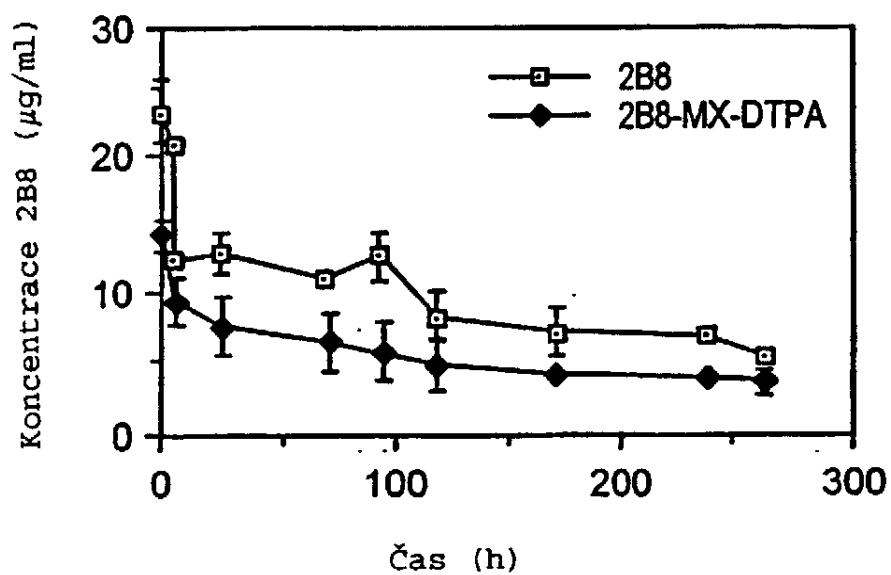
Obrázek 22A

Clearance 2B8 u opic Cynomolgus po jednom injekčním podání
10 mg/kg

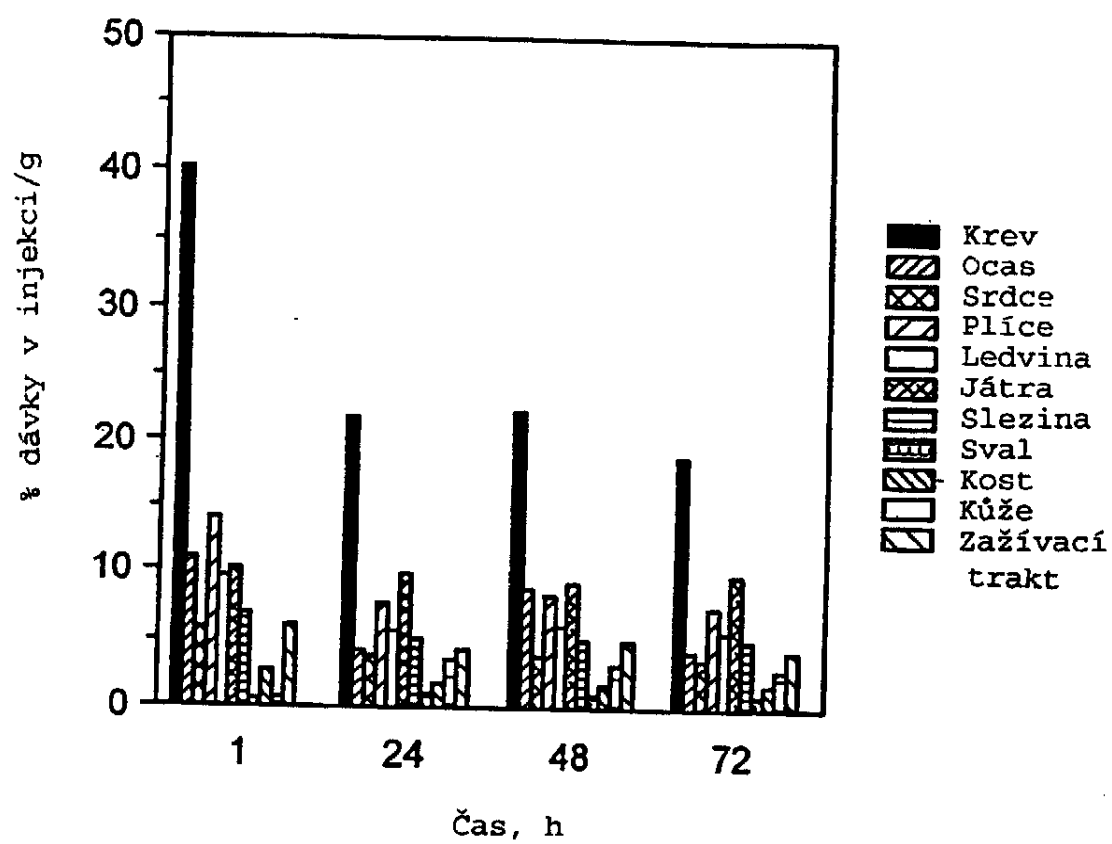


Obrázek 22B

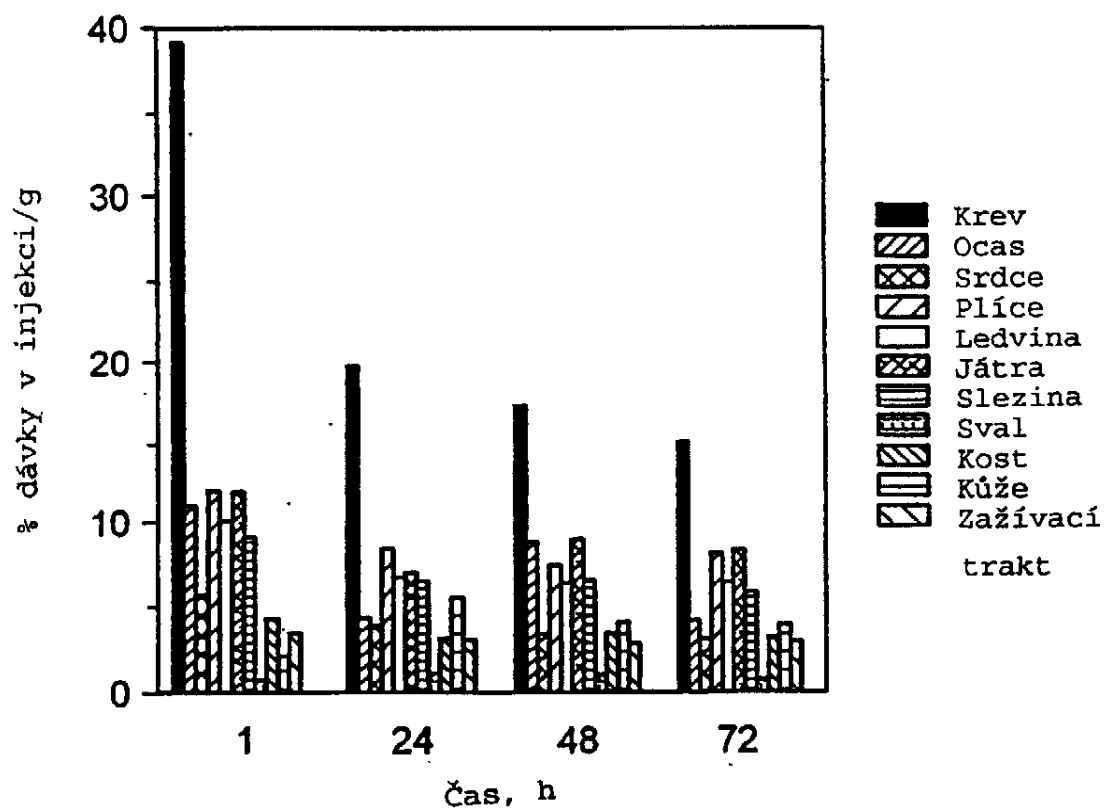
Krevní clearance 2B8, 2B8-MX-DTPA u myši BALB/c



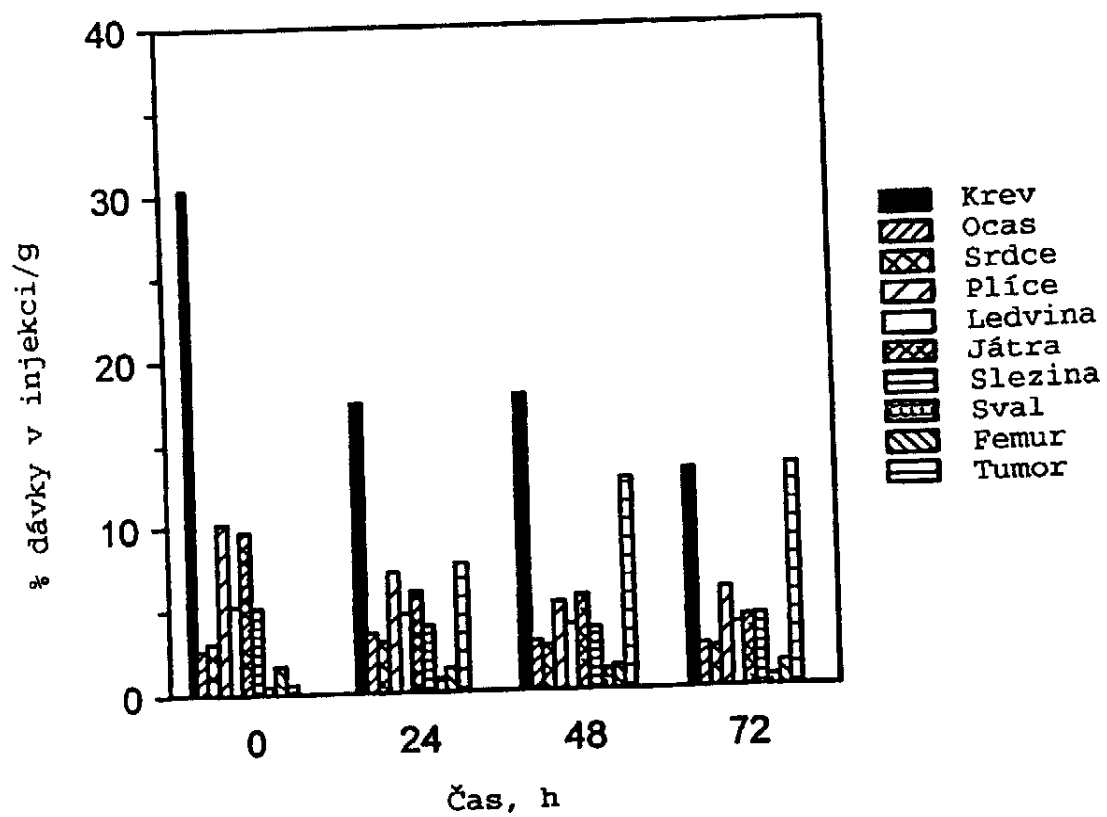
Obrázek 23

Biodistribuce ^{111}In -2B8-MX-DTPA

Obrázek 24

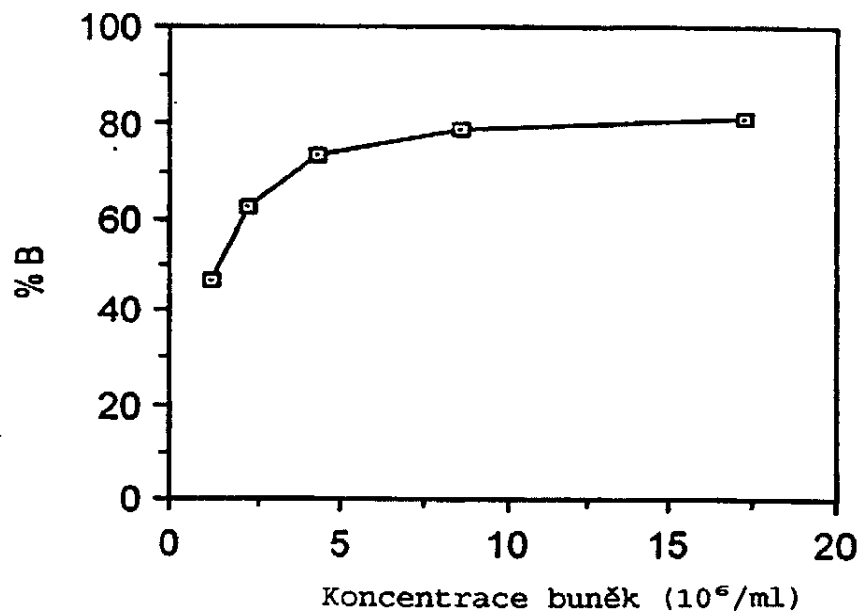
Biodistribuce ^{90}Y -2B8-MX-DTPA

Obrázek 25

Lokalizace tumoru pomocí ^{111}In -2B8-MX-DTPA

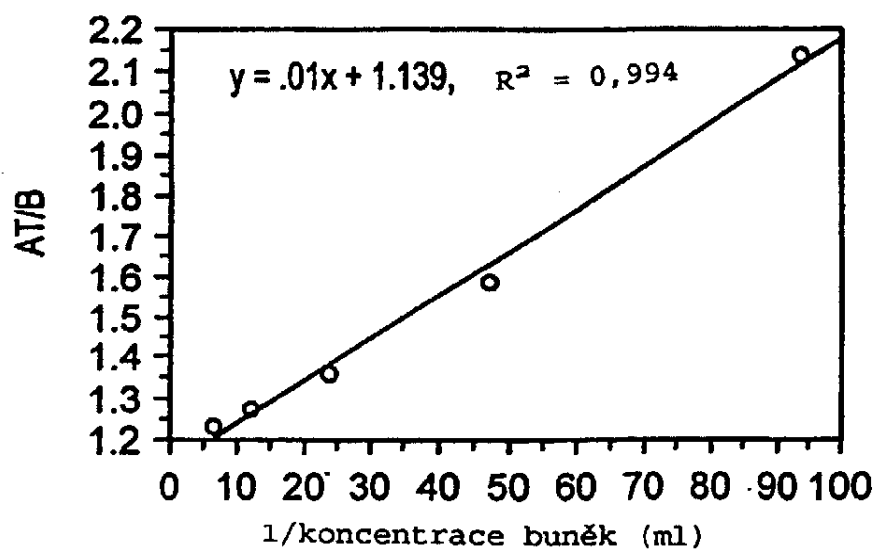
Obrázek 26A

Vazba 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y na CD20 pozitivní lidské buňky



Obrázek 26B

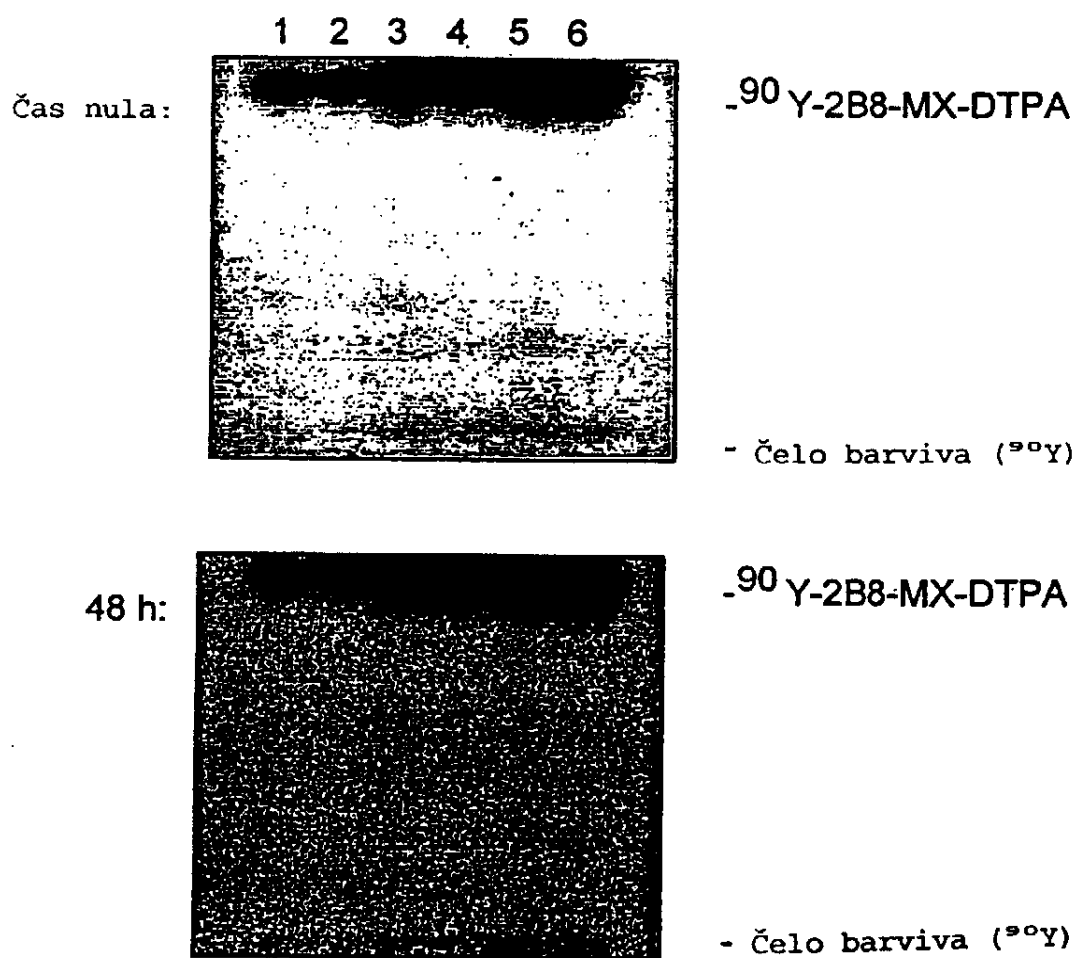
Vazba 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y na CD20 pozitivní lidské buňky



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

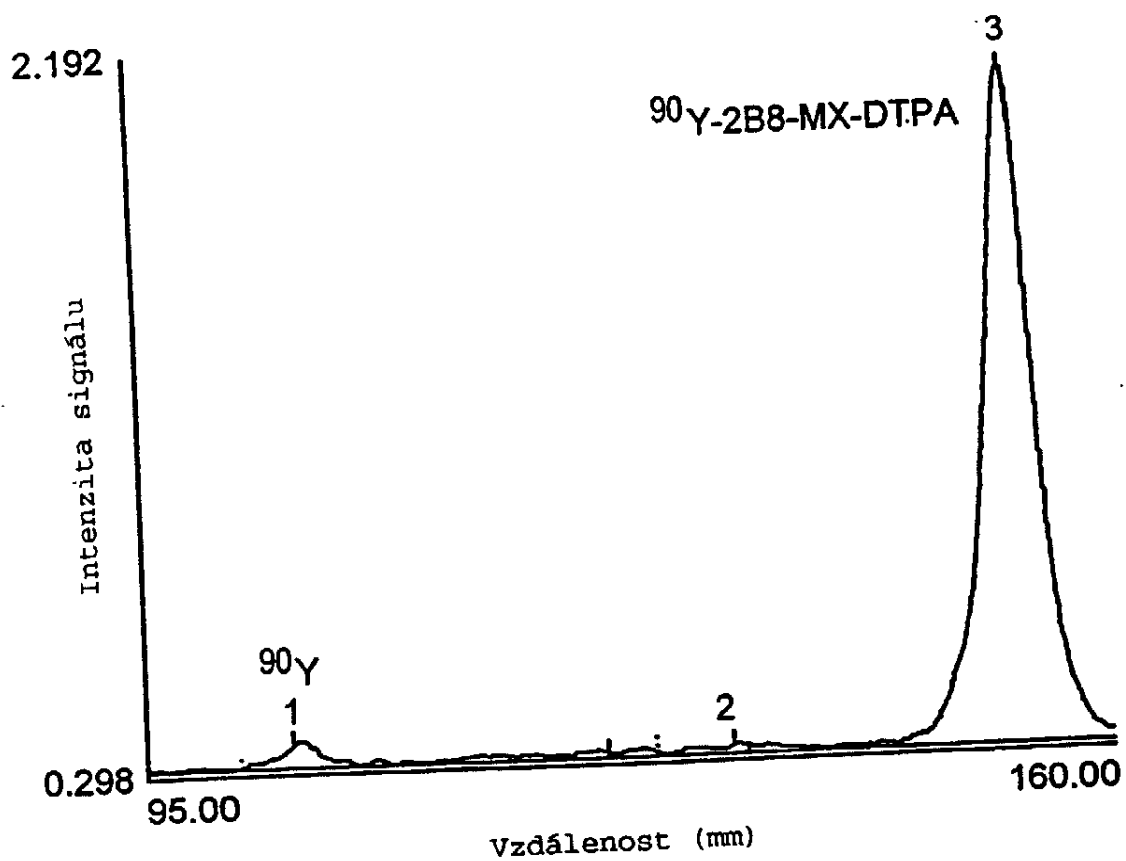
Obrázek 27

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
v PBS obsahujícím lidský serumalbumin a DTPA



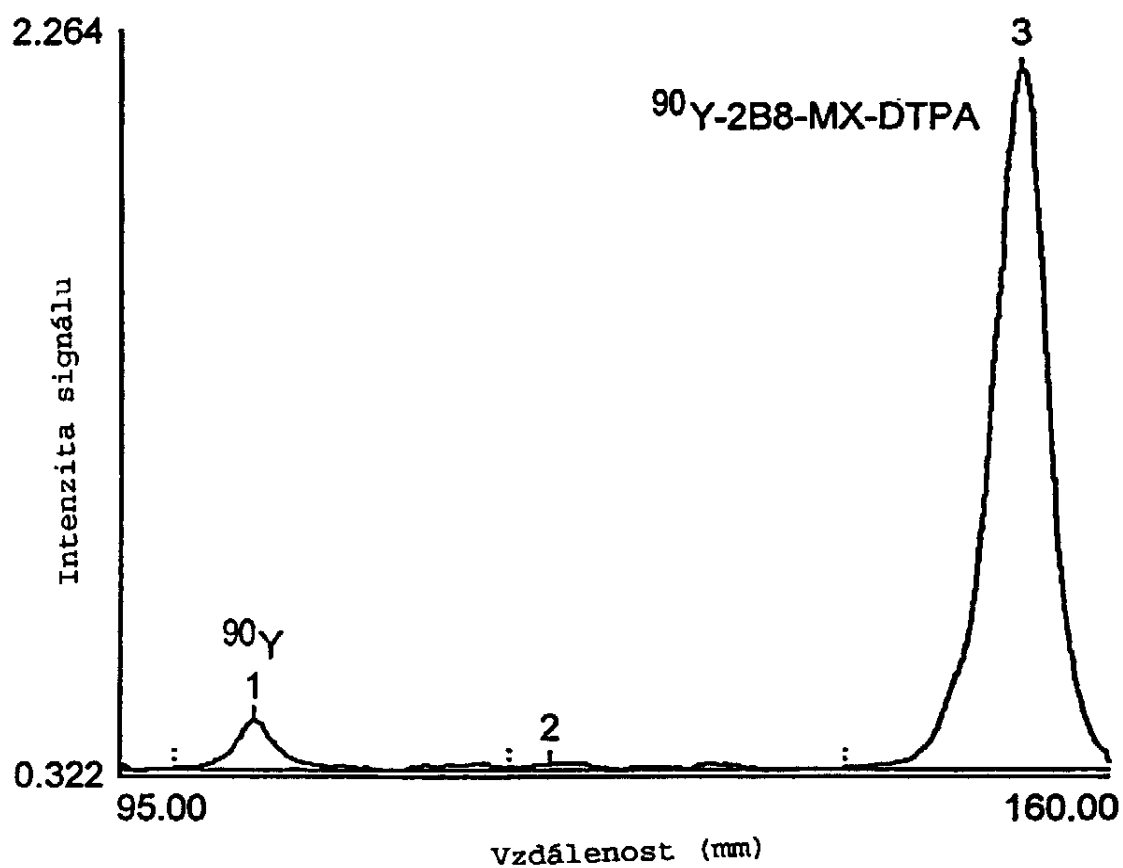
Obrázek 28

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
v PBS obsahujícím lidský serumalbumin a DTPA



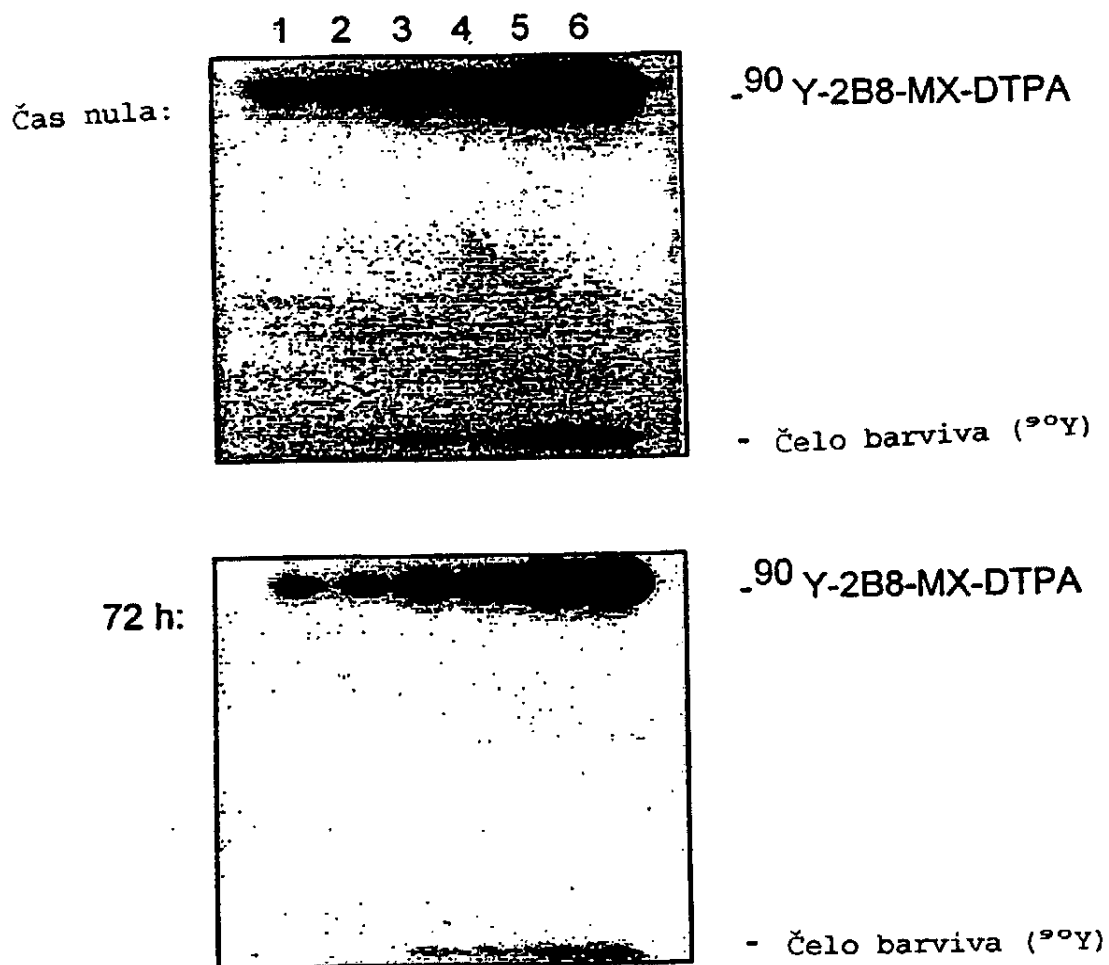
Obrázek 29

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
v PBS obsahujícím lidský serumalbumin a DTPA



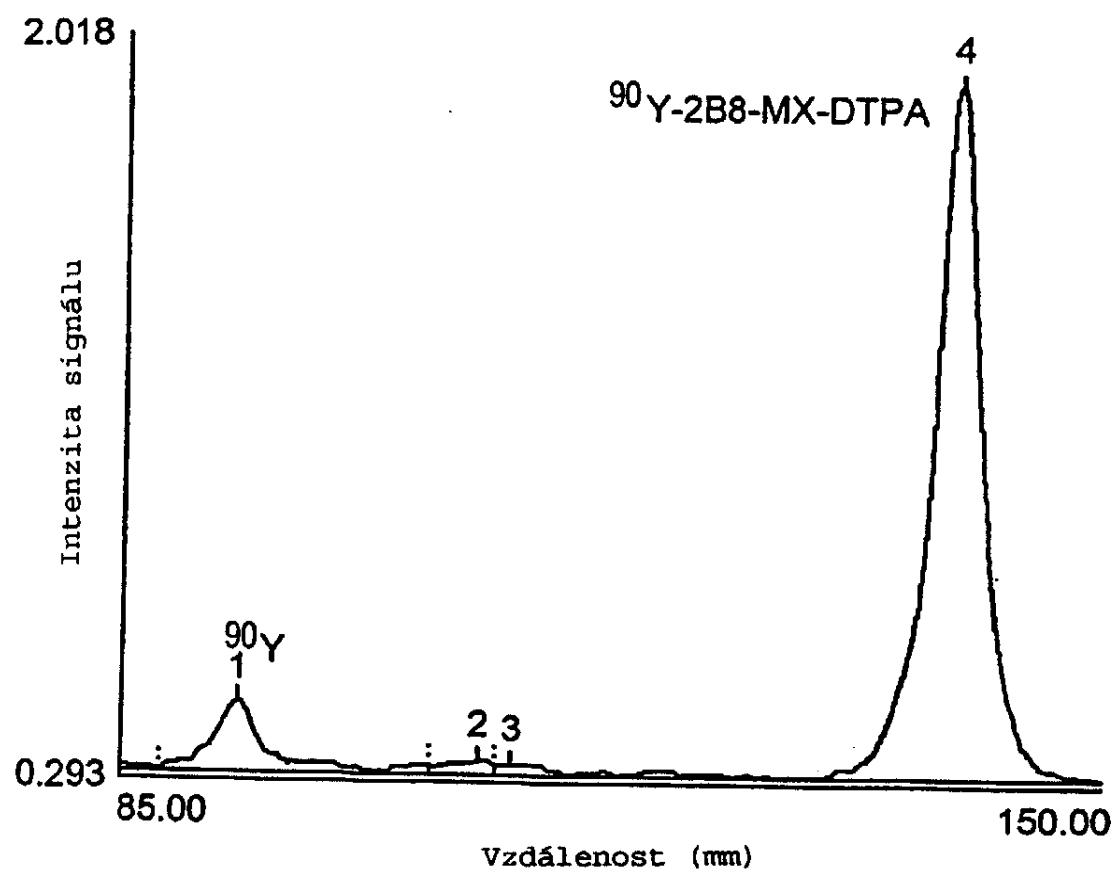
Obrázek 30

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
inkubované v lidském seru



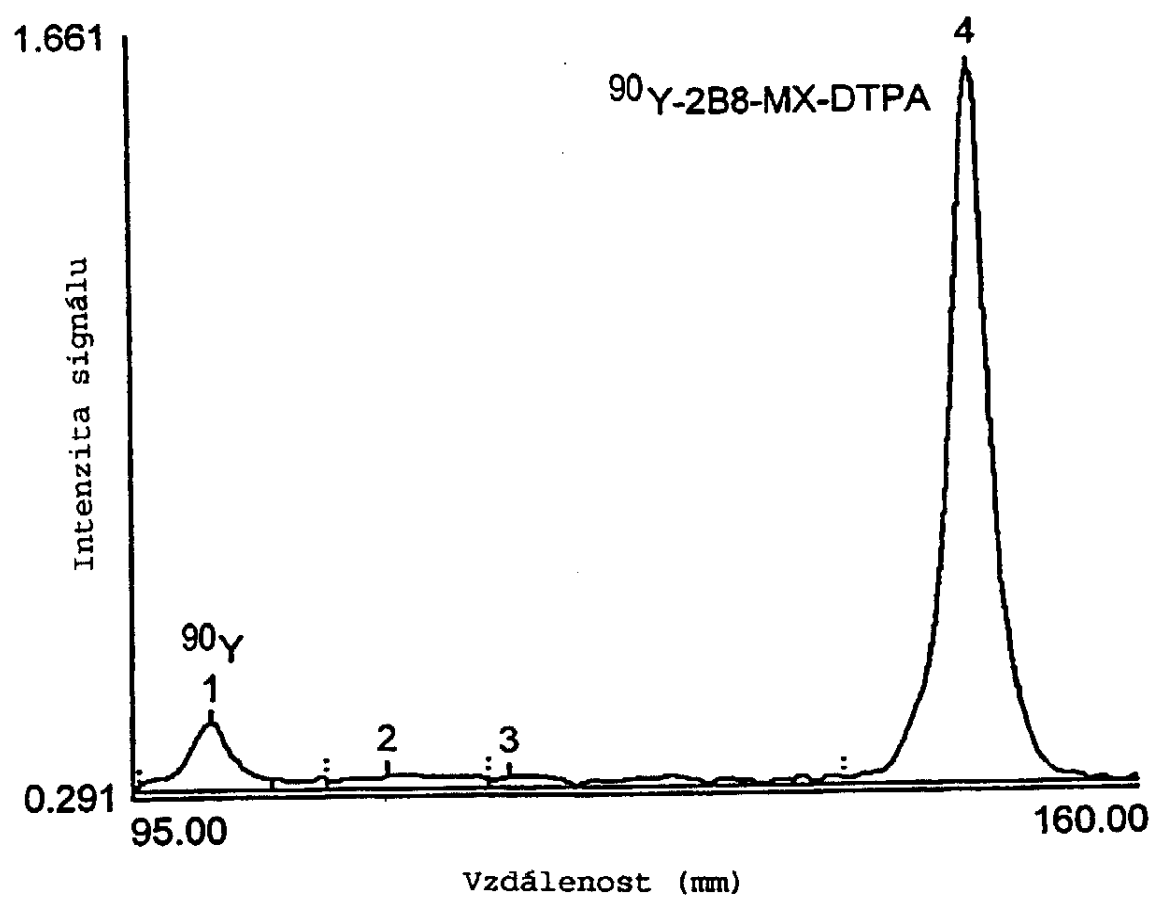
Obrázek 31

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
inkubované v lidském seru



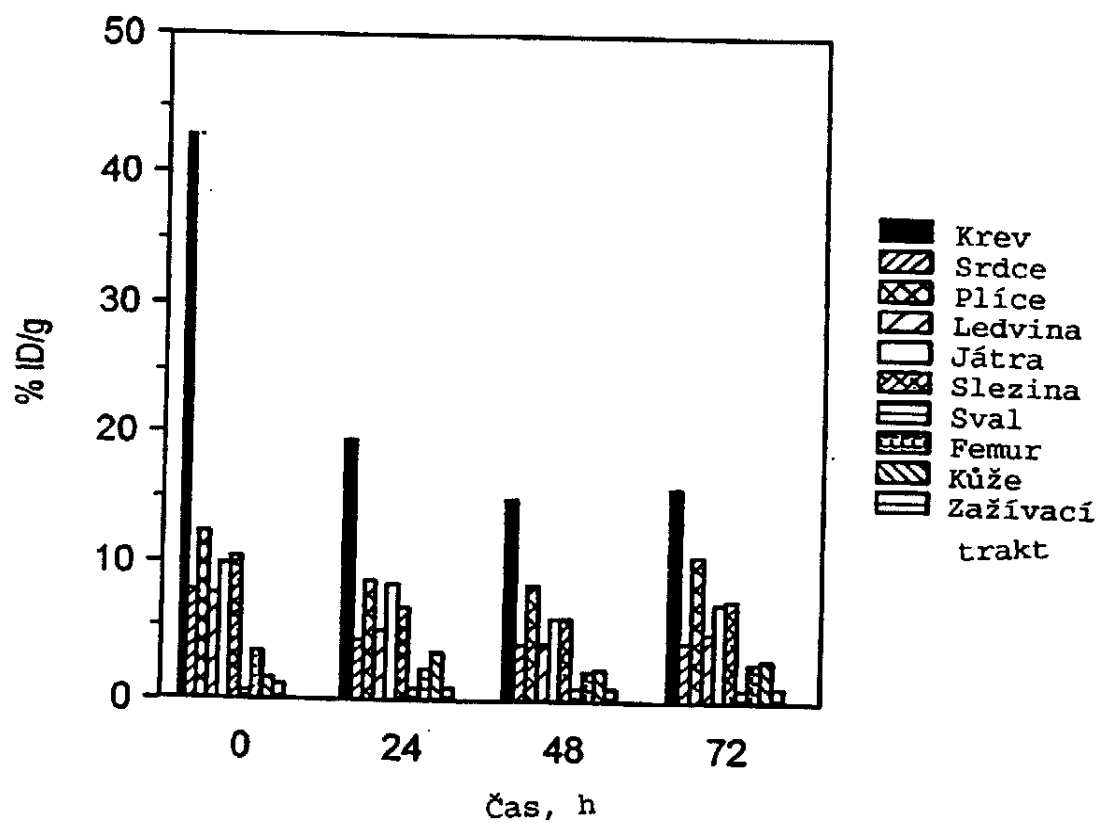
Obrázek 32

Stabilita in vitro 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y
inkubované v lidském seru



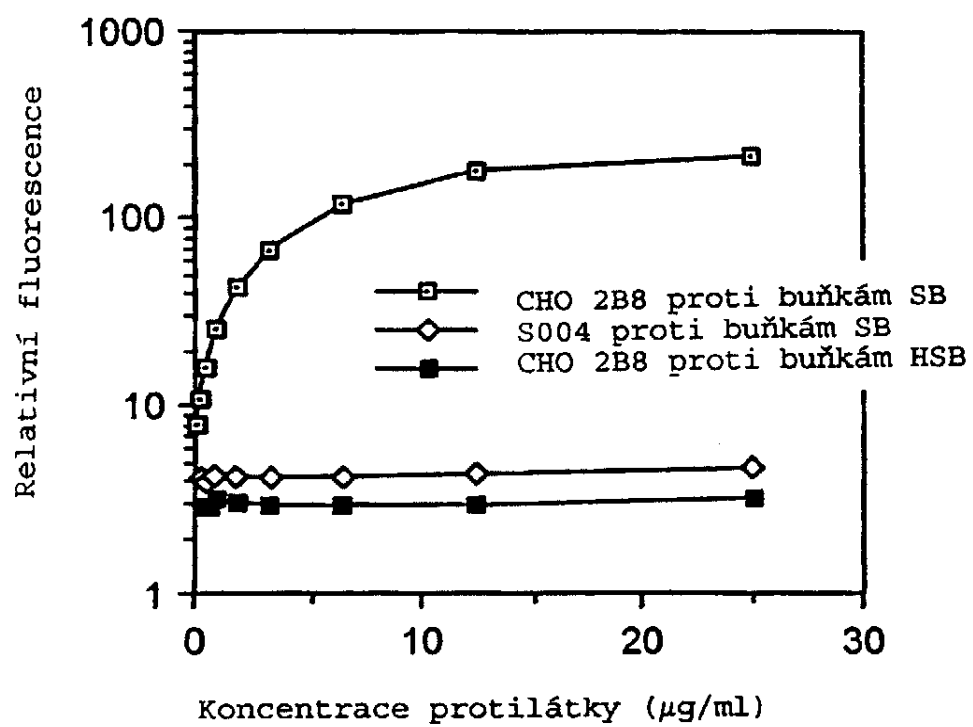
Obrázek 33

Biodistribuce 2B8-MX-DTPA značené radionuklidem ^{90}Y u myší



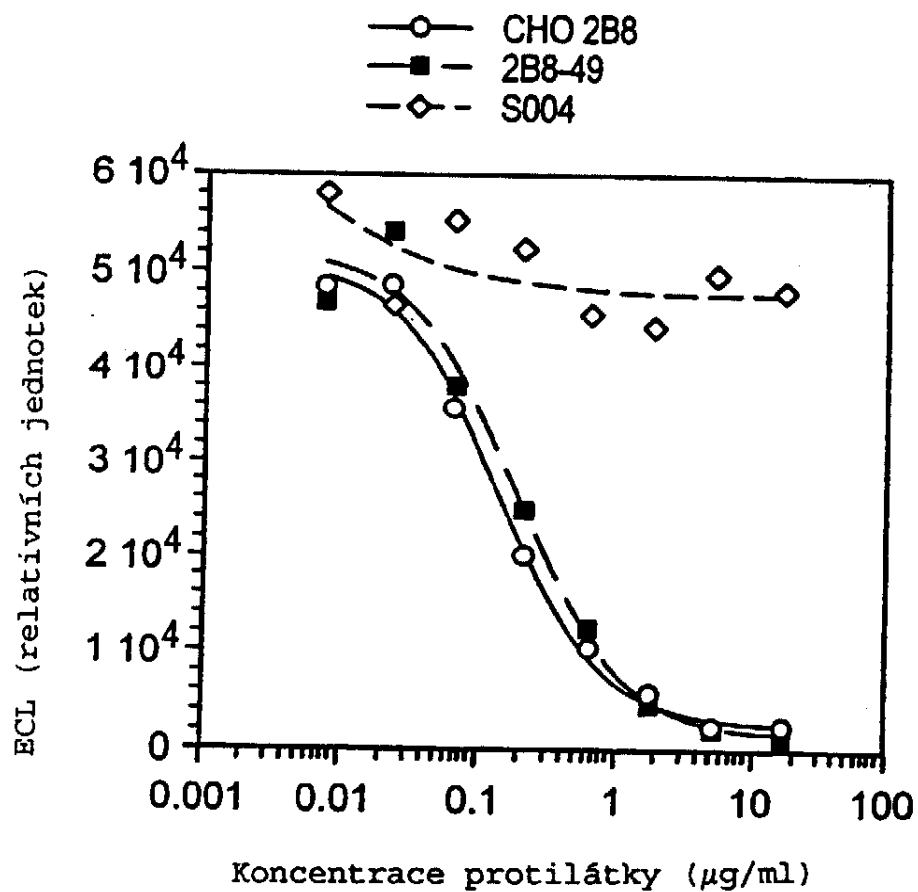
Obrázek 34

Přímá vazba 2B8 odvozené od CHO k CD20 pozitivním a CD20 negativním lidským buňkám



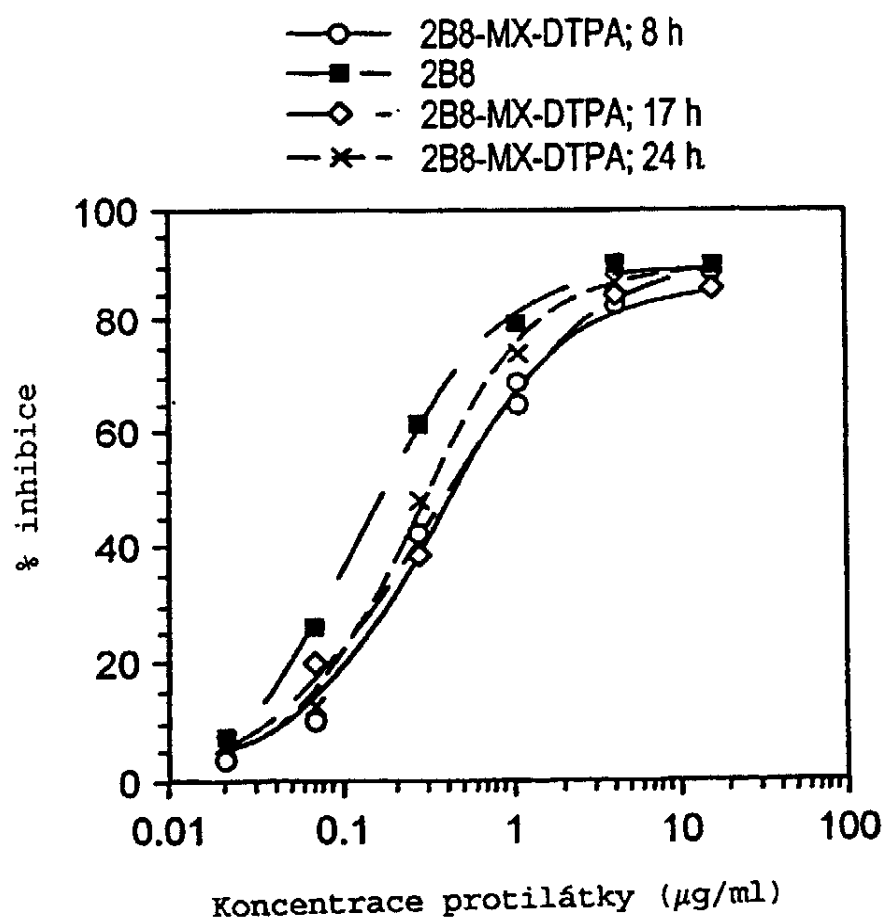
Obrázek 35

Kompetitivní vazba 2B8 odvozené od CHO na CD20 pozitivní lidské buňky



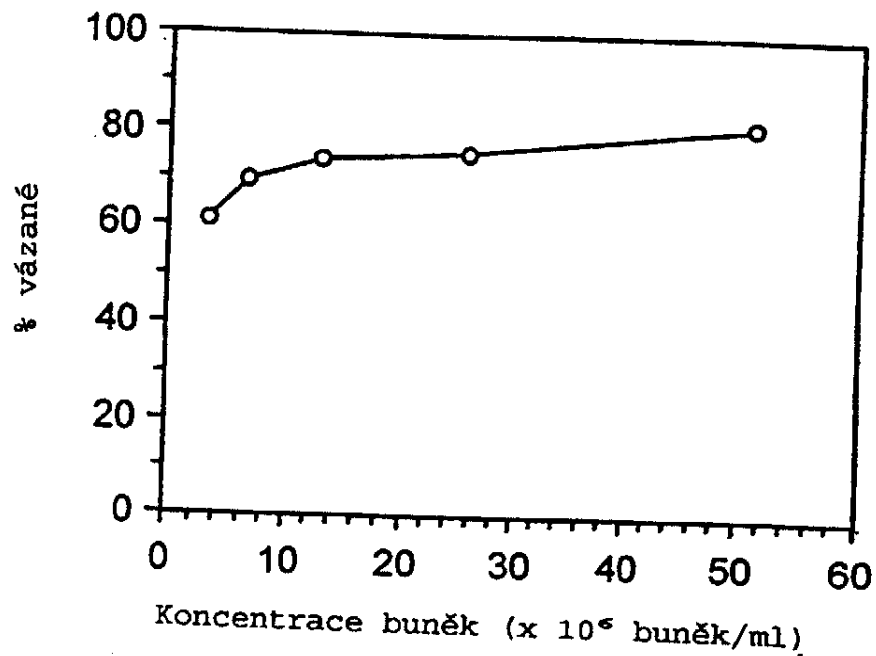
Obrázek 36

Kompetitivní vazba 2B8 odvozené od CHO a 2B8-MX-DTPA na CD20 pozitivní lidské buňky



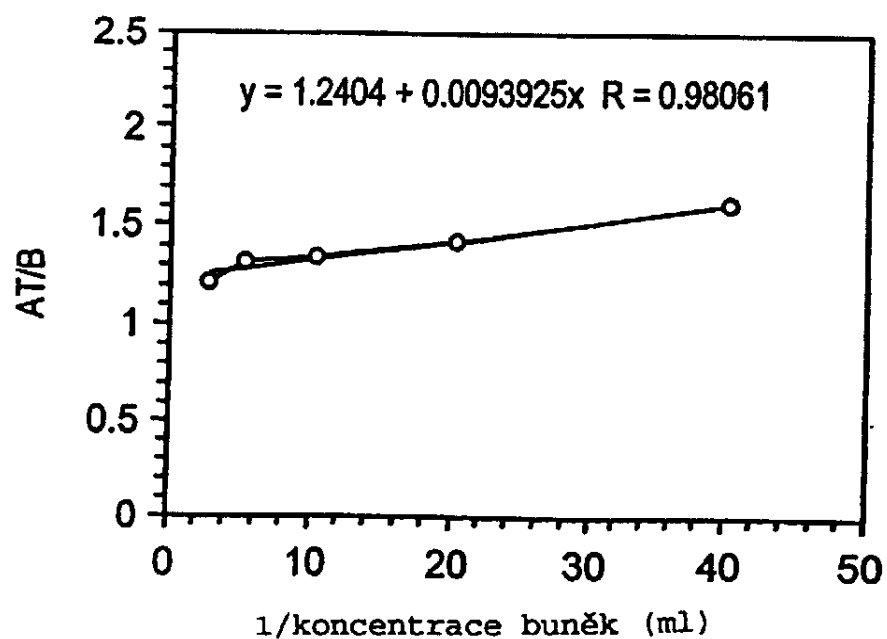
Obrázek 37A

Vazba In2B8 připravené z CHO 2B8-MX-DTPA k CD20 pozitivním buňkám



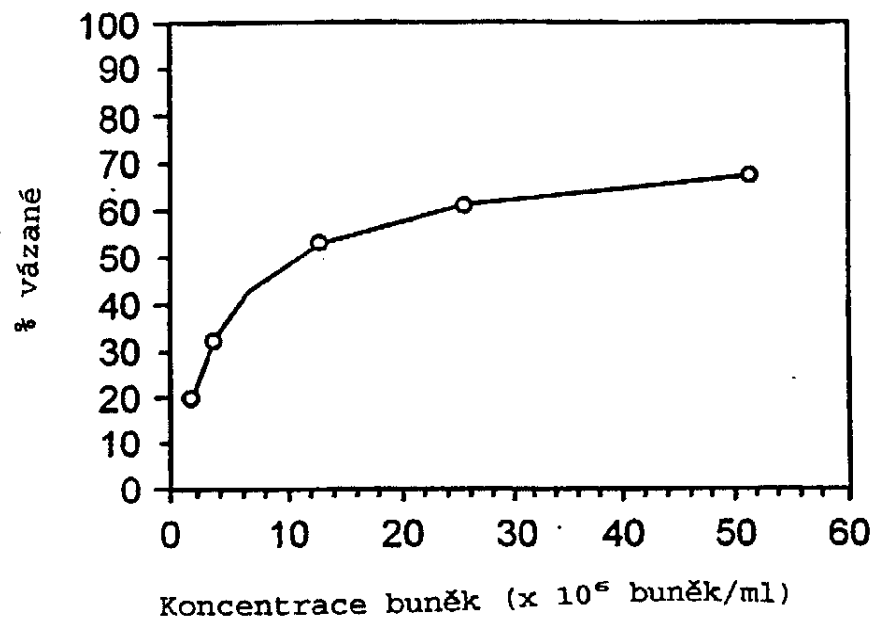
Obrázek 37B

Vazba In2B8 připravené z CHO 2B8-MX-DTPA k CD20 pozitivním buňkám



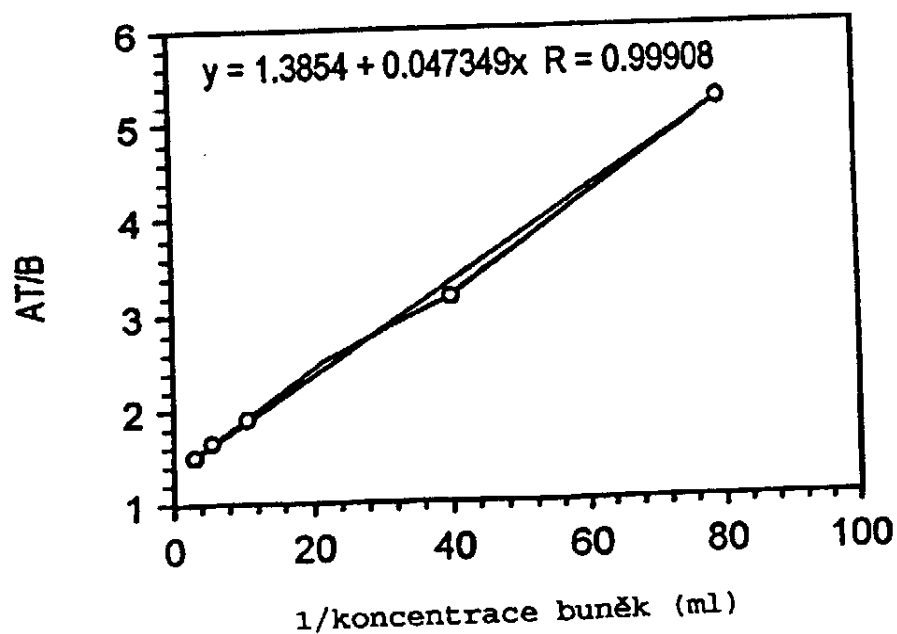
Obrázek 38A

Vazba Y2B8 připravené z CHO 2B8-MX-DTPA k CD20 pozitivním buňkám



Obrázek 38B

Vazba Y2B8 připravené z CHO 2B8-MX-DTPA k CD20 pozitivním buňkám



Konec dokumentu