

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 723**

51 Int. Cl.:

G01N 33/534 (2006.01)

G01N 33/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2000** **E 09158514 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014** **EP 2112512**

54 Título: **Kit de radiomarcaje y ensayo de unión**

30 Prioridad:

01.03.1999 US 259337

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.01.2015

73 Titular/es:

**BIOPEN IDEC INC. (100.0%)
14 CAMBRIDGE CENTER
CAMBRIDGE MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**CHINN, PAUL;
MORENA, RONALD;
LABARRE, MICHAEL y
LEONARD, JOHN E.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 526 723 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Kit de radiomarcaje y ensayo de unión

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a ensayos de unión de anticuerpo y kits de radiomarcaje, preparaciones de células liofilizadas, reactivos y protocolos para ensayar la eficacia clínica de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento/formación de imágenes de tumores y células tumorales. Específicamente, los kits de la presente descripción se usan para preparar y evaluar conjugados de anticuerpo radiomarcados que se usarán para el tratamiento y formación de imágenes de tumores de linfoma de células B tomando como diana el antígeno de la superficie de las células B, BP35
10 ("CD20").

2. Antecedentes tecnológicos

Todas las publicaciones y solicitudes de patente en la presente memoria se incorporan por referencia en el mismo grado que si se indicara específicamente e individualmente que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora por referencia.

15 El sistema inmune de los vertebrados (por ejemplo, primates, que incluyen seres humanos, simios, monos, etc.) consiste en varios órganos y tipos celulares que han evolucionado para: reconocer exactamente y específicamente microorganismos extraños ("antígeno") que invaden el huésped vertebrado; se unen específicamente a dichos microorganismos extraños; y, eliminan/destruyen dichos microorganismos extraños.

20 Los linfocitos, así como otros tipos de células, son críticos para el sistema inmune. Los linfocitos se producen en el timo, bazo y médula ósea (adulto) y representan aproximadamente el 30% de las células sanguíneas blancas totales presentes en el sistema circulatorio de los seres humanos (adulto).

25 Existen dos sub-poblaciones principales de linfocitos: células T y células B. Las células T son responsables de la inmunidad mediada por células, mientras las células B son responsables de la producción de anticuerpos (inmunidad humoral). Sin embargo, Las células T y las células B pueden considerarse como interdependientes – en una respuesta inmune típica, las células T se activan cuando el receptor de las células T se une a fragmentos de un antígeno que están unidos a glicoproteínas del complejo mayor de histocompatibilidad ("MHC") en la superficie de una célula presentadora de antígeno; dicha activación causa la liberación de mediadores biológicos ("interleuquinas") que, en esencia, estimulan a las células B para diferenciarse y producir anticuerpo ("inmunoglobulinas") frente al antígeno.

30 Cada célula B en el huésped expresa un anticuerpo diferente en su superficie – así una célula B expresará anticuerpo específico para un antígeno, mientras otra célula B expresará anticuerpo específico para un antígeno diferente. De acuerdo con esto, las células B son bastante diversas, y esta diversidad es crítica para el sistema inmune. En los seres humanos, cada célula B puede producir un número enorme de moléculas de anticuerpo (es decir, aproximadamente 10^7 a 10^8). Dicha producción de anticuerpos cesa lo más típicamente (o disminuye sustancialmente) cuando el antígeno extraño se ha neutralizado. Ocasionalmente, sin embargo, la proliferación de una célula B particular continuará sin cesar;
35 dicha proliferación puede resultar en un cáncer referido como "linfoma de células B".

40 Las células T y las células B comprenden ambas proteínas de superficie celular que pueden utilizarse como "marcadores" para la diferenciación e identificación. Un marcador de célula B humano como éste es el antígeno de diferenciación restringido para linfocitos B humanos, Bp35, referido como "CD20". CD20 se expresa durante el desarrollo temprano de células pre-B y permanece hasta la diferenciación de las células plasmáticas. Específicamente, la molécula CD20 puede regular una etapa en el proceso de activación que se requiere para el inicio del ciclo celular y la diferenciación y se expresa habitualmente a niveles muy altos en células B neoplásicas ("tumorales"). CD20, por definición, está presente tanto en células B "normales" así como células B "malignas", es decir, aquellas células B cuya proliferación sin cesar pueden dar lugar a linfoma de células B. Así, el antígeno de superficie CD20 tiene el potencial de servir como un candidato para "tomar como diana" los linfomas de células B.

- En esencia, dicho direccionamiento puede generalizarse como sigue: anticuerpos específicos para el antígeno de superficie CD20 de las células B se inyectan, por ejemplo, en un paciente. Estos anticuerpos anti-CD20 se unen específicamente al antígeno de la superficie celular CD20 de (ostensiblemente) células B tanto normales como malignas; el anticuerpo anti-CD20 unido al antígeno de superficie CD20 puede dar lugar a la destrucción y depleción de células B neoplásicas. Además, pueden conjugarse agentes químicos o marcajes radiactivos, que tienen el potencial para destruir el tumor, al anticuerpo anti-CD20 de manera que el agente se “administra” específicamente, por ejemplo, a las células B neoplásicas. Independientemente de la estrategia, un objetivo primario es destruir el tumor: la estrategia específica puede determinarse por el anticuerpo anti-CD20 particular que se utiliza y, así, las estrategias disponibles para tomar como diana el antígeno CD20 pueden variar considerablemente.
- 5
- 10 Por ejemplo, se han indicado esfuerzos para dicho direccionamiento hacia el antígeno de superficie CD20. El anticuerpo monoclonal murino (de ratón) 1F5 (un anticuerpo anti-CD20) se administró según se indica por infusión intravenosa continua a pacientes con linfoma de células B. Se indicó que se requerían niveles extremadamente altos (>2 gramos) de 1F5 para deplecionar células tumorales circulantes y se describió que los resultados eran “transitorios”. Press et al., “Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas”, *Blood* 69/2: 584-591 (1987).
- 15 Un problema potencial con esta estrategia es que los anticuerpos monoclonales no humanos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales murinos) carecen típicamente de funcionalidad efectora humana, es decir, son incapaces, entre otros, de mediar la lisis dependiente de complemento o lisar células diana humanas mediante toxicidad celular dependiente de anticuerpo o fagocitosis mediada por receptor Fc. Además, los anticuerpos monoclonales no humanos pueden ser reconocidos por el huésped humano como una proteína extraña; por lo tanto, las inyecciones repetidas de dichos anticuerpos extraños pueden dar lugar a la inducción de respuestas inmunes que dan lugar a reacciones de hipersensibilidad dañinas. Para los anticuerpos monoclonales basados en murinos, esto se refiere frecuentemente como una respuesta Humana Anti-Anticuerpo de Ratón, o respuesta “HAMA”. Además, estos anticuerpos “extraños” pueden ser atacados por el sistema inmune del huésped de manera que, en efecto, son neutralizados antes de que alcancen su sitio diana.
- 20
- 25 Los linfocitos y las células de linfoma son sensibles de manera inherente a radioterapia. Por lo tanto, las malignidades de células B son dianas atractivas para la radioinmunoterapia (RIT) por varias razones: la emisión local de radiación ionizante de anticuerpos radiomarcados puede matar a las células con o sin el antígeno diana (por ejemplo, CD20) muy cerca del anticuerpo unido al antígeno; la radiación penetrante, es decir, emisores beta, pueden obviar el problema del acceso limitado al anticuerpo en tumores voluminosos o poli vascularizados; y, la cantidad total de anticuerpo requerida puede reducirse. El radionúclido emite partículas radiactivas que pueden dañar el ADN celular hasta el punto en el que los mecanismos de reparación celular son incapaces de permitir que la célula continúe viviendo; por lo tanto, si las células diana son tumores, el marcaje radioactivo mata beneficiosamente a las células tumorales. Los anticuerpos radiomarcados, por definición, incluyen el uso de una sustancia radiactiva que puede requerir la necesidad de precauciones tanto para el paciente (es decir, posible trasplante de médula ósea) así como el médico (es decir, la necesidad de ejercer un alto grado de precaución cuando se trabaja con radiactividad).
- 30
- 35 Por lo tanto, una estrategia para mejorar la capacidad de los anticuerpos monoclonales murinos para efectuar el tratamiento de los trastornos de células B ha sido conjugar un marcaje radiactivo al anticuerpo de manera que el marcaje o toxina está localizado en el sitio del tumor. Las toxinas (es decir, agentes quimioterapéuticos tales como doxorubicina o mitomicina C) también se han conjugado a anticuerpos. Véase, por ejemplo, solicitud publicada PCT WO 92/07466 (publicada el 14 de mayo, 1992).
- 40
- 45 Se han desarrollado anticuerpos “quiméricos”, es decir, anticuerpos que comprenden partes de dos o más especies diferentes (por ejemplo, ratón y ser humano) como una alternativa a los anticuerpos “conjugados”. Se han creado anticuerpos quiméricos de ratón/humanos y se ha mostrado que presentan las características de unión del anticuerpo de ratón parental y las funciones efectoras asociadas con la región constante humana. Véase, por ejemplo, Cabilly et al., Patente U.S. 4.816.567; Shoemaker et al., Patente U.S. 4.978.745; Beavers et al., Patente U.S. 4.975.369; y Boss et al., Patente U.S. 4.816.397 todos los cuales se incorporan por referencia en la presente memoria. Generalmente, estos anticuerpos quiméricos se construyen preparando una biblioteca de genes genómica a partir del ADN extraído a partir de hibridomas murinos pre-existentes. Nishimura et al. (1987) *Cancer Research* 47: 999. La biblioteca se criba para genes de región variable tanto de cadenas pesadas como ligeras que presentan los patrones correctos de reorganización de

fragmentos de anticuerpo. Los genes de región variable clonados se ligan en un vector de expresión que contiene casetes clonados del gen de la región constante de cadena pesada o ligera humana apropiada. Los genes quiméricos se expresan en una línea celular elegida, habitualmente una línea de mieloma murino.

5 Por ejemplo, Liu, A.Y., et al., "Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity", *J. Immun.* 139/10: 3521-3526 (1987), describe un anticuerpo quimérico de ratón/humano dirigido frente al antígeno CD20. Véase, también la Publicación PCT No. WO 88/04936. Sin embargo, no se proporciona información tal como la capacidad, eficacia o practicabilidad de usar anticuerpos quiméricos de Liu para el tratamiento de trastornos de células B en la referencia.

10 Se indica que los ensayos funcionales *in vitro* (por ejemplo, lisis dependiente de complemento ("CDC"); citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo ("ADCC"), etc.) no pueden predecir de manera inherente la capacidad *in vivo* de ningún anticuerpo de destruir o deplecionar las células diana que expresan el antígeno específico. Véase, por ejemplo, Robinson, R.D., et al., "Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate different anti-tumor cell biological activities", *Hum. Antibod. Hybridomas*, 2: 84-93 (1991) (anticuerpo quimérico de ratón-humano que tiene actividad ADCC indetectable). Por lo tanto, la eficacia terapéutica potencial de los anticuerpos sólo puede evaluarse verdaderamente por
15 experimentación *in vivo*.

Para este fin, las solicitudes en tramitación con la presente 08/475.813 , 08/475.815 y 08/478.967, incorporadas en la presente memoria por referencia en su totalidad, describen conjugados anti-CD20 radiomarcados para "formación de imágenes" de diagnóstico de tumores de linfoma de células B antes de la administración de anticuerpo terapéutico. El conjugado "In2B8" comprende un anticuerpo monoclonal murino, 2B8, específico para el antígeno CD20 humano, que
20 está unido a Indio[111] (^{111}In) a través de un quelante bifuncional, es decir, MX-DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), que comprende una mezcla 1:1 de 1-isotiocianatobencil-3-metil-DTPA y 1-metil-3-isotiocianatobencil-DTPA. Indio-[111] se selecciona como un radionúclido de diagnóstico porque emite radiación gamma y encuentra un uso anterior como un agente de formación de imágenes.

Las patentes relacionadas con quelantes y conjugados de quelantes son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la
25 Patente U.S. No. 4.831.175 de Gansow está dirigida a quelatos de ácido dietilentriaminopentaacético polisustituidos y conjugados de proteína que contienen el mismo y a métodos para su preparación. Las Patentes U.S. Nos. 5.099.069, 5.246.692, 5.286.850 y 5.124.471 de Gansow también se refieren a quelatos de DTPA polisustituidos. Estas patentes se incorporan en la presente memoria en su totalidad.

El quelante bifuncional específico usado para facilitar la quelación en las solicitudes 08/475.813, 08/475.815 y
30 08/478.967 se seleccionó porque posee alta afinidad para metales trivalentes y proporciona proporciones incrementadas tumor a no tumor, captación ósea disminuida y mayor retención *in vivo* de radionúclido en los sitios diana, es decir, sitios de tumor de linfoma de células B. Sin embargo, en la técnica se conocen otros quelantes bifuncionales y también pueden ser beneficiosos en la terapia tumoral.

En las solicitudes 08/475.813, 08/475.815 y 08/478.967 también se describen anticuerpos terapéuticos radiomarcados
35 para tomar como diana y destruir linfomas de células B y células tumorales. En particular, el conjugado Y2B8 comprende el mismo anticuerpo monoclonal murino anti- CD20 humano, 2B8, unido a itrio-[90] (^{90}Y) mediante el mismo quelante bifuncional. Este radionúclido se seleccionó para terapia por varias razones. La vida media de 64 horas de ^{90}Y es lo suficientemente larga como para permitir la acumulación de anticuerpo en el tumor y, a diferencia por ejemplo de ^{131}I , es un emisor beta puro de alta energía sin irradiación gamma acompañante en su desintegración, con un intervalo de 100 a
40 1.000 diámetros celulares. La cantidad mínima de radiación penetrante permite la administración ambulatoria de anticuerpos marcados con ^{90}Y . Además, la internalización de anticuerpos marcados no se requiere para la muerte celular y la emisión local de radiación ionizante sería letal para las células tumorales adyacentes que carecen del antígeno diana.

Como el radionúclido ^{90}Y se unió al anticuerpo 2B8 usando la misma molécula de quelante bifuncional MX-DTPA, el
45 conjugado Y2B8 posee las mismas ventajas discutidas anteriormente, por ejemplo, retención incrementada del radionúclido en el sitio diana (tumor). Sin embargo, a diferencia de ^{111}In , no puede usarse para propósitos de formación de imágenes debido a la ausencia de radiación gamma asociado con él. Así, un radionúclido para "formación de imágenes" de diagnóstico, tal como ^{111}In , puede usarse para determinar la localización y tamaño relativo de un tumor

antes de y/o después de la administración de anticuerpos terapéuticos quiméricos o marcados con ^{90}Y para el propósito de reducción del tumor. Además, el anticuerpo marcado con indio permite hacer la evaluación dosimétrica.

5 Dependiendo del uso pretendido del anticuerpo, es decir, como un reactivo de diagnóstico o terapéutico, en la técnica se conocen otros radiomarcadores y se han usado para propósitos similares. Por ejemplo, los radionúclidos que se han usado en diagnóstico clínico incluyen ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{67}Ga , así como ^{111}In . Los anticuerpos también se han marcado con una variedad de radionúclidos para el uso potencial en inmunoterapia dirigida (Peirersz et al. (1987) The use of monoclonal antibody conjugates for the diagnosis and treatment of cancer. Immunol. Cell Biol. 65: 111-125). Estos radionúclidos incluyen ^{188}Re y ^{186}Re así como ^{90}Y , y en menor medida, ^{199}Au y ^{67}Cu . I-[131] también se ha usado para propósitos terapéuticos. La Patente U.S. No. 5.460.785 proporciona un listado de dichos radioisótopos y se incorpora en la presente memoria por referencia.

10 Como se ha indicado en las solicitudes en tramitación con la presente 08/475.813, 08/475.815 y 08/478.967, la administración del conjugado radiomarcado Y2B8, así como anticuerpo quimérico anti-CD20 no marcado, resultó en una reducción del tumor significativa en ratones que portan un tumor linfoblástico de células B. Además, ensayos clínicos humanos indicados en éstas mostraron una depleción significativa de células B en pacientes con linfoma infundidos con anticuerpo quimérico anti-CD20. De hecho, 2B8 quimérico ha sido proclamado recientemente como el primer anticuerpo monoclonal anti-cancerosos aprobado por la FDA del país con el nombre de Rituxan®. Así, se ha mostrado que al menos un anticuerpo quimérico anti-CD20 demuestra eficacia terapéutica en el tratamiento de linfoma de células B.

15 Además, la Solicitud U.S. No. De Serie 08/475.813 incorporada en la presente memoria por referencia, describe la administración secuencial de Rituxan®, un anti-CD20 quimérico, tanto con los dos o con uno de anticuerpo monoclonal murino marcado con indio o marcado con itrio. Aunque los anticuerpos radiomarcados usados en estas terapias combinadas son anticuerpos murinos, el tratamiento inicial con anti-CD20 quimérico depleciona suficientemente la población de células B de manera que se disminuye la respuesta HAMA, facilitando de esta manera un régimen terapéutico y de diagnóstico combinado.

20 Así, en este contexto de inmunoterapia combinada, los anticuerpos murinos pueden encontrar una utilidad particular como reactivos de diagnóstico. Además, se mostró en la Solicitud U.S. 08/475.813 que una dosificación terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD20 marcado con itrio después de la administración de Rituxan® es suficiente para (a) aclarar cualesquiera células B de sangre periférica remanentes no aclaradas por el anticuerpo anti-CD20 quimérico; (b) empezar la depleción de células B de los ganglios linfáticos; o (c) empezar la depleción de células B de otros tejidos.

25 Así, la conjugación de radiomarcadores a anticuerpos terapéuticos para el cáncer proporciona una herramienta clínica valiosa que puede usarse para evaluar la eficacia terapéutica potencial de dichos anticuerpos, crear reactivos de diagnóstico para monitorizar el progreso del tratamiento e idear reactivos terapéuticos adicionales que pueden usarse para aumentar el potencial inicial de matar tumores del anticuerpo quimérico. Dada la eficacia probada de un anticuerpo anti-CD20 en el tratamiento del linfoma no de Hodgkin, y la sensibilidad conocida de los linfocitos a la radiactividad, sería altamente ventajoso que dichos anticuerpos terapéuticos estuvieran disponibles comercialmente en forma de kit mediante lo cual pueden modificarse fácilmente con un radiomarcador y ser administrados directamente al paciente en el entorno clínico.

30 Aunque existen muchos métodos y reactivos para conseguir el radiomarcaje de anticuerpos, lo que falta en la técnica es un vehículo conveniente para poner estos reactivos en el entorno clínico, de manera que puedan producirse y administrarse fácilmente al paciente antes de que se produzca la desintegración significativa del radiomarcador o destrucción significativa del anticuerpo debido al radiomarcador. La ausencia de dichos medios convenientes para comercializar esta tecnología valiosa podría deberse a las bajas eficacias de incorporación demostradas por algunos protocolos de marcaje conocidos y la necesidad posterior de purificar por columna el reactivo después del procedimiento de radiomarcaje. El retraso en el desarrollo de dichos kits también podría deberse en parte a la ausencia previa de accesibilidad a radioisótopos comerciales puros que pueden usarse para generar productos eficazmente marcados sin purificación posterior. Alternativamente, quizá la razón de que dichos kits no estén generalmente disponibles es la ausencia real de anticuerpos que hayan sido capaces de conseguir bien la aprobación o la eficacia que ha logrado Rituxan® para el tratamiento de linfoma en pacientes humanos.

Por ejemplo, como se discute en la Patente U.S. 4.636.380, incorporada en la presente memoria por referencia, se ha creído generalmente en la comunidad científica que para que un radiofármaco encuentre utilidad clínica, debe experimentar un proceso de separación y purificación largo y tedioso. De hecho, no sería deseable inyectar radiomarcador sin unir en el paciente. La necesidad de etapas de purificación adicionales hace que el proceso de radiomarcaje de anticuerpos en el entorno clínico sea imposible, particularmente para médicos que no tienen el equipo ni el tiempo para purificar sus propios terapéuticos.

Además, las proteínas radiomarcadas pueden ser inestables de forma inherente, particularmente aquellas marcadas con isótopos radiolíticos tal como ^{90}Y , que tienen la tendencia de causar daño al anticuerpo cuánto más tiempo estén unidos a él muy cerca. A su vez, dicha radiolisis causa una eficacia poco fiable del terapéutico debido a la pérdida de radiomarcador y/o unión reducida al antígeno diana y puede dar lugar a respuestas inmunes no deseadas dirigidas a la proteína desnaturalizada. Todavía sin las instalaciones para marcar y purificar los anticuerpos *in situ*, los clínicos no han tenido otra elección que la de adquirir los anticuerpos terapéuticos ya marcados, o los han marcado externamente en una instalación relacionada y transportado al sitio de trabajo después del marcaje para la administración al paciente. Todas estas manipulaciones añaden un tiempo precioso al periodo entre el marcaje y la administración, contribuyendo de esta manera a la inestabilidad del terapéutico, mientras se disminuye en efecto la utilidad de los kits de radiomarcaje en el entorno clínico.

Otros han intentado sin éxito desarrollar kits de radiomarcaje de anticuerpos que serían lo bastante aptos como para obviar una etapa de purificación separada del anticuerpo. Por ejemplo, Cytogen ha lanzado recientemente un kit comercial para radiomarcaje de un anticuerpo monoclonal murino dirigido a la glicoproteína asociada a tumor TAG-72. Sin embargo, El anticuerpo de Cytogen es particularmente no susceptible para una formulación en kit debido a la tendencia a desarrollar materia particulada durante el almacenamiento que debe eliminarse posteriormente por una etapa de filtración adicional. Además, el anticuerpo de Cytogen ha causado reacciones adversas en pacientes debido a una respuesta HAMA.

Otros han reivindicado haber desarrollado protocolos de radiomarcaje que serían susceptibles para un formato de kit ya que no se requeriría una etapa de purificación separada (Richardson et al. (1987) Optimization and batch production of DTPA-labeled antibody kits for routine use in ^{111}In immunoscintigraphy. Nuc. Med. Commun. 8: 347-356; Chinol y Hnatowich (1987) Generator-produced yttrium-[90] for radioimmunotherapy. J. Nucl. Med. 28(9): 1465-1470). Sin embargo, dichos protocolos no fueron capaces de conseguir el nivel de incorporación que han conseguido los presentes inventores usando los protocolos descritos en la presente memoria, que han resultado en eficacias de incorporación de al menos 95%. Dicho nivel de incorporación proporciona el beneficio añadido de seguridad incrementada, ya que virtualmente no se inyectará marcador no unido al paciente como resultado de una baja radioincorporación.

Los protocolos incluidos en los kits de la presente descripción permiten un marcaje rápido que puede efectuarse en aproximadamente media hora o en tan poco como cinco minutos dependiendo del marcador. Además, los protocolos del kit de la presente descripción tienen una eficacia de marcaje de más de 95% evitando de esta manera la necesidad de purificación adicional. Evitando la necesidad de purificación adicional, la vida media del radiomarcador y la integridad del anticuerpo se reserva para el propósito terapéutico para el que se marca.

La presente solicitud describe kits y métodos convenientes mediante los cuales anticuerpos de diagnóstico y terapéuticos pueden radiomarcarse y administrarse a un paciente de una manera reproducible, fiable y conveniente. Los kits de la presente descripción transforman el proceso de radiomarcarse anticuerpos en un proceso estandarizado sin dificultad, sin preocupación, que facilita en gran medida los protocolos de tratamiento del paciente. Los presentes kits proporcionan ventajas sobre la técnica anterior ya que se han determinado los parámetros óptimos para marcar y administrar anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico, reduciendo de esta manera el coste de productos. Como los kits descritos en la presente memoria proporcionan los parámetros óptimos según el marcador particular, el uso de un kit diseñado para un marcador particular también minimizará la canibalización, es decir, que ocurre cuando un kit inapropiado se usa para un marcador particular. El evitar la canibalización también proporciona a su vez una eficacia óptima de marcaje. Además, los protocolos e ingredientes estériles sin pirógenos incluidos con cada kit hacen que el proceso sea más fácil de usar, ya que se obvia el ensayo de esterilidad, de pirógenos y purificación posterior al marcaje de los reactivos.

3. Resumen de la invención

Tomando como base la descripción que está contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona un método para radiomarcado un anticuerpo conjugado con un quelante con ^{111}In para la administración a un paciente que comprende:

- 5 (i) mezclar el anticuerpo conjugado con quelante con una disolución que contiene ^{111}In para formar una mezcla;
- (ii) incubar la mezcla a una temperatura apropiada durante aproximadamente 30 minutos para producir un anticuerpo radiomarcado, en el que el anticuerpo radiomarcado tiene más de 95% de radioincorporación, y
- (iii) diluir el anticuerpo radiomarcado en un tampón de formulación hasta una concentración apropiada para la administración al paciente, de manera que puede administrarse directamente al paciente sin purificación adicional de ^{111}In no incorporado, en el que el tampón de formulación comprende disolución salina tamponada con fosfato o disolución salina fisiológica, un radioprotector y quelante no conjugado.

La presente invención, y realizaciones de ésta, se muestran en las reivindicaciones adjuntas.

Más generalmente, sin embargo, la presente descripción describe un kit para el radiomarcado de un anticuerpo de diagnóstico o terapéutico antes de la administración a un paciente que comprende al menos (i) un vial que contiene un anticuerpo conjugado con un quelante, (ii) un vial que contiene tampón de formulación para estabilizar y administrar el anticuerpo radiomarcado, y (iii) instrucciones para el radiomarcado del anticuerpo, en el que dichos componentes del vial se suministran en una cantidad tal y en una concentración tal que cuando se combinan con un radiomarcador con la pureza y actividad suficientes según las instrucciones del kit, no se requiere purificación adicional del anticuerpo marcado antes de la administración a dicho paciente. Además, cuando se marca según las instrucciones del kit y con un radioisótopo con la pureza y actividad suficientes, dicha incorporación de isótopo puede alcanzar niveles mayores de 95% e incluso tan altos como 98% o mayores.

El anticuerpo incluido en el kit es lo más preferiblemente un anticuerpo anti-CD20. El anticuerpo se suministra en una forma mediante la cual está unido a un quelante bifuncional. Preferiblemente, el anticuerpo está conjugado con MX-DTPA, pero pueden usarse otros quelantes tales como DTPA conjugado con fenilo o bencilo, ciclohexil-DTPA, derivados de EDTA y DOTA. Un quelante según la presente invención puede ser cualquier quelante que es al menos bifuncional, es decir, que posee al menos dos sitios de unión (al menos un sitio para quelar un ion metálico y al menos un sitio para acoplamiento con un ligando proteico).

Dependiendo del anticuerpo usado, el anticuerpo conjugado se suministra típicamente a una concentración de 0,5 a 30 mg/ml, más preferiblemente 2 mg/ml. El volumen del anticuerpo conjugado dependerá de la concentración y la cantidad requeridas para el marcaje óptimo dependiendo del radiomarcador. Sin embargo, el anticuerpo conjugado debe suministrarse en un volumen y concentración tales que el volumen completo se añadirá al vial de reacción usando una jeringa estéril y técnica aséptica. Esto permitirá una reproducibilidad y facilidad de uso incrementadas. Todos los reactivos de los kits descritos en la presente memoria son estériles y sin pirógenos, y específicamente diseñados para simplicidad y velocidad en el avance directo desde el ensayo del anticuerpo a la administración. Con algunos marcadores, puede no requerirse la necesidad de ensayar la eficacia del marcaje.

Un componente particularmente ventajoso del kit es el tampón de formulación para estabilizar frente a los efectos de la radiolisis y administrar el anticuerpo conjugado radiomarcado a un paciente. El tampón de formulación es un vehículo farmacéuticamente aceptable que sirve tanto como un diluyente para el anticuerpo marcado como un tampón de administración. Aunque puede usarse cualquier diluyente farmacéuticamente aceptable para administrar anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico al paciente, el tampón de formulación de la presente descripción es particularmente adecuado para administrar anticuerpos radiomarcados.

Por ejemplo, el tampón de formulación de la presente descripción comprende un radioprotector tal como albúmina de suero humano (HSA) o ascorbato, que minimiza la radiolisis debida al itrio, y en menor grado, indio. En la técnica se conocen otros radioprotectores y también podrían usarse en el tampón de formulación de la presente descripción, es decir, secuestradores de radicales libres (fenol, sulfitos, glutatión, cisteína, ácido genticónico, ácido nicotínico, palmitato de ascorbilo, $\text{HOP}(:\text{O})\text{H}_2$, glicerol, sulfoxilato de formaldehído sódico, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, y SO_2 , etc.).

Debe indicarse que, aunque los radioprotectores se emplean generalmente en el tampón de formulación para proteger al anticuerpo de la radiolisis, puede ser posible para efectuar una protección adicional incluir también el radioprotector en el tampón de reacción. Esto no se ha hecho antes generalmente, es decir, con HSA, debido a la presencia de metales que interferirían con el proceso de marcaje. Sin embargo, puede ser posible “limpiar” la HSA usando una resina quelante de manera que también podría incluirse en el tampón de reacción. También puede ser necesario tratar el ascorbato u otros radioprotectores para eliminar metales contaminantes.

El tampón de formulación de la presente descripción también comprende un exceso de quelante no conjugado. El propósito de incluir quelante no conjugado es que este quelante sirve para secuestrar el radiomarcador no unido a proteína en el paciente, y efectúa la excreción del radiomarcador reduciendo de esta manera la captación de isótopos “buscadores de hueso”, es decir, ^{90}Y , por los huesos del paciente. Por ejemplo, cuando el anticuerpo del kit se conjuga con un quelante DTPA, puede incluirse en el tampón de formulación exceso de DTPA o cualquier otro quelante. El tampón de formulación también se suministra preferiblemente en un volumen tal que los contenidos completos se transfieren al vial de reacción. Como se ha discutido anteriormente, esto resulta en una facilidad de uso y reproducibilidad incrementadas porque no tienen que medirse y transferirse los volúmenes exactos.

Un tampón de formulación preferido comprende disolución salina tamponada con fosfato o fisiológica, albúmina de suero humano y DTPA. La albúmina de suero humano está preferiblemente a una concentración de entre aproximadamente 1 a 25% (p/v) y más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 7,5% (p/v). La concentración de DTPA es preferiblemente aproximadamente 1 mM. El ascorbato puede usarse como una alternativa a la albúmina de suero humano y se usa típicamente a una concentración de aproximadamente 1 a 100 mg/ml. Aunque puede usarse un intervalo más amplio de concentraciones sin comprometer la seguridad del paciente.

El anticuerpo del kit de radiomarcaje se marca fácilmente con un radioisótopo de elección mediante un quelante bifuncional según los métodos de la presente descripción. Para una simplicidad adicional a este respecto, el kit de la presente descripción también puede incluir un vial que contiene un tampón para ajustar el pH de la disolución del radioisótopo, y un vial de reacción de vidrio estéril para realizar el marcaje y posteriormente para resuspender el anticuerpo radiomarcado final en tampón de formulación. Un vial de reacción de 10 ml es típicamente suficiente, pero también pueden usarse viales capaces de albergar 5 a 20 ml. El tampón es preferiblemente una disolución de acetato sódico con bajo contenido en metal a una concentración de 10 a 1.000 mM, lo más preferiblemente 50 mM.

Un kit específico de la presente descripción comprende el anticuerpo conjugado con MX-DTPA, 2B8-MX-DTPA. 2B8 es un anticuerpo anti-CD20 que se ha mostrado que efectúa la depleción de células B después de la administración a pacientes con linfoma. Sin embargo, debería ser evidente para los expertos en la técnica que el kit de radiomarcaje de la presente descripción puede optimizarse para el radiomarcaje de otros anticuerpos anti-CD20 o cualquier otro anticuerpo que se ha conjugado con DTPA u otro quelante polivalente. El kit preferido de la presente descripción puede comprender al menos (i) un vial que contiene el anticuerpo 2B8 conjugado con MX-DTPA, bien en disolución o liofilizado (lo que requiere la reconstitución); y (ii) un vial que contiene tampón de formulación para administrar el anticuerpo radiomarcado a un paciente. El kit preferido también contendrá (iii) un tampón para ajustar el pH del isótopo, y (iv) un vial de reacción. Alternativamente, y más preferiblemente, el tampón se suministra en el vial de reacción, eliminando de esta manera las etapas de medir y transferir el tampón e incrementando la simplicidad, consistencia y esterilidad de los componentes del kit. Sin embargo, también se consideran otros casos, es decir, mediante los cuales el tampón se añade en primer lugar al vial del isótopo y el isótopo tamponado se transfiere entonces al vial de reacción. En este caso, el vial de reacción podría suministrarse con el volumen requerido de anticuerpo. Alternativamente, el vial de isótopo/tampón podría hacerse lo suficientemente grande como para albergar la adición del conjugado de anticuerpo, es decir, directamente al vial del proveedor. Esto eliminaría la necesidad del vial de reacción.

Como se ha descrito anteriormente, se engloba otra configuración preferida de kit mediante la cual el vial de reacción en sí mismo contiene el volumen requerido de anticuerpo conjugado (es decir, 1 ó 1,5 ml para ^{111}In e ^{90}Y , respectivamente). El anticuerpo puede suministrarse en un tampón que proporciona el pH de radiomarcaje apropiado según el isótopo específico deseado (es decir, pH 3-6 para ^{111}In , pH 3-5 para ^{90}Y). Pueden usarse diferentes tampones, dependiendo del isótopo (es decir, acetato sódico para ^{90}Y , citrato sódico para ^{111}In). El pH y composición del tampón también pueden variar dependiendo de la naturaleza del ligando de unión que se va a marcar (es decir, el marcaje de péptidos puede permitir usar < pH 3). Esencialmente entonces, el isótopo se transferirá directamente al vial de reacción, como el tampón

de formulación. Limitando el uso del kit a dos etapas de transferencia, incrementará adicionalmente la reproducibilidad y simplicidad y disminuirá adicionalmente la posibilidad de contaminación de esterilidad durante la manipulación de los componentes del kit.

5 Los kits de radiomarcaje de la presente descripción pueden comprender además un vial de radioisótopo, o el radioisótopo puede pedirse separadamente a un proveedor apropiado. Los radioisótopos preferidos de la presente descripción son cloruro de ^{111}In y cloruro de ^{90}Y en HCl aunque los métodos descritos no están limitados a estos isótopos. En la técnica se conocen otros radionúclidos que se han usado para aplicaciones de formación de imagen, es decir, como se describe en las Patentes U.S. Nos. 4.634.586, 5.460.785 y 5.766.571, que se incorporan en la presente memoria por referencia. El Indio-[111] es particularmente ventajoso para la formación de imágenes de tumores de 10 células B y los emisores beta tales como ^{90}Y son particularmente útiles como agentes radioterapéuticos. Aunque pueden usarse otros radioisótopos adecuados para éstos u otros propósitos, es decir, emisores alfa, dependiendo del quelante usado para la conjugación del anticuerpo.

15 Dada la eficacia probada de los regímenes terapéuticos combinados descritos en la Solicitud U.S. con No. de Serie 08/475.813, un kit adicional también incluirá un vial separado de anticuerpo quimérico, es decir, Rituxan®, para administrarse antes o después del anticuerpo anti-CD20 radiomarcado. Cuando el anticuerpo quimérico se administra antes del anticuerpo radiomarcado, la respuesta HAMA que podría ocurrir generalmente en respuesta a la administración de un anticuerpo murino anti-CD20 puede disminuirse significativamente, incrementando de esta manera la utilidad terapéutica de los anticuerpos murinos radiomarcados. Además, cuando el anti-CD20 quimérico se emplea para aclarar 20 células B circulantes, las imágenes de diagnóstico posteriores conseguidas con anticuerpos marcados con ^{111}In pueden ser mucho más claras.

También debe ser evidente que tanto un anticuerpo radiomarcado de diagnóstico como un anticuerpo radiomarcado terapéutico pueden usarse conjuntamente en un régimen terapéutico combinado. A este respecto, el anticuerpo de diagnóstico puede usarse bien antes o después del anticuerpo terapéutico para visualizar el tamaño tumoral antes y después del tratamiento. En este caso, el kit de la presente descripción puede incluir viales de tampón separados, quizá 25 con código de color, formulados específicamente según los requerimientos de pH óptimo para el radiomarcaje de anticuerpos con los radioisótopos específicos que se van a usar. Dicho sistema aseguraría que se usa el tampón apropiado para cada marcador, y permitiría al clínico la misma facilidad para radiomarcarse los dos anticuerpos que si se hubieran adquirido dos kits. Dicho kit combina en efecto los componentes de dos kits de radiomarcaje en uno.

30 Los componentes del kit de radiomarcaje de la presente descripción se suministran a la concentración y pH apropiado de manera que la esterilidad se mantiene fácilmente antes de la administración el anticuerpo y existe poca necesidad de tampones o medios adicionales. Sin embargo, debe ser evidente para los expertos en la técnica que algunos de los reactivos pueden prepararse, esterilizarse y ensayarse para esterilidad in situ. Así, se consideran variaciones del kit de la presente descripción dependiendo del presupuesto y preferencia del consumidor.

35 El kit de radiomarcaje de la presente descripción puede usarse en un método para radiomarcarse un anticuerpo conjugado con un quelante para administración a un paciente. Según la presente descripción, dicho método comprende, en general, (i) mezclar el anticuerpo conjugado con quelante con una disolución que contiene un radioisótopo; (ii) incubar la mezcla durante una cantidad de tiempo apropiada a una temperatura apropiada; y (iii) diluir el anticuerpo marcado hasta una concentración apropiada en un tampón de formulación, de manera que el anticuerpo radiomarcado puede administrarse directamente a un paciente sin purificación adicional.

40 Lo más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20 y, en particular, el anticuerpo anti-CD20 puede ser 2B8. El anticuerpo puede conjugarse con cualquier quelante apropiado, es decir, MX-DTPA, CHX-DTPA, fenil o bencil-DTPA, DOTA, derivados de EDTA, etc. Se prefiere MX-DTPA. Los métodos para efectuar la conjugación del anticuerpo son conocidos en la técnica (Kozak et al. (1989); Mirzadeh et al. (1990), Brachbiel et al. (1986)).

45 Los presentes inventores han encontrado que el método de radiomarcarse un anticuerpo conjugado con quelante funciona mejor cuando la disolución que contiene el radiomarcador se ajusta a un pH de entre aproximadamente 3,0 y 6,0, y más preferiblemente a aproximadamente 4,2 antes de mezclarlo con el anticuerpo conjugado con quelante. Se prefiere particularmente acetato sódico con bajo contenido en metal para ajustar el pH, aunque pueden usarse otros tampones.

Preferiblemente, el acetato sódico está a una concentración de entre aproximadamente 10 y 1.000 mM, y más preferiblemente 50 mM.

5 Cuando el radioisótopo es cloruro de ^{111}In , la cantidad de volumen de cloruro de ^{111}In que debería usarse para preparar una única dosis de administración es típicamente aproximadamente 5,5 mCi dividida por la concentración de radiactividad en el momento del marcaje. Para la administración a pacientes, una dosis de diagnóstico típica de ^{111}In es aproximadamente 2 a 10 mCi. La cantidad de acetato sódico usada para ajustar el pH varía dependiendo de la concentración de acetato sódico y la disolución vehicular del isótopo, y puede ser por lo tanto bastante amplia. Cuando la concentración de acetato sódico es 50 mM, la cantidad requerida para ajustar el pH es típicamente aproximadamente 1,2 veces la cantidad de volumen de cloruro de ^{111}In usada aunque pueden usarse volúmenes mayores. Debe apreciarse que la proporción de acetato sódico a HCl es lo que es importante, y la cantidad de acetato sódico usada cambiará dependiendo de la cantidad y concentración de HCl en el tampón. Aproximadamente 1 ml de un anticuerpo conjugado con quelante a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml se mezcla entonces con la disolución de acetato de radiomarcador, y la mezcla se incuba durante aproximadamente 30 minutos, o durante un tiempo suficiente para conseguir el marcaje óptimo del anticuerpo. Dicho tiempo puede variar de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 60 minutos. El tampón de formulación se añade entonces en una cantidad necesaria para conseguir un volumen final total de aproximadamente 10 ml.

El tiempo óptimo requerido para el marcaje del anticuerpo pueden variar dependiendo del anticuerpo, el radiomarcador particular y el conjugado particular empleado. Un factor subyacente en la optimización del tiempo asignado para el radiomarcaje es la proporción quelante a anticuerpo del reactivo que se va a marcar. Por ejemplo, la proporción quelante a anticuerpo debe ser lo suficientemente alta como para conseguir un nivel terapéuticamente útil de incorporación, es decir, 90 a 95% dependiendo del radioisótopo, pero no debe ser demasiado alta de manera que se comprometa la integridad estructural o inmunoreactividad del anticuerpo. Esto requiere un determinado proceso de equilibrio que en algunos casos puede dar lugar a un nivel menor de quelante conjugado y un mayor tiempo de marcaje.

25 Por ejemplo, para 2B8 y MX-DTPA, se ha descubierto que el marcaje puede conseguirse por debajo de cinco minutos para ^{90}Y y en aproximadamente treinta minutos para ^{111}In para conseguir el nivel deseado de radioincorporación, con sólo aproximadamente una proporción molar $1\frac{1}{2}$ a 1 de quelante a anticuerpo. No fue necesario, por lo tanto, incrementar la proporción quelante a anticuerpo, porque se consiguió un nivel deseable de radioincorporación. Además, no fue ventajoso incrementar la cantidad de quelante conjugado porque esto podría influir en la inmunoreactividad del anticuerpo. Dichos parámetros podrían determinarse empíricamente para otros anticuerpos para el diseño de kits tales como los descritos en la presente descripción.

35 Cuando el radioisótopo es cloruro de ^{90}Y , la cantidad de volumen de cloruro de ^{90}Y usada para preparar una única dosis de administración varía típicamente de aproximadamente 10 a 50 mCi, y es preferiblemente aproximadamente 45 mCi, dividida por la concentración de radiactividad en el momento del marcaje. La cantidad de acetato sódico usada para ajustar el pH varía dependiendo de la concentración de acetato sódico y la concentración de vehículo de isótopo y puede ser por lo tanto bastante amplia. Cuando la concentración de acetato sódico es 50 mM y el ^{90}Y se suministra en 50 mM HCl, la cantidad requerida para ajustar el pH es típicamente aproximadamente 1,2 veces la cantidad de volumen de cloruro de ^{90}Y usada. Aproximadamente 1,5 ml de un anticuerpo conjugado con quelante a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml se mezcla entonces con la disolución de acetato de radiomarcador, y se incuba durante aproximadamente 5 minutos, o durante un tiempo suficiente para conseguir el marcaje óptimo del anticuerpo. Dicho tiempo puede variar de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 60 minutos. El tampón de formulación se añade en una cantidad necesaria para conseguir un volumen final total de aproximadamente 10 ml.

45 Preferiblemente, el método de radiomarcaje de la presente descripción se realiza usando el kit de radiomarcaje descrito en la presente memoria. Sin embargo, debe ser evidente para los expertos en la técnica que los componentes y condiciones preferidos son meramente directrices aceptables para practicar el método de la presente descripción y pueden alterarse en algún grado con optimización apropiada. Se considera que las condiciones que se alejan de las preferidas pero que todavía consiguen el propósito del método están en el alcance de la presente descripción.

El kit de radiomarcaje de la presente descripción también puede suministrarse con reactivos adecuados para verificar convenientemente la afinidad de unión del anticuerpo después del radiomarcaje. En dicho caso, el kit de la descripción también puede usarse para determinar el porcentaje de unión de un anticuerpo radiomarcado a su célula diana antes de

administrar el anticuerpo a un paciente. Los presentes inventores también han encontrado que el kit de ensayo de unión particular descrito puede ser útil para ensayar la afinidad de cualquier anticuerpo para el que generalmente no está disponible el antígeno purificado. De acuerdo con esto, los componentes del ensayo de unión también pueden venderse como un kit separado.

5 En general, un kit de ensayo de unión y de radiomarcaje comprende (i) al menos un vial de células liofilizadas que expresan el antígeno que es reconocido por el anticuerpo del kit; (ii) un vial que contiene anticuerpo conjugado con quelante; (iii) un vial que contiene el tampón de formulación, y (iv) instrucciones para el radiomarcaje del anticuerpo de manera que el anticuerpo radiomarcado puede administrarse directamente a un paciente sin la necesidad de purificación posterior. Como se ha descrito anteriormente para el kit de radiomarcaje, este kit también puede comprender un vial que
10 contiene un tampón para ajustar el pH del radioisótopo y un vial de reacción de vidrio estéril. Preferiblemente, el tampón es una disolución de acetato sódico con bajo contenido en metal a una concentración de entre aproximadamente 10 y 1.000 mM, y el vial de reacción de vidrio alberga un volumen de al menos 5 ml. El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo anti-CD20, y el quelante es preferiblemente MX-DTPA. Pueden usarse otros quelantes como se ha descrito previamente. El anticuerpo conjugado preferido es 2B8-MX-DTPA, aunque puede marcarse cualquier anticuerpo conjugado con quelante y evaluarse su afinidad. El tampón de formulación es disolución salina tamponada con fosfato que comprende un radioprotector y quelante no conjugado como se ha descrito anteriormente, y el radioisótopo puede o no puede incluirse y es preferiblemente cloruro de ¹¹¹In o cloruro de ⁹⁰Y. Pueden usarse otros radioisótopos dependiendo del quelante.

La diferencia entre el kit de ensayo de unión/radiomarcaje y el kit de radiomarcaje descrito anteriormente es la inclusión
20 de células positivas para el antígeno para servir como un sustrato diana para ensayar la afinidad del anticuerpo. Cuando el antígeno es CD20, las células positivas para CD20 preferidas son células SB (ATCC # CCL 120) pero pueden usarse cualesquiera células positivas para CD20. El kit de ensayo de unión y radiomarcaje puede incluir además células negativas para el antígeno para usarse como un control negativo. Las células negativas para CD20 preferidas son células HSB (ATCC # CCL 120.1) pero pueden usarse cualesquiera células negativas para CD20.

25 Por supuesto, el kit combinado de radiomarcaje y ensayo de unión puede comprender además un vial de anticuerpo anti-CD20 quimérico además del anticuerpo que se va a marcar para los propósitos de efectuar un régimen terapéutico combinado, o para aclarar células B periféricas antes de la formación de imágenes de diagnóstico. Dicho anticuerpo separado es preferiblemente Rituxan®, pero puede ser cualquier anticuerpo que ha mostrado efectuar la muerte de células tumorales. De hecho, pueden combinarse dos tipos diferentes de anticuerpos en un kit, es decir, anticuerpos
30 dirigidos a dos antígenos diferentes de células B, siempre que el régimen terapéutico combinado sirva para tomar como diana el mismo tipo de célula, es decir, linfoma de células B.

Al igual que los componentes del kit pueden usarse para marcar otros anticuerpos, pueden prepararse otras células para ensayar la afinidad del anticuerpo dependiendo del antígeno diana. Sin embargo, para los anticuerpos anti-CD20, el kit de ensayo de unión y radiomarcaje de la presente descripción es particularmente adecuado para el entorno comercial ya que las células diana se proporcionan en forma liofilizada. Esto permite la verificación de la eficacia del anticuerpo para proceder simplemente y sistemáticamente y anula la molestia y gasto implicado en el mantenimiento de instalaciones de cultivo tisular. Las células liofilizadas se suministran generalmente en alícuotas de entre 0,5 y 500 X 10⁶ células por vial según los métodos de la descripción.

Es posible que instalaciones particulares preferirán pedir el anticuerpo que ya se ha radiomarcado, en cuyo caso dicha
40 instalación podría desear los reactivos del ensayo de unión con el fin de asegurar que los anticuerpos retienen la afinidad para la diana. En este caso, la presente descripción también proporciona un kit de ensayo de unión para determinar el porcentaje de unión de un anticuerpo radiomarcado para su célula diana. Dicho kit incluye al menos un vial de células positivas para el antígeno fijadas y/o liofilizadas y puede contener opcionalmente células negativas para el antígeno como se ha descrito anteriormente para el kit de ensayo de unión y radiomarcaje. Además, debería ser evidente que las
45 variaciones de dicho kit pueden incluir un anticuerpo control no marcado para verificar la especificidad de unión del anticuerpo del consumidor mediante un ensayo competitivo.

De nuevo, cuando el antígeno es CD20, las células positivas para CD20 son preferiblemente células SB (ATCC # CCL 120) y las células negativas para CD20 son preferiblemente células HSB (ATCC # CCL 120.1), que se suministran en

forma liofilizada en alícuotas de entre 0,5 y 50 X 10⁶ células. En este caso, el anticuerpo es preferiblemente un conjugado MX-DTPA de 2B8 marcado con ¹¹¹In o ⁹⁰Y.

5 A la vista del kit adicional descrito en la presente memoria, debe enfatizarse que una de las ventajas del kit y método de radiomarcaje de la presente descripción es que no es necesaria una etapa de purificación adicional, y el anticuerpo radiomarcado puede administrarse directamente al paciente, ahorrando de esta manera un tiempo valioso e incrementando la estabilidad del anticuerpo. Por lo tanto, se enfatiza que, aunque podría ser deseable para el clínico ensayar o verificar la especificidad y afinidad de unión del anticuerpo radiomarcado antes de la administración, dicho ensayo puede obviarse con radioisótopos particulares si la estabilidad del anticuerpo y la inhibición de la radiolisis son preocupaciones particulares, es decir, como con el itrio. Proporcionando kits, mediante los cuales pueden ensayarse la afinidad y especificidad de unión, los presentes inventores no están sugiriendo de ninguna manera que dichos ensayos se requieran de forma absoluta en los métodos o kits de la presente descripción. La opción de ensayar la validez de dicho anticuerpo es puramente una opción del clínico.

15 Los presentes inventores también han encontrado que el método usado para preparar células fijadas y liofilizadas para los kits del ensayo de unión de la presente descripción es particularmente adecuado para preparar células para kits comerciales. Las células pueden fijarse antes de la liofilización para mejorar la estructura/estabilidad. En particular, las células de la presente descripción demuestran una alta reproducibilidad cuando se usan para ensayos de unión de anticuerpo.

20 En particular, la presente descripción incluye un método para preparar células liofilizadas que comprende (i) recoger células a una densidad celular de 0,5 a 2 X 10⁶ células por ml por centrifugación; (ii) lavar las células al menos una vez en una disolución salina equilibrada, es decir, HBSS; (iii) resuspender las células sedimentadas en un tampón de liofilización que comprende una disolución salina equilibrada que contiene proteína vehicular y al menos un tipo de azúcar; (iv) dispensar una alícuota de las células resuspendidas en un tubo de microfuga o un vial de vidrio; y (v) liofilizar las células 12-96h y más preferiblemente 24-72h a aproximadamente 30-60 militoros. El método es particularmente adecuado para preparar células liofilizadas en el que dichas células son células SB (ATCC # CCL 120) o células HSB (ATCC # CCL 120.1), pero probablemente también es aplicable a otros tipos de células.

25 Preferiblemente, el tampón contiene generalmente albúmina de suero bovino como la proteína vehicular a una concentración de 1% (p/v) y manitol a una concentración de 10%. Sin embargo, pueden usarse posiblemente otras proteínas vehiculares, es decir, HSA, y otros azúcares. Las células se recogen por centrifugación a una velocidad de aproximadamente 1.300 rpm, y se añade la disolución salina HBSS (disolución salina equilibrada de Hank). Las células se resuspenden generalmente a una concentración de 50 X 10⁶ células por ml. Sin embargo, debe ser evidente para los expertos en la técnica que las condiciones anteriores pueden modificarse ligeramente sin comprometer significativamente la viabilidad celular. Además, las condiciones anteriores pueden suplementarse por procedimientos adicionales diseñados para optimizar el proceso para cantidades mayores de células, por ejemplo, diafiltración con flujo tangencial para intercambiar las células en el tampón de liofilización.

35 Los kits del ensayo de unión de la presente descripción pueden usarse en un ensayo para evaluar la afinidad de unión de un anticuerpo radiomarcado. Dicho ensayo también es un objeto de la presente descripción. Un ensayo de unión para determinar el porcentaje de unión de un anticuerpo radiomarcado a su célula diana comprende en general las etapas siguientes: (i) mezclar al menos una alícuota de un anticuerpo radiomarcado con al menos una alícuota de células positivas para el antígeno; (ii) mezclar al menos una alícuota de un anticuerpo radiomarcado idéntica a la alícuota de la etapa (i) con al menos una alícuota de tampón de dilución del mismo volumen al de la alícuota de células positivas para el antígeno en la etapa (i) como un control; (iii) sedimentar las células por centrifugación; (iv) medir la radiactividad en el sobrenadante de las células sedimentadas y el control; y (v) comparar la cantidad de radiactividad en el sobrenadante celular con la cantidad de radiactividad en el control.

40 Como los kits de radiomarcaje de la presente descripción contienen opcionalmente cloruro de ¹¹¹In o cloruro de ⁹⁰Y, el ensayo de unión de la presente descripción se realiza típicamente con anticuerpos marcados con ¹¹¹In o ⁹⁰Y. Cuando el radiomarcador es ¹¹¹In, la radiactividad en los tubos de ensayo se mide usando un contador gamma. Cuando el marcador es ⁹⁰Y, la radiactividad se mide usando un contador de centelleo, aunque podría usarse un contador gamma.

Para el ensayo de unión de la presente descripción, el anticuerpo preferido es un anticuerpo anti-CD20, y el anticuerpo anti-CD20 es preferiblemente 2B8, en el que el anticuerpo 2B8 se marca usando el kit de radiomarcaje de la presente descripción. Sin embargo, puede ensayarse cualquier anticuerpo radiomarcado siempre que estén disponibles células que expresan el antígeno particular. Cuando CD20 es el antígeno, las células preferidas para realizar el ensayo son células SB (ATCC # CCL 120), sin embargo, el ensayo también puede optimizarse y realizarse con cualquier anticuerpo radiomarcado y célula diana apropiada.

El tampón de dilución usado para el ensayo debería mantener la unión del anticuerpo, es decir, tampón fisiológico, que contiene posiblemente una proteína vehicular, por ejemplo, BSA para minimizar la unión no específica a las células. Aunque el tubo con tampón de dilución sirve como un control, puede incluirse un control adicional en el ensayo usando células negativas para el antígeno. En este caso, el ensayo de unión comprende además las etapas siguientes: (i) mezclar al menos una alícuota de un anticuerpo radiomarcado con al menos una alícuota de células negativas para el antígeno; (ii) sedimentar las células negativas para el antígeno por centrifugación; (iv) medir la radiactividad en el sobrenadante de las células negativas para el antígeno sedimentadas; y (v) comparar la cantidad de radiactividad en el sobrenadante de las células negativas para el antígeno con la cantidad de radiactividad en el sobrenadante de las células positivas para el antígeno y el control. La comparación de la radiactividad obtenida en este tubo con el control de tampón de dilución servirá como una medida de la cantidad de unión no específica a las células positivas para el antígeno. Cuando CD20 es el antígeno, y las células positivas para CD20 son células SB, las células negativas para CD20 son preferiblemente células HSB (ATCC # CCL 120.1).

Como se ha descrito anteriormente, las células liofilizadas de la presente descripción proporcionan un estándar simple, eficaz y reproducible para ensayar la eficacia de unión de un anticuerpo radiomarcado. Por lo tanto, el ensayo de unión de la presente descripción se realiza preferiblemente usando las células liofilizadas incluidas en los kits de ensayo de unión de la presente descripción. Además, los ensayos de radiomarcaje de la presente descripción pueden combinarse con los ensayos de unión de la presente descripción, en el que el anticuerpo se marca en primer lugar por el método de marcate de un anticuerpo conjugado con quelante como se describe en la presente descripción. Lo más preferiblemente, el ensayo de unión de la presente descripción se realiza usando uno de los kits de ensayo de unión y radiomarcaje descritos en la presente memoria.

Pueden existir algunos casos en los que la afinidad de un anticuerpo debería ensayarse o verificarse pero no se ha unido un radiomarcador. Por ejemplo, bajo determinadas circunstancias, es decir, identificación y resolución de problemas, puede ser ventajoso ensayar la afinidad de unión de un anticuerpo antes del radiomarcaje. Para dicho caso, la presente descripción también engloba un ensayo de unión competitivo para evaluar la afinidad de un anticuerpo de ensayo para una célula diana, que comprende (i) preparar un anticuerpo control marcado con rutenio usando un anticuerpo conocido específico para el mismo antígeno; (ii) incubar cantidades crecientes de anticuerpo de ensayo y cantidades crecientes de anticuerpo control no marcado con una concentración fijada de células diana y una cantidad traza de anticuerpo marcado con rutenio en el que cada concentración separada de anticuerpo de ensayo y cada concentración separada de anticuerpo control están en tubos separados, respectivamente; (iii) determinar la cantidad de unión en cada tubo de reacción basado en electroquimioluminiscencia (ECL) relativa usando instrumentación ORIGEN; y (iv) calcular el valor de afinidad promedio del anticuerpo de ensayo. El valor de afinidad promedio puede calcularse a partir de los valores CE50 y la concentración conocida de anticuerpo traza usando el método de Muller (J. Immunological Methods (1980) 34: 345) o cualquier otro método apropiado. Debe indicarse que este ensayo también puede usarse para ensayar la afinidad de anticuerpos radiomarcados, o cualquier anticuerpo para el que no puede purificarse el antígeno y se requieren células como una fuente de antígeno. Las células fijadas, liofilizadas de la presente descripción pueden usarse como células diana.

Cuando el ensayo de unión competitiva de la presente descripción se realiza para ensayar la afinidad de anticuerpos anti-CD20, el anticuerpo control puede ser 2B8, o cualquier otro anticuerpo anti-CD20 no conjugado. El anticuerpo control puede ser un anticuerpo conjugado con quelante. El anticuerpo de ensayo también puede ser un conjugado con quelante del anticuerpo control. Alternativamente, el anticuerpo de ensayo puede ser otro anticuerpo anti-CD20 cuya afinidad de unión para CD20 comparada con 2B8 tiene interés. Sin embargo, el ensayo puede adaptarse para uso con anticuerpos que tienen otras especificidades siempre que esté disponible una célula diana apropiada.

En el ensayo de unión competitiva de la presente descripción, las células diana preferidas son células positivas para CD20, más preferiblemente células SB (ATCC # CCL 120), y son más preferiblemente células SB liofilizadas resuspendidas preparadas según el método de la presente descripción. También pueden usarse células liofilizadas usando otros métodos o células fijadas. El anticuerpo marcado con rutenio se prepara típicamente por un proceso que comprende incubar el anticuerpo control con quelante éster de N-hidroxisuccinimida de rutenio (II) tris-bipiridina (TAG-NHS), aunque también se considera otro método conocido de marcar anticuerpos. Para el marcaje, el anticuerpo control y TAG-NHS se incuban preferiblemente a aproximadamente una proporción molar 1:15.

Éstos y otros aspectos de la presente descripción se entenderán más claramente por referencia a las figuras, ejemplos y descripción siguientes.

Habiendo dicho esto, siempre debe tenerse en cuenta que el contenido de la presente invención es el contenido que se muestra en las reivindicaciones adjuntas, proporcionándose en la presente memoria los aspectos restantes de la presente descripción con el fin de facilitar un entendimiento de la presente invención y con el fin de poner en contexto la presente invención.

4. Descripción breve de los dibujos

Figura 1. La inmunoreactividad de 2B8 nativo se comparó con los anticuerpos anti-CD20 disponibles comercialmente B1 (Coulter) y Leu 16 (Becton Dickinson) por competición directa en un radioinmunoensayo usando B1 marcado con ¹²⁵I. Se añadieron células positivas para el antígeno SB (100.000) a cada pocillo de placas de filtro V&P; se mezclaron 10 ng de B1 radiomarcado con varias concentraciones de competición no marcado y la mezcla se añadió a las células. Los anticuerpos se incubaron con las células durante una hora a temperatura ambiente; las determinaciones se realizaron en triplicado. Posteriormente, los pocillos se lavaron, se secaron y se determinó la radiactividad asociada al filtro. Los datos mostrados se corrigieron para radiactividad de fondo y son las medias de determinaciones en triplicado.

Figura 2. Se analizaron cantidades crecientes de 2B8 no conjugado para unión a células B humanas (SB) usando análisis FACS. Se hicieron comparaciones con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 disponible comercialmente (B1) y con dos anticuerpos de isotipo irrelevante. Se usó de anti-IgG F(ab)₂ de ratón de cabra-FITC como el reactivo secundario. Los resultados muestran que 2B8 es específico para el antígeno CD20 y que presenta una unión mayor que B1.

Figura 3. Se incubaron células B humanas (SB) con cantidades crecientes de 2B8 marcado con ¹²⁵I. Se incubaron muestras en triplicado durante una hora y se determinó la radiactividad unida a las células después de filtrar para recoger las células. El análisis Scatchard permitió el cálculo de una constante de afinidad aparente de $4,3 \times 10^{-9}$ M.

Figura 4. Inmunoreactividad de 2B8 nativo, 2B8-MX-DTPA y B1. El anticuerpo B1 se radiomarcó como se describe en la sección de Métodos. Se mezclaron diez nanogramos de B1 radiomarcado con concentraciones crecientes del competidor y la mezcla se añadió a pocillos de placas de filtro V&P que contienen 100.000 células SB positivas para el antígeno; todas las determinaciones se realizaron en triplicado. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron extensamente. Posteriormente, los filtros se secaron y se determinó la radiactividad asociada por contaje gamma; todos los valores se corrigieron para el fondo. Los valores mostrados son las medias de determinaciones en triplicado.

Figura 5. El anticuerpo 2B8 se formuló a una concentración final de 10 mg/mL en disolución salina normal o disolución salina normal que contiene 10 mM glicina-HCl, pH 6,8. Se pusieron conjuntos en duplicado de muestras en viales con tapón de rosca, los viales se purgaron con nitrógeno y se taparon. Las muestras se incubaron a 4°C ó 30°C durante 12 semanas; la inmunoreactividad de las muestras se evaluó semanalmente. No se observó pérdida de inmunoreactividad con ninguna de las muestras de 2B8 a lo largo del estudio de 12 semanas. Se representan las inmunoreactividades en la semana 1 (Fig. 5A), semana 6 (Fig. 5B) y semana 12 (Fig. 5C).

Figura 6. Ensayo de unión para la determinación de inmunoreactividad de 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In incubado en PBS, pH 7,4 que contiene 50 mg/mL de albúmina de suero humano (incubación de 48 h). Figura 6A) Se incubó una cantidad constante de anticuerpo radiomarcado (5 ng/mL) con volúmenes crecientes de células SB (20 x 10⁶ células/mL). Se representó la cantidad de radiactividad (cpm) unida a las células frente al volumen de la suspensión

celular añadida. Figura 6B) Se representó la radiactividad total aplicada sobre la radiactividad unida (AT/B). La extrapolación lineal permitió el cálculo del intercepto de y (0,997). El recíproco del intercepto de y X 100 rindió un valor de inmunoreactividad de 100% a exceso de antígeno infinito.

5 Figura 7. Autorradiogramas obtenidos a partir de análisis por SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y incubado a 4°C en PBS, pH 7,4 que contiene 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DTPA. A los tiempos indicados, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras, condiciones desnaturalizantes (SDS). Las muestras se cargaron a 5 µL (carriles 1, 2), 10 µL (carriles 5, 6). Los geles se expusieron a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y se fotografiaron.

10 Figura 8. Escaneo densitométrico de autorradiograma de tiempo cero obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y incubado a 4°C en PBS, pH 7,4 que contiene 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DTPA. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. Las muestras se cargaron a 5 µL, 10 µL y 20 µL en pocillos en duplicado. El gel se expuso a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del pico de conjugado radiomarcado (#2) fue 96,2%.

15 Figura 9. Escaneo densitométrico de autorradiograma de 48 h obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y incubado a 4°C en PBS, pH 7,4 que contiene 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DTPA. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. Las muestras se cargaron a 5 µL, 10 µL y 20 µL en pocillos en duplicado. El gel se expuso a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área
20 relativa del pico de conjugado radiomarcado (#2) fue 95,5%.

Figura 10. Autorradiogramas obtenidos a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In incubado a 4°C en PBS, pH 7,4 que contiene 50 mg/mL de albúmina de suero humano. A los tiempos indicados, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. Las muestras se cargaron a 5 µL (carriles 1, 2), 10 µL (carriles 3, 4) y 20 µL (carriles 5, 6). Los geles se expusieron a película de rayos x durante
25 aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y se fotografiaron. (Nota: El autorradiograma de 48 h se obtuvo usando pantallas intensificadoras que resultan en una señal más intensa comparada con el autorradiograma de tiempo cero).

Figura 11. Escaneo densitométrico de autorradiograma de tiempo cero obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In incubado a 4°C en PBS, pH 7,4 que contiene 50 mg/mL de albúmina de suero humano. La
30 muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% en condiciones no reductoras. La muestra se cargó a 5 µL, 10 µL y 20 µL en pocillos en duplicado. El gel se expuso a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del pico de conjugado radiomarcado (#3) fue 95,9%.

Figura 12. Escaneo densitométrico de autorradiograma de 48 h obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In incubado a 4°C en PBS, pH 7,4 que contiene 50 mg/mL de albúmina de suero humano. La
35 muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% en condiciones no reductoras. La muestra se cargó a 5 µL, 10 µL y 20 µL en pocillos en duplicado. El gel se expuso a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del conjugado radiomarcado fue 97,0% (áreas combinadas de los picos #2, 3 y 4).

40 Figura 13. Autorradiogramas obtenidos a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y incubado a 37°C en suero humano. A los tiempos indicados, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. Las muestras se cargaron a 5 µL (carriles 1, 2), 10 µL (carriles 3, 4) y 20 µL (carriles 5, 6). Los geles se expusieron a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y se fotografiaron.

45 Figura 14. Escaneo densitométrico de autorradiograma de tiempo cero obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y incubado a 37°C en suero humano. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. La muestra se cargó a 5 µL, 10 µL y 20 µL en pocillos en duplicado.

Los geles se expusieron a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del pico de conjugado radiomarcado (#2) fue 97,9%.

5 Figura 15. Escaneo densitométrico de autorradiograma de 98 h obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y incubado a 37°C en suero humano. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. La muestra se cargó a 5 µL, 10 µL y 20 µL en pocillos en duplicado. Los geles se expusieron a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del pico de conjugado radiomarcado (#2) fue 94,7%.

10 Figura 16. Autorradiogramas obtenidos a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In incubado a 37°C en suero humano. A los tiempos indicados, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. Las muestras se cargaron a 5 µL (carriles 1, 2), 10 µL (carriles 3, 4) y 20 µL (carriles 5, 6). Los geles se expusieron a película de rayos x durante aproximadamente 16-20 h a temperatura ambiente y se fotografiaron.

15 Figura 17. Escaneo densitométrico de autorradiograma de tiempo cero obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In incubado a 37°C en suero humano. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. La muestra se cargó a 5 µL, 10 µL y 20 µL en pocillos en duplicado. El gel se expuso a película de rayos x durante aproximadamente 16-20 h a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del pico de conjugado radiomarcado (#3) fue 95,3%.

20 Figura 18. Escaneo densitométrico de autorradiograma de 96 h obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In incubado a 37°C en suero humano. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. La muestra se cargó a 5 µL, 10 µL y 20 µL en pocillos en duplicado. El gel se expuso a película de rayos x durante aproximadamente 16-20 h a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del pico de conjugado radiomarcado (#3) fue 94,0%.

25 Figura 19. Se inyectó a monos cinomolgus intravenosamente cada 48 horas durante un total de siete inyecciones; se muestran las cantidades inyectadas. Se determinaron los niveles de células T y B circulantes por análisis FACS usando anti-CD2 (células T), anti-Mo-IgG (2B8), anti-CD20 (Leu 16) y anti-IgG humana (células B). No se observó ningún efecto en los niveles de células T circulantes. (A los animales del Grupo V se les proporcionó una única dosis).

Figura 20. La recuperación de los niveles de células B circulantes en animales que reciben 2B8 fue seguido por análisis FACS usando los anticuerpos macados fluorescentemente descritos en la descripción breve de la Fig. 19. Los animales en los Grupos III y IV no se monitorizaron ya que se sacrificaron en el día 13.

30 Figura 21. Se inyectó a monos cinomolgus intravenosamente ⁸⁹Y-2B8-MX-DTPA que se había preparado usando 2B8-MX-DTPA de grado clínico. Los animales se dosificaron cada 48 horas con las cantidades mostradas anteriormente para un total de siete dosis. En los días 0, 2, 7, 10 y 14, se extrajo sangre de los monos y se evaluaron para química sérica hematología y niveles de células B circulantes (los sueros del día 10 no se analizaron para contenido de células B). Aparte de un recuento disminuido de linfocitos totales en todos los animales, excepto un individuo en los grupos II, no se observaron anomalías significativas durante el curso del estudio.

35 Figura 22. El aclaramiento del anticuerpo anti-CD20 murino 2B8 de monos cinomolgus se determinó por ELISA después de una única inyección de 10 mg/kg en el día cero. Como se muestra en el panel A, el anticuerpo presentó un valor $\beta t_{1/2}$ de aproximadamente 4,5 días. El aclaramiento del anticuerpo 2B8 y su conjugado con MX-DTPA de la circulación de ratones BALB/c se muestran en el panel B. Se inyectó a los ratones intravenosamente 25 µg de 2B8 nativo o conjugado y se tomaron muestras de sangre a varios tiempos hasta 264 horas después de la inyección; los sueros se analizaron posteriormente por inmunoensayo enzimático usando células SB como el agente de captura. Tanto los anticuerpos nativos como conjugados presentaron valores de aclaramiento de 8,75 días.

40 Figura 23. Se inyectó a cada uno de veinte ratones BALB/c 1,1 µCi de conjugado radiomarcado (100 µL) formulado en PBS, pH 7,4, que contiene 50 mg/mL de HSA. Se sacrificaron grupos de cinco ratones cada uno a 1, 24, 48 y 72 horas y se prepararon y analizaron la sangre y varios tejidos para radiactividad asociada.

45

Figura 24. Se inyectó intravenosamente a cada uno de veinte ratones BALB/c aproximadamente 1,0 μCi (en 100 μl) de conjugado radiomarcado formulado en 1 X PBS, pH 7,4, que contiene 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DPA. Se sacrificaron grupos de cinco ratones cada uno a 1, 24, 48 y 72 horas y se prepararon y analizaron su sangre y varios tejidos para radiactividad asociada.

5 Figura 25. Se inyectó intravenosamente a ratones atómicos que portan tumores de células B Ramos 24 μCi de ^{111}In -2B8-MX-DTPA y se sacrificaron grupos de tres ratones cada uno a 0, 24, 48 y 72 horas. Después de la preparación de los tejidos y la determinación de la radiactividad asociada, se determinaron los valores de porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido y se representaron como se muestra.

10 Figura 26. Ensayo de unión para la determinación de inmunoreactividad de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y "mix-&-shoot" incubado en PBS, pH 7,4 que contiene 50-75 mg/mL de albúmina de suero humano (incubación de 48 h). Panel A) Se incubó una cantidad constante de anticuerpo marcado con ^{90}Y (aproximadamente 1 ng/ml) con cantidades crecientes de células SB. La cantidad de radiactividad (cpm) unida a las células se representó frente a la concentración de células. Panel B) Se representó la radiactividad de ^{90}Y total aplicada sobre radiactividad unida (AT/B). La extrapolación lineal permitió el cálculo del intercepto de y (1,139). El recíproco del intercepto de y X 100 rindió un valor de inmunoreactividad de 87,9% a exceso de antígeno infinito. No se observó unión con células negativas para CD20 (HSB).

15 Figura 27. Autorradiogramas obtenidos a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y incubado a 4°C en PBS, pH 7,4 que contiene 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DTPA. A los tiempos indicados, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras, condiciones desnaturalizantes (SDS). Las muestras se cargaron a 5 μL (carriles 1, 2), 10 μL (carriles 5, 6). Los geles se expusieron a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y se fotografiaron.

20 Figura 28. Escaneo densitométrico de autorradiograma de tiempo cero obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y incubado a 4°C en PBS, pH 7,4 que contiene 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DTPA. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. Las muestras se cargaron a 5 μL , 10 μL y 20 μL en pocillos en duplicado. El gel se expuso a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del pico de conjugado radiomarcado (#2) fue 96,1%.

25 Figura 29. Escaneo densitométrico de autorradiograma de 48 h obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y incubado a 4°C en PBS, pH 7,4 que contiene 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DTPA. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. Las muestras se cargaron a 5 μL , 10 μL y 20 μL en pocillos en duplicado. El gel se expuso a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del pico de conjugado radiomarcado (#2) fue 94,1%.

30 Figura 30. Autorradiogramas obtenidos a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y "mix-&-shoot" incubado a 37°C en suero humano. A los tiempos indicados, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. Las muestras se cargaron a 5 μL (carriles 1, 2), 10 μL (carriles 3, 4) y 20 μL (carriles 5, 6). Los geles se expusieron a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y se fotografiaron.

35 Figura 31. Escaneo densitométrico de autorradiograma de tiempo cero obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y "mix-&-shoot" incubado a 37°C en suero humano. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. La muestra se cargó a 5 μL , 10 μL y 20 μL en pocillos en duplicado. Los geles se expusieron a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del pico de conjugado radiomarcado (#2) fue 89,1%.

40 Figura 32. Escaneo densitométrico de autorradiograma de 72 h obtenido a partir de análisis SDS-PAGE de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y "mix-&-shoot" incubado a 37°C en suero humano. La muestra se sometió a electroforesis en un gel de Tris-glicina 4-20% usando condiciones no reductoras. La muestra se cargó a 5 μL , 10 μL y 20 μL en pocillos en

duplicado. Los geles se expusieron a película de rayos x durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente y uno de los carriles se escaneó usando un densitómetro. El área relativa del pico de conjugado radiomarcado (#2) fue 88,8%.

5 Figura 33. Se inyectó intravenosamente a cada uno de veinte ratones BALB/c 5 μCi de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y formulado en 1 X PBS, pH 7,4, que contiene 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DTPA. Se sacrificaron grupos de cinco ratones cada uno a 1, 24, 48 y 72 horas y se prepararon y analizaron su sangre y varios tejidos para radiactividad asociada.

10 Figura 34. Se incubaron cantidades crecientes de anticuerpo 2B8 derivado de CHO marcado con una concentración fija de células B positivas para CD20 (SB) o células T negativas para CD20 (HSB) recién recogidas. La unión del anticuerpo a las células se cuantificó usando análisis FACS usando anti-IgG F(ab) 2 de ratón de cabra-FITC como se describe en la presente memoria. Se hizo una comparación con un anticuerpo de isotipo irrelevante (S004). Sólo el anticuerpo 2B8 derivado de CHO mostró una unión apreciable a las células SB positivas para CD20.

15 Figura 35. La inmunoreactividad de 2B8 derivado de CHO se comparó con el anticuerpo parental 2B8-49 producido en una línea celular de hibridoma por competición directa en un ensayo ORIGEN. Se incubaron cantidades crecientes de anticuerpo con una concentración fija de células B positivas para CD20 (SB) y una cantidad traza de 2B8 de CHO marcado con rutenio. Después de incubar durante tres horas a temperatura ambiente, se determinó la unión, expresada como electroquimioluminiscencia (ECL) relativa, usando el instrumento ORIGEN como se describe en los Materiales y Métodos. Los valores representan las medias de determinaciones en duplicado. Se calculó que las constantes de afinidad promedio para 2B8 CHO y 2B8-49 eran $1,3 \times 10^{-10}$ M y $2,5 \times 10^{-10}$ M, respectivamente. Para comparación se incluyó un anticuerpo de isotipo irrelevante (S004).

20

Figura 36. La unión de los conjugados 2B8-MX-DTPA preparados a partir de 2B8 derivado de CHO se comparó con el anticuerpo no conjugado por competición directa en un ensayo ORIGEN. Los conjugados se prepararon por incubación de 2B8 con MX-DTPA durante 8, 17 y 24 h antes de la eliminación del quelato que no ha reaccionado. Para la evaluación de la unión, los anticuerpos se incubaron con una concentración fija de células B positivas para CD20 (SB) y una cantidad traza de 2B8 de CHO marcado con rutenio. Después de incubar durante tres horas a temperatura ambiente, se determinó la unión, expresada como electroquimioluminiscencia (ECL) relativa, usando el instrumento ORIGEN como se describe en los Materiales y Métodos. Los valores representan las medias de determinaciones en duplicado. Las preparaciones de conjugado presentaron una unión similar comparado con el anticuerpo 2B8 no conjugado.

25

30 Figura 37. A) Se lavaron y resuspendieron células SB hasta 90×10^6 células/mL con tampón de dilución (1X PBS, pH 7,4 que contiene 1% (p/v) albúmina de suero bovino. Se incubaron concentraciones crecientes de células durante 3 h con 7,5 ng/mL de In2B8 preparado usando 2B8-MX-DTPA lote 0165A. B) Representación doble inversa de concentración celular frente a radiactividad unida/radiactividad total (B/AT). La inmunoreactividad se calculó como $1/\text{intercepto de } y \times 100$. Los valores de inmunoreactividad y coeficiente de correlación (R) fueron 80,6% y 0,981, respectivamente.

35

Figura 38. A) Se lavaron y resuspendieron células SB hasta 90×10^6 células/mL con tampón de dilución (1X PBS, pH 7,4 que contiene 1% (p/v) albúmina de suero bovino. Se incubaron concentraciones crecientes de células durante 3 h con 2 ng/mL de Y2B8 preparado usando 2B8-MX-DTPA lote # 0165A. B) Representación doble inversa de concentración celular frente a radiactividad unida/radiactividad total (B/AT). La inmunoreactividad se calculó como $1/\text{intercepto de } y \times 100$. Los valores de inmunoreactividad y coeficiente de correlación (R) fueron 72,2% y 0,999, respectivamente.

40

5. Descripción detallada

Definiciones

A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción y esta invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente descripción pueden usarse cualesquiera métodos y materiales

45

similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los propósitos de la presente descripción, a continuación se definen los términos siguientes.

bajo contenido en metal - se refiere a reactivos tratados para reducir la contaminación de metales hasta un nivel que no afecte la radioincorporación.

5 positivo para antígeno - significa que expresa el antígeno que es reconocido por un anticuerpo particular de la descripción de tal manera que el anticuerpo es capaz de unirse.

% de radioincorporación - se refiere a la cantidad de radiomarcador en una reacción de radiomarcaje que se conjuga con el anticuerpo respecto a la cantidad total de radiomarcador añadida inicialmente a la reacción.

10 % de unión - se refiere a la cantidad de un anticuerpo de una muestra que se une al antígeno diana, con o sin especificidad.

% de inmunoreactividad o especificidad de unión - se refiere a la cantidad de una muestra de anticuerpo que se une al antígeno diana con especificidad.

anticuerpo de diagnóstico - se refiere a un anticuerpo conjugado con un radiomarcador tal como ¹¹¹I que puede efectuar formación de imágenes de diagnóstico de tumores y células positivas para antígeno.

15 anticuerpo terapéutico - se refiere a un anticuerpo conjugado con un radiomarcador emisor alfa o beta (tal como ⁹⁰Y) que puede efectuar la muerte celular cuando se une al antígeno diana.

Desarrollo Pre-clínico del Anticuerpo Monoclonal Murino Anti-CD20 2B8, 2B8 Conjugado, 2B8 Marcado con ¹¹¹In y ⁹⁰Y

20 **I. Materiales y Métodos para el Desarrollo del Anticuerpo Monoclonal Murino Anti-CD20 2B8, Conjugado 2B8-MX-DTPA, 2B8-MX-DTPA Marcado con ¹¹¹In y ⁹⁰Y-MX-DTPA Purificado por HPLC**

A. Materiales.

1. Células.

25 Las líneas celulares humanas SB y HSB se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se cultivaron en RPMI-1640 que contenía 10% suero bovino fetal. La línea celular SB positiva para CD20 es una línea celular linfoblastoide B derivada de la capa leuco-plaquetaria de sangre periférica de un paciente con leucemia linfoblástica aguda (1). La línea celular HSB negativa para el antígeno es una línea celular linfoblastoide T desarrollada a partir de tumores inducidos en hámsters sirios recién nacidos (2). La línea celular SP2/0 de mieloma murino se mantuvo de manera similar en RPMI-1640 que contenía 10% suero bovino fetal.

2. Anticuerpos.

30 Los anticuerpos anti-CD20 B1 y Leu 16 se adquirieron en Coulter Immunology y Becton/Dickinson, respectivamente. Los anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra y anti-IgG humana de cabra marcados con ¹²⁵I se obtuvieron de ICN. Anti-IgG F(ab')₂ de ratón de cabra se obtuvo de Cappel.

3. Reactivos.

35 Los adyuvantes de Freund completo e incompleto se adquirieron en Sigma Chemical Company. Polietilen glicol, concentrado HAT y concentrado HT se obtuvieron todos de Boehringer Mannheim. El isotiocianato de fluoresceína (FITC) se adquirió en Sigma Chemical Company. El cloruro de indio-[111] y cloruro de ⁹⁰Y se obtuvieron de Amersham o NEN Dupont. El cloruro de itrio-[89] se adquirió en Aldrich Chemical Company. Todos los demás reactivos se obtuvieron de fuentes estándar.

40 Los reactivos usados para los protocolos de conjugación y radiomarcaje se procesaron para eliminar iones de metales pesados contaminantes que podrían competir con los radioisótopos durante la etapa de radiomarcaje. Los reactivos se procesaron típicamente pasando las disoluciones a través de una columna de resina de intercambio iónico Chelex 100

(BioRad Industries) o mediante procesamiento discontinuo por adición de Chelex 100 a una disolución preparada. Para todas las preparaciones y diluciones se usó agua con bajo contenido en metal, bien purificada Milli-Q o Agua para Irrigación (WFlr). Las disoluciones sin metal se esterilizaron por filtración y se recogieron en contenedores de plástico estériles.

5 B. Métodos.

1. Producción y Cribado de Sobrenadantes de Hibridoma de 2B8 por RIA.

Se inmunizaron diez ratones BALB/c con 20 millones de células SB suspendidas en PBS que contenía adyuvante de Freund completo. Las células se inyectaron tanto s.c como i.p en múltiples sitios en el animal. Después de un periodo de descanso de 2 semanas, se inyectó a los ratones una segunda vez células SB emulsionadas en adyuvante de Freund incompleto. Se realizaron refuerzos de inmunización posteriores en un esquema semanal con células SB suspendidas en PBS. Los ratones se inmunizaron durante un periodo de 6 semanas a 4 meses.

Se sacrificaron dos animales cada vez por dislocación cervical y sus bazos se retiraron para fusión con el mieloma murino SP2/0. Los animales se eligieron tomando como base la capacidad del suero post-inmune de inhibir eficazmente la unión del anticuerpo anti-CD20 Coulter B1 radiomarcado a células SB humanas. Tres días antes de cada fusión, se proporcionó a los animales seleccionados una última inyección intravenosa (vena de la cola) de 20 millones de células SB en PBS. Después del sacrificio, los bazos se retiraron en condiciones asépticas y los esplenocitos se fusionaron con células SP2/0 en una proporción 5:1 (esplenocitos:SP2/0). Las células fusionadas se lavaron en medio de cultivo tisular y se distribuyeron en placas de 96 pocillos que contenían medio de selección HAT. Los hibridomas se cribaron por radioinmunoensayo de inhibición usando anticuerpo Coulter B1 después de 10-14 días.

El cribado de los híbridos que secretaban anticuerpo anti-CD20 se consiguió usando métodos de radioinmunoensayo establecidos. Brevemente, el anticuerpo anti-CD20 Coulter B1 se purificó por cromatografía de afinidad con Proteína A. Cincuenta microgramos de anticuerpo purificado se acoplaron a ¹²⁵I por oxidación breve en presencia de Iodobeads (Pierce Chemical Co.), según el procedimiento del fabricante. El anticuerpo radiomarcado se desaló en resina de amberlita y se almacenó en tampón de dilución (PBS, pH 7,4, que contenía 0,2% gelatina, 0,02% azida sódica y 1,0% BSA). Se pusieron diez nanogramos de anticuerpo radiomarcado en cada pocillo de una placa de ensayo de filtro previamente bloqueada (tampón de bloqueo: tampón de dilución que contenía 10% FBS) junto con 50 µL de sobrenadante de hibridoma de los pocillos de ensayo y 100.000 células SB suspendidas en 50 µL de tampón de dilución. La suspensión se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron concienzudamente con tampón de lavado (PBS, pH 7,4, que contenía 0,2% gelatina y 0,02% azida sódica) en un instrumento de filtración a través de membrana con vacío V&P Científico y los sedimentos del filtro que contenían células SB atrapadas se transfirieron a un contador gamma. Los pocillos que sólo contenían medio HAT y anticuerpo B1 marcado se usaron como controles de fondo y los pocillos idénticos que contenían células SB se usaron como controles positivos. Los controles de inhibición contenían B1 radiomarcado y varias cantidades de anticuerpo B1 no marcado que variaban de 2 µg a 2 ng.

35 2. Estudios de Citometría de Flujo.

a. Líneas Celulares

Se realizaron estudios preliminares de citometría de flujo con sobrenadantes de cultivos de hibridoma 2B8. Se incubaron cien microlitros de sobrenadante de hibridoma con células SB durante una hora a temperatura ambiente; se añadió posteriormente un anticuerpo secundario (anti-IgG F(ab')₂ de ratón de cabra; Cappel), usado a una dilución 1/400, y la incubación continuó durante 1 hora en oscuridad. Las células se lavaron 5 veces. Los controles incluyeron sólo células (sin anticuerpo primario ni secundario) a partir de los que se determinó la autofluorescencia, células sólo con anticuerpo secundario para determinar la unión no específica y B1 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (B1-FITC) disponible comercialmente para un control de la población CD20.

Para algunos experimentos, la fluoresceína se acopló a anticuerpo 2B8 purificado mediante la reacción de grupos amino con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Brevemente, el anticuerpo 2B8 (1,2 mg/mL) se incubó en tampón pH 9,5, 0,1 M carbonato sódico con 150-200 µg de FITC por mg de proteína. La disolución se incubó a temperatura ambiente durante

2 horas y el conjugado 2B8-FITC resultante se purificó en una columna Sephadex G-25. Otros reactivos usados en estos estudios tales como B1 y Leu 16 se adquirieron como conjugados de fluoresceína directamente en Coulter o Becton Dickinson.

5 Las células que se iban a analizar se recogieron y se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,2% BSA y 0,1% azida
sódica. La viabilidad se determinó por exclusión de azul de tripán con un requerimiento de viabilidad de > 90%. Las
concentraciones celulares se ajustaron a 3 millones por ml con 50 µL añadidos por pocillo en placas de fondo en U de 96
pocillos. El anticuerpo primario (50 µL) se añadió a los pocillos apropiados y la mezcla se incubó durante 30 min. a 1 h. a
temperatura ambiente; posteriormente, las células se lavaron 5 veces con 200 µL/pocillo de PBS que contenía 0,2% BSA
10 y 0,02% azida sódica. Las células se centrifugaron en las placas a 1.300 RPM durante 1 min. en una centrífuga Sorvall y
los sobrenadantes se retiraron "golpeando" suavemente las placas. Se añadió anticuerpo secundario, si era necesario, y
se incubó durante 30 min a 1h adicionales a temperatura ambiente en oscuridad; los pocillos se lavaron como
anteriormente. Finalmente, se añadieron 200 µL de tampón de fijación (0,15 M cloruro sódico que contenía 1%
paraformaldehído, pH 7,4) a cada muestra y las células tratadas se transfirieron a tubos 12X75 mm para el análisis.

b. Sangre completa de monos cinomolgus.

15 Después de la retirada del plasma, las células se lavaron dos veces por centrifugación y resuspensión en HBSS. Se
añadió suero bovino fetal (2 mL) y las células se resuspendieron. Se distribuyeron cien microlitros de las células
resuspendidas en cada uno de 6 tubos de centrifuga cónicos de 15 ml. Se añadieron anticuerpos monoclonales
marcados con fluorescencia como sigue:

Tubo #1: Anti-CD2 murino-FITC (AMAC), 2,5 µg/mL, 5µg;

20 Tubo #2: Anti-IgM humana de cabra-FITC (Fisher), 2,5 µg/mL, 5µg;

Tubo #3: Anti-IgG de ratón de cabra-RPE (Fisher), 2,5 µg/mL, 5µg;

Tubo #4: Anti-IgM humana de cabra-FITC + anti-IgG de ratón de cabra-RPE (absorbido), 2,5 µg/mL, 5µg;

Tubo #5: Anti-CD20 humano-FITC (anti-Leu 16, Becton Dickinson), 5 µg;

Tubo #6: Sólo células (auto-fluorescencia).

25 Los anticuerpos marcados y las células se centrifugaron durante 2 min a 1.500 rpm para mezclar las células y los
anticuerpos y las 6 muestras se pusieron en hielo y se incubaron durante 30 min. Posteriormente, los tubos se quitaron
del hielo y se añadió tampón de lisis (precalentado hasta 37°C) hasta un volumen de 12 mL. Las muestras se incubaron
durante 15 min a temperatura ambiente, se centrifugaron durante 5 min a 4°C a 1.500 rpm y se retiraron los
sobrenadantes. Los sedimentos celulares se lavaron dos veces en tampón de marcaje (PBS que contenía 1% BSA y
30 0,05% azida sódica).

Posteriormente, las células se fijaron por la adición de 0,5 mL de tampón de fijación (0,15 M cloruro sódico, pH 7,4, que
contenía 1% paraformaldehído) por tubo y se analizaron en un instrumento FACScan de Becton Dickinson usando
autocompensación y precalibrado con lechos Calibrite. La fluorescencia verde de la fluoresceína se midió en modo FL1 y
la fluorescencia roja de la ficoeritrina se midió en modo FL2. Los datos se expresaron en forma logarítmica. Las
35 poblaciones de linfocitos viables se identificaron inicialmente por dispersión de la luz frontal frente a ángulo recto en un
mapa de bits de dispersión de puntos. La población de linfocitos total se aisló mediante la exclusión de los demás
eventos. Las medidas de fluorescencia posteriores reflejaron sólo aquellos eventos específicos que ocurrieron en el área
seleccionada.

40 Para los estudios de farmacología/toxicología con dosis alta se determinaron los niveles de linfocitos anteriores al
estudio para cada mono cinomolgus y se usaron como valores de línea base. Se calculó el porcentaje de células T y B y
las proporciones T:B y se usó como referencias de depleción. La población de células B anterior al estudio se enumeró
con anticuerpos Leu 16 y anti-IgM humana.

Después de la inyección de 2B8 a los monos, cuando el antígeno CD20 estaba saturado con 2B8, el porcentaje de células B en la población total se aproximó usando anti-IgM humana de cabra-FITC, anti-IgG de ratón-RPE y la población con doble tinción que contenía estos dos marcadores. La población con doble tinción se usó para la cuantificación hasta que todo el 2B8 se aclaró de la sangre periférica de los animales. El porcentaje de células T en la población de linfocitos total se estimó usando anti-CD2-FITC. Los datos se promediaron de tres medidas de 10.000 eventos hechas con cada muestra. Las células de cada una de las muestras de sangre designadas se evaluaron posteriormente, enumerando en cada caso las subpoblaciones de células T y B en la población de linfocitos total. También se examinaron las proporciones T:B. La depleción de células B se calculó como el porcentaje de reducción de células B respecto a los niveles originales de células B para cada mono individual.

10 3. Radioyodación e Inmunoprecipitación de CD20.

Se dividieron cien millones de células SB en dos partes iguales después de la yodación superficial con ¹²⁵I y Iodobeads (Pierce Chemical Co.). Las células se lavaron repetidamente por centrifugación hasta que los niveles de radiactividad en el sobrenadante volvieron al fondo. Se añadieron cien microgramos de anticuerpo 2B8 o B1 (Coulter Immunology) a una de las dos muestras de células B marcadas. Los anticuerpos y las células SB se incubaron toda la noche y se lavaron tres veces por centrifugación hasta que se eliminó todo el anticuerpo no unido. Los sedimentos celulares que contenían 2B8 y B1 unidos se lisaron y se extrajeron por adición de detergente 1% NP-40 en 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 1 h. El extracto se centrifugó en una microfuga a alta velocidad durante 30 min y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Se añadió Proteína A-Sefarosa (300 µL) a cada tubo y la resina se sedimentó por centrifugación. La proteína A-Sefarosa se lavó 20 veces para eliminar proteína yodada unida no específicamente. Cuando la proporción de radiactividad lecho a sobrenadante alcanzó un valor de 100, el sedimento se extrajo con tampón de muestra de SDS PAGE y se calentó hasta la ebullición. Después de enfriar, se añadieron aproximadamente 15.000 cpm de cada uno de los extractos a pocillos de un gel de poliacrilamida al 10%. Se añadió un estándar pre-teñido de bajo peso molecular (BioRad Inc.) a un pocillo separado y se usó para la estimación del peso molecular. Las proteínas se resolvieron por electroforesis y el gel se secó y se expuso a una lámina de película de rayos X durante 24 horas a -70°C; posteriormente, la película se reveló y se analizó.

25 4. Análisis Scatchard de la unión de 2B8.

Se evaluó 2B8 purificado para afinidad aparente por análisis Scatchard. Se preparó 2B8 radiomarcado por reacción con ¹²⁵I en presencia de Iodobeads. Después de la eliminación del yodo libre, el anticuerpo radiomarcado se incubó en varias concentraciones, en duplicado, que variaron de 5.000 ng por pocillo a 35 ng/pocillo con 10.000 células SB. La cantidad de unión de anticuerpo a las células se calculó a partir de la actividad específica del 2B8 marcado con ¹²⁵I. La proporción de anticuerpo unido/libre se representó frente a la concentración molar de anticuerpo unido y la constante de afinidad aparente se determinó a partir de la proporción de los interceptos del eje X e Y.

30 5. Preparación de 2B8-MX-DTPA

a. Fuente de MX-DTPA

35 Para algunos estudios pre-clínicos, el ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentiainopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 fue proporcionado como un sólido seco por el Dr. Otto Gansow en el National Institute of Health y se almacenó desecado a 4°C protegido de la luz. Se prepararon disoluciones madre del quelato en agua Milli-Q y se determinó la concentración evaluando la radiactividad y usando la actividad específica del compuesto. Las disoluciones madre fueron generalmente 2-5 mM y se almacenaron a -70°C en tubos de polipropileno. Para otros estudios, MX-DTPA se obtuvo de Coulter Immunology como la sal disodio en agua y se almacenó a -70°C.

40 b. Mantenimiento de Condiciones sin Metales

Además de usar reactivos sin metales, todas las manipulaciones de los reactivos se realizaron de manera que se minimizara la posibilidad de contaminación por metales. Cuando fue posible, se usaron contenedores de plástico de polipropileno tales como matraces, vasos de precipitados y probetas graduadas. Éstos se lavaron con Alconox y se aclararon exhaustivamente con agua Milli-Q antes del uso. Además, se usaron puntas de pipeta sin metales (BioRad) para manipular de manera exacta volúmenes pequeños. Para manipular volúmenes mayores de reactivos, se usaron

pipetas serológicas de plástico (disponibles en tamaños de 1 a 25 mL). Las reacciones se realizaron convenientemente en tubos de microfuga de polipropileno con tope de rosca (Sardstedt Industries; capacidad de 1,5 mL) o tubos cónicos de polipropileno (Costar; 15 mL y 50 μ L). Cuando se manipularon tubos de diálisis, se usaron guantes quirúrgicos desechables, aclarados previamente con agua Milli-Q.

5 c. Preparación del Anticuerpo.

El anticuerpo anti-CD20 murino 2B8 se purificó inicialmente a partir de ascites por cromatografía de Proteína A y QAE. Para los experimentos posteriores, 2B8 se purificó a partir de sobrenadantes de biorreactor de fibra hueca usando el mismo proceso de purificación. El anticuerpo derivado de fibra hueca se ha reemplazado ahora para propósitos de comercialización por el anticuerpo derivado de CHO descrito en el Ejemplo 2.

- 10 El anticuerpo se preparó para conjugación transfiriéndolo a 50 mM bicina-NaOH sin metales, pH 8,6, que contenía 150 mM NaCl, usando diálisis o intercambio repetido de tampón. En algunos estudios, el intercambio de tampón se efectuó usando ultrafiltración repetitiva con filtros de centrifuga Centricon 30 (Amicon) (30.000D MWCO). En general, se añadieron 50-200 μ L de proteína (10 mg/mL) a la unidad de filtro y se añadieron 2 mL de tampón bicina. El filtro se centrifugó a 4°C en un rotor Sorval SS-34 a 6.000 rpm durante 45 min. El volumen de retenido fue aproximadamente 50-
15 100 μ L. Este proceso se repitió dos veces con el mismo filtro. El retenido se transfirió a un tubo de polipropileno con tapa de rosca de 1,5 mL, se ensayó para proteína, se diluyó hasta 10,0 mg/mL y se almacenó a 4°C hasta que se usó para conjugación. Para algunos estudios, la proteína se transfirió a 50 mM citrato sódico, pH 5,5 que contenía 150 mM NaCl y 0,05% azida sódica usando el mismo protocolo descrito anteriormente.

d. Protocolo de Conjugación

- 20 La conjugación de 2B8 con MX-DTPA se realizó en tubos de polipropileno a temperatura ambiente. Se descongelaron disoluciones madre congeladas de MX-DTPA inmediatamente antes del uso. Típicamente, se hicieron reaccionar 50-200 μ L de anticuerpo a 10 mg/mL con quelato a una proporción molar de quelato a proteína de 4:1. Las reacciones se iniciaron por adición de disolución madre de quelato y mezclado suave; se dejó que la conjugación se produjera toda la noche, generalmente durante 14 a 20 h, a temperatura ambiente. El quelato que no había reaccionado se eliminó del
25 conjugado por diálisis o ultrafiltración repetitiva, como se ha descrito anteriormente, en disolución salina normal sin metales (0,9% p/v) que contenía 0,05% azida sódica. La concentración de proteína se ajustó hasta 10 mg/mL y se almacenó a 4°C en un tubo de polipropileno hasta el radiomarcaje.

e. Determinación de la Incorporación de Quelato

- 30 La incorporación del quelato se determinó por conteo de centelleo y comparando el valor obtenido con el conjugado purificado con la actividad específica del quelato marcado con carbono-[14]. Para estudios posteriores, en los que se usó quelato no radiactivo obtenido de Coulter Immunology, la incorporación del quelato se evaluó incubando el conjugado con un exceso de una disolución de vehículo radiactivo de ⁹⁰Y de concentración y actividad específica conocidas.

- Brevemente, se preparó una disolución madre de cloruro de itrio de concentración conocida en 0,05 N HCl sin metales a la que se añadió ⁹⁰Y (sal cloruro) sin vehículo. Una alícuota de esta disolución se analizó por conteo de centelleo líquido
35 para determinar una actividad específica exacta para este reactivo. Se añadió a un tubo de polipropileno un volumen del reactivo de cloruro de itrio igual a 3 veces el número de moles de quelato que se esperaba que estuvieran unidos al anticuerpo, típicamente 2 moles/mol de anticuerpo, y el pH se ajustó a 4,0-4,5 con 2 M acetato sódico. El anticuerpo conjugado se añadió posteriormente y la mezcla se incubó 15-30 min a temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo 20 mM EDTA a una concentración final de 1 mM y el pH de la disolución se ajustó a aproximadamente pH 6
40 con 2M acetato sódico.

Después de una incubación de 5 min, el volumen completo se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento como se describe más adelante. Las fracciones eluidas que contenían proteína se combinaron, se determinó la concentración de proteína y se ensayó una alícuota para radiactividad. La incorporación de quelato se calculó usando la actividad específica de la preparación de cloruro de ⁹⁰Y y la concentración de proteína.

45

f. Inmunoreactividad de 2B8-MX-DTPA

La inmunoreactividad de 2B8 conjugado se evaluó usando ELISA de células completas. Se recogieron células SB en fase semi logarítmica del cultivo por centrifugación y se lavaron dos veces con 1X HBSS. Las células se diluyeron hasta 1-2 X 10⁶ células/mL en HBSS y se alicuotaron en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos a 50.000-100.000 células/pocillo. Las placas se secaron en vacío durante 2 h a 40-45°C para fijar las células al plástico. Las placas se almacenaron secas a -20°C hasta que se usaron. Para el ensayo, las placas se calentaron hasta temperatura ambiente inmediatamente antes del uso, se bloquearon con 1X PBS, pH 7,2-7,4 que contenía 1% BSA (2 h). Las muestras para el ensayo se diluyeron en 1X PBS/1% BSA, se aplicaron a las placas y se diluyeron de forma seriada (1:2) en el mismo tampón. Después de incubar las placas durante 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces con 1X PBS. Se añadió anticuerpo secundario (conjugado específico anti-IgG1 de ratón de cabra HRP) (50 µL) a los pocillos (dilución 1:1.500 en 1X PBS/1% BSA) y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces con 1X PBS seguido de la adición de disolución de sustrato ABTS (50 mM citrato sódico, pH 4,5 que contenía 0,01% ATBS y 0,001% H₂O₂). Las placas se leyeron a 405 nm después de 15-30 min de incubación. En los ensayos se incluyeron células HSB negativas para el antígeno para monitorizar la unión no específica. La inmunoreactividad del conjugado se calculó representando los valores de absorbancia frente al factor de dilución respectivo y comparando éstos con valores obtenidos usando el anticuerpo nativo (que representa 100% de inmunoreactividad) ensayado en la misma placa. Se compararon varios valores en la parte lineal del perfil de titulación y se determinó un valor medio.

g. Estabilidad *In Vitro* de 2B8 Nativo y 2B8-MX-DTPA

Para esta evaluación de 12 semanas de la estabilidad del anticuerpo y el conjugado, se formularon alicuotas de anticuerpo 2B8 y 2B8-MX-DTPA en disolución salina normal o disolución salina normal que contenía 10 mM glicina-HCl, pH 6,8. Se incubaron conjuntos duplicados de muestras tanto a 4^o como a 30°C y las muestras se ensayaron semanalmente usando los métodos siguientes: SDS-PAGE (tanto reductora como no reductora), inmunoreactividad por inmunoensayo enzimático de células completas usando bien células SB (positivas para el antígeno) o HSB (negativas para el antígeno) como captura, y electroforesis en gel con enfoque isoeléctrico (intervalo de pH, 3-10). Además, la eficacia del radiomarcaje del conjugado se evaluó en las semanas 4, 8 y 12 por radiomarcaje del conjugado con ⁹⁰Y y analizando el producto por SDS-PAGE y análisis autoradiográfico. Finalmente, en un estudio separado, se radiomarcaron alicuotas de 2B8-MX-DTPA incubadas a 4^o y 30°C durante 10 semanas con ¹¹¹In y se evaluaron en un estudio de biodistribución en ratones BALB/c como se describe más adelante.

h. Estudios de Inmunohistología.

Los estudios de inmunohistología tanto con los anticuerpos nativos como conjugados (2B8-MX-DTPA) se realizaron por IMPATH Laboratories usando secciones de tejidos humanos fijadas con acetona. El anticuerpo se purificó a partir de sobrenadantes de biorreactor de fibra hueca por cromatografía en proteína A y Q Sefarosa. El conjugado de grado clínico se preparó usando MX-DTPA de Coulter Immunology según el protocolo descrito anteriormente.

i. Inmunoreactividad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA Radiomarcado.

Para algunos experimentos, se usó el protocolo de ELISA de células completas para 2B8-MX-DTPA no marcado. En experimentos posteriores, la inmunoreactividad de los conjugados marcados con ¹¹¹In y ⁹⁰Y (cada uno preparado en IDEC Pharmaceuticals o, alternativamente, en MPI Pharmacy Services, Inc.) se determinó usando una versión modificada del ensayo de unión de células completas descrito por Lindmo (3). Brevemente, se añadieron concentraciones crecientes de células SB positivas para el antígeno o células HSB negativas para el antígeno en fase semi-logarítmica [20-30 X 10⁶ células/mL en tampón de dilución (PBS, pH 7,4 que contenía 1% BSA, 0,1% gelatina, y 0,02% azida sódica)] a conjuntos duplicados de tubos. El conjugado radiomarcado se diluyó hasta una concentración final de anticuerpo de 1-5 ng/mL con tampón de dilución y se añadieron 0,35 mL a cada tubo. Después de un periodo de incubación de 75-90 min a temperatura ambiente, las células se sedimentaron por centrifugación y se recogieron los sobrenadantes. La radiactividad remanente en la fracción del sobrenadante se determinó con un contador gamma o de centelleo. Los datos se representaron como el cociente de la radiactividad total añadida dividido por la radiactividad asociada a las células, frente a la inversa del número de células por tubo. El intercepto del eje de las y representa así la fracción inmunoreactiva.

j. Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA Radiomarcado en Suero Humano.

La estabilidad *in vitro* de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{111}In y ^{90}Y se evaluó por incubación en suero humano a 37°C durante 96 horas. El anticuerpo conjugado se preparó y radiomarcó con ^{111}In (protocolo "mix-and-shoot") o ^{90}Y como se ha descrito anteriormente. Las actividades específicas de los conjugados marcados con ^{111}In y ^{90}Y fueron 2,5 y 14,6 mCi/mg, respectivamente; los conjugados radiomarcados se suspendieron en tampón que contenía 75 mg/mL de albúmina de suero humano (HSA) y 1 mM DTPA (conjugado marcado con itrio) o tampón que contenía 50 mg/mL HSA (conjugado marcado con indio). Los conjugados radiomarcados se diluyeron 1:10 con suero humano normal (sin inactivar con calor) y se pusieron alicuotas asépticamente en tubos tapados estériles; estos tubos se incubaron a 37°C durante periodos de hasta 96 horas. A tiempos seleccionados, se tomaron muestras de conjugado y se analizaron por SDS-PAGE no reductora en geles con un gradiente 4-20% seguido de autorradiografía y cromatografía en capa fina instantánea.

k. Estabilidad *In Vitro* de ^{111}In -2B8-MX-DTPA Formulado Clínicamente.

El conjugado 2B8-MX-DTPA se radiomarcó con ^{111}In y se usó sin purificación por HPLC (protocolo "mix-and-shoot"). El anticuerpo radiomarcado se diluyó en PBS y se añadió albúmina de suero humano (HSA) a una concentración final de 50 mg/mL. La actividad específica del conjugado radiomarcado formulado fue 2,2 mCi/mg. El conjugado formulado se incubó posteriormente a 4°C durante 48 horas y se analizaron alicuotas en el tiempo 0, 24 y 48 horas usando SDS-PAGE no reductora en geles con un gradiente 4-20% seguido de autorradiografía y cromatografía en capa fina instantánea. La inmunoreactividad en cada punto de tiempo se evaluó usando el ensayo de suspensión de células completas descrito en la sección 1 anterior.

l. 1. Estabilidad *In Vitro* de ^{90}Y -2B8-MX-DTPA Formulado Clínicamente.

El conjugado 2B8-MX-DTPA se radiomarcó con ^{90}Y y se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño en HPLC usando 1X PBS como un tampón de elución. Las fracciones de conjugado radiomarcado se combinaron y se añadieron albúmina de suero humano y DTPA a concentraciones finales de 75 mg/mL y 1 mM, respectivamente. La actividad específica del conjugado radiomarcado formulado fue 14,6 mCi/mg. El conjugado formulado se incubó posteriormente a 4°C durante 48 horas y se analizaron alicuotas en el tiempo 0, 24 y 48 horas usando SDS-PAGE no reductora en geles con un gradiente 4-20% seguido de autorradiografía y cromatografía en capa fina instantánea. La inmunoreactividad en cada punto de tiempo se evaluó usando el ensayo de suspensión de células completas descrito en la sección 1 anterior.

2. Estudios en Animales.

a. Estudio en Primates de Farmacología/Toxicología con Dosis Alta Usando 2B8.

El anticuerpo 2B8 se evaluó en un estudio de farmacología de dosis alta realizado bajo regulaciones BPL en el White Sands Research Center (Número de Estudio 920111). Se usaron monos adultos *Macaca fascicularis* (cinomolgus); los grupos de estudio consistieron cada uno en un macho y una hembra. El anticuerpo se inyectó intravenosamente cada 48 horas durante un total de siete inyecciones. El estudio consistió en cinco grupos: Grupo I (disolución salina); Grupo II (0,6 mg/kg); Grupo III (2,5 mg/kg); Grupo IV (10 mg/kg); y, Grupo V (10 mg/kg sólo en el día 0).

Antes del inicio del estudio, se obtuvo sangre de los 10 animales y se usó para determinar los fondos de los reactivos y las poblaciones iniciales de células B. Todas las muestras de sangre posteriores se extrajeron antes de cada inyección de anticuerpo. Los Grupos III y IV se sacrificaron en el día 13 para necropsia e histopatología completa.

A los animales en los grupos I, II y V se les extrajo sangre en los días 0, 1, 3, 7, 13, 21, 37 y 52; se extrajeron aproximadamente 5 mL de de sangre completa en tubos heparinizados. La sangre completa se mantuvo a 4°C y se analizó en 24 horas. La sangre de cada animal se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 min. y el plasma sobrenadante se retiró para ensayo de niveles séricos de 2B8 por RIA (véase el procedimiento de RIA para métodos de ensayo específicos). El material sedimentado que contenía PBL y RBC se resuspendió en FCS para análisis FACS.

b. Estudios Farmacocinéticos con 2B8 y 2B8-MX-DTPA.

La vida media beta en suero media de 2B8 en monos cinomolgus se determinó usando los animales del Grupo V (anterior). Se diluyó anti-IgG1 de ratón de cabra (Fischer Scientific) hasta 2,0 µg por ml en 10 mM tampón borato, pH 9,6, y se añadieron 50 µL a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se dejó que el anticuerpo se uniera a la placa durante una incubación de toda la noche a 4°C, o durante 2 h a temperatura ambiente. Cada placa se bloqueó durante 30 min. a temperatura ambiente con 150 µL por pocillo de PBS que contenía 1% BSA. Las placas se lavaron con agua destilada y se aplicaron muestras de suero o plasma en triplicado a pocillos individuales a una dilución inicial 1:100 seguido de diluciones seriadas 1:2. Se añadió 2B8 purificado a sueros pre-extraídos y se diluyó para uso como una curva estándar empezando con 0,5 mg/mL; las muestras se diluyeron 1:100 y entonces se diluyeron de forma seriada como con las demás muestras. Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con agua destilada. El reactivo secundario (anti-IgG1 de ratón de cabra-HRPO) se añadió a una dilución 1:4.000 y se incubó a temperatura ambiente durante una hora adicional. Las placas se lavaron de nuevo en agua destilada y se añadió 0,1 mL de sustrato de peroxidasa que contenía peróxido de hidrógeno. Se dejó que se desarrollara el color de la reacción durante 20 min.; la absorbancia se determinó posteriormente a 405 nm usando un lector de microplacas ELISA. Los resultados se representaron en µg de anticuerpo por mL de suero.

Además, se determinaron los valores $\beta t_{1/2}$ de 2B8 y 2B8-MX-DTPA en ratones BALB/c. El 2B8 no conjugado almacenado a -70°C en 1X PBS, pH 7,4/10% glicerol se descongeló, se diluyó hasta 0,5 mg/mL y se esterilizó por filtración. El anticuerpo conjugado se preparó según protocolos estándar pero con quelato marcado con carbono-[14]; la incorporación de quelato fue 1,5 moles/mol de anticuerpo. El conjugado purificado se diluyó hasta 0,5 mg/mL en disolución salina normal (0,9%), se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C con el anticuerpo nativo hasta que se usó.

Se inyectaron a ratones de seis a ocho semanas de edad 100 µL de anticuerpo 2B8 purificado a una concentración de 250 µg/mL. Posteriormente, se extrajo sangre de los ratones por punción retro-orbital a varios tiempos que variaron de 0 a 264 horas y sus sueros se analizaron para la presencia del anticuerpo 2B8 nativo y conjugado por inmunoensayo enzimático de células completas usando la línea de células B SB positiva para el antígeno como la captura. Los datos resultantes se representaron como la concentración de 2B8 ó 2B8-MX-DTPA frente al tiempo; a partir de estos resultados se generó un gráfico de regresión lineal y la pendiente se usó para determinar los valores $\beta t_{1/2}$.

c. Estudio de Farmacología/Toxicología de [89]-Y-2B8-MX-DTPA en Monos Cinomolgus.

Se preparó 2B8-MX-DTPA que portaba itrio-[89] usando el protocolo descrito para la inserción de ⁹⁰Y, excepto que no se usó la purificación por HPLC. El conjugado no radiactivo, que portaba metales se formuló en 1X PBS que contenía 75 mg/mL HSA y 1 mM DTPA y se evaluó en el estudio GLP con número 920611 en White Sands Research Center. En cada uno de cuatro grupos se incluyó un macho y una hembra. Se inyectaron a los animales intravenosamente cada 48 horas durante un total de 7 inyecciones las cantidades siguientes de fármaco: grupo I (disolución salina); grupo II (0,003 mg/kg); grupo III (0,03 mg/kg); y, grupo IV (0,3 mg/kg). Los animales se evaluaron durante el estudio determinando los pesos y temperaturas corporales, consumo de alimentos y agua, eliminación, químicas séricas, hematología, urianálisis y exámenes físicos. A los animales de los grupos I a IV se les extrajo sangre antes de la infusión en los días 0, 2, 7, 10 y 14 y la sangre se analizó para niveles de células B circulantes por análisis FACS.

d. Biodistribución de 2B8-MX-DTPA Radiomarcado

En un estudio preliminar, se evaluó 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In para biodistribución tisular en ratones BALB/c de seis a ocho semanas de edad. El conjugado radiomarcado se preparó usando 2B8-MX-DTPA de grado clínico según el protocolo "mix and shoot" descrito anteriormente. La actividad específica del conjugado fue 2,3 mCi/mg y el conjugado se formuló en PBS, pH 7,4 que contenía 50 mg/mL HSA. Se inyectaron a los ratones intravenosamente 100 µL de 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In (aproximadamente 21 µCi) y se sacrificaron grupos de tres ratones por dislocación cervical a las 0, 24, 48 y 72 horas. Después del sacrificio, la cola, corazón, pulmones, hígado, riñón, bazo, músculo y fémur se retiraron, lavaron, pesaron; también se retiró una muestra de sangre para el análisis. La radiactividad asociada con cada muestra se determinó por conteo gamma y posteriormente se determinó el porcentaje de dosis inyectada por gramo de

tejido. No se hizo ningún intento para restar la contribución de actividad representada por la sangre asociada con órganos individuales.

En un protocolo separado, se radiomarcaron alícuotas de 2B8-MX-DTPA incubadas a 4^o y 30^oC durante 10 semanas con ¹¹¹In hasta una actividad específica de 2,1 mCi/mg para ambas preparaciones. Estos conjugados se usaron en estudios de biodistribución en ratones como se ha descrito anteriormente.

Para las determinaciones de dosimetría, 2B8-MX-DTPA se radiomarcó con ¹¹¹In hasta una actividad específica de 2,3 mCi/mg y se inyectaron aproximadamente 1,1 µCi en cada uno de 20 ratones BALB/c. Posteriormente, se sacrificaron grupos de cinco ratones cada uno a las 1, 24, 48 y 72 horas y sus órganos se retiraron y prepararon para análisis. Además, partes de la piel, músculo y hueso se retiraron y procesaron para análisis; también se recogieron la orina y heces y se analizaron para los puntos de tiempo 24-72 horas.

Usando una estrategia similar, 2B8-MX-DTPA también se radiomarcó con ⁹⁰Y y se evaluó su distribución biológica en ratones BALB/c durante un periodo de tiempo de 72 horas. Después de la purificación por cromatografía de exclusión por tamaño HPLC, se inyectó intravenosamente a cuatro grupos de cinco ratones cada uno aproximadamente 1 µCi de conjugado formulado clínicamente (actividad específica: 12,2 mCi/mg); los grupos se sacrificaron posteriormente a 1, 24, 48 y 72 horas y sus órganos y tejidos se analizaron como se ha descrito anteriormente. La radiactividad asociada con cada muestra de tejido se determinó midiendo la energía bremsstrahlung con un contador de centelleo gamma. Los valores de actividad se expresaron posteriormente como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido o porcentaje de dosis inyectada por órgano. Aunque los órganos y otros tejidos se lavaron repetidamente para eliminar la sangre superficial, los órganos no se perfundieron. Así, no se restó a los valores de actividad en los órganos la contribución de actividad representada por la sangre asociada internamente.

e. Localización Tumoral de 2B8-MX-DTPA Marcado con ¹¹¹In.

La localización de 2B8-MX-DTPA radiomarcado se determinó en ratones atímicos que portaban tumores de células B Ramos. Se inyectaron subcutáneamente (flanco trasero izquierdo) a ratones atímicos de seis a ocho semanas de edad 0,1 mL de RPMI-1640 que contenía $1,2 \times 10^7$ células tumorales Ramos que se habían adaptado previamente para crecer en ratones atímicos. Los tumores surgieron en dos semanas y su peso varió de 0,07 a 1,1 gramos. Se inyectaron intravenosamente a los ratones 100 µL de 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In (16,7 µCi) y se sacrificaron grupos de tres ratones por dislocación cervical a 0, 24, 48 y 72 horas. Después del sacrificio, la cola, corazón, pulmones, hígado, riñón, bazo, músculo, fémur y tumor se retiraron, lavaron, pesaron; también se retiró una muestra de sangre para el análisis. La radiactividad asociada con cada muestra se determinó por conteo gamma y se determinó el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido.

3. Cálculos de Dosimetría

Usando los datos de biodistribución obtenidos usando ratones BALB/c a los que se inyectó bien 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In o ⁹⁰Y (Tablas 1-4 y 5-8), se calcularon las estimaciones de la dosis de radiación absorbida a partir de una dosis de 1,0 mCi administrada a un paciente de 70 kg usando la estrategia formalizada por el Comité de Medical Internal Radiation Dose (MIRD) de la Society of Nuclear Medicine. Las vidas medias biológicas de los conjugados radiomarcados se determinaron a partir de los valores de la dosis inyectada por órgano determinados a partir de los datos de biodistribución para cada radioinmunoconjugado. Para algunos tejidos, por ejemplo, sangre, se asumió que la desintegración biológica del radioconjugado seguía un modelo bicompartimental con una desintegración exponencial de estos compartimentos. Para otros tejidos, por ejemplo, el hígado, cuyos niveles de actividad permanecieron prácticamente constantes a lo largo del estudio de biodistribución de 72 horas, se asumió que la vida media biológica era muy larga y se le asignó un valor de 1.000 horas.

Tabla 1
Distribución de la Actividad 1,0 Hora Después de Inyección I.V. de
¹¹¹In-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios \pm SD

Muestra	Peso del órgano	%ID/	%ID por
	Gramo	Gramo	Órgano
Sangre	1,47 \pm 0,17	40,3 \pm 5,32	58,4 \pm 3,1
Corazón	0,087 \pm 0,01	5,88 \pm 0,76	0,51 \pm 0,05
Pulmón (2)	0,149 \pm 0,01	14,2 \pm 1,4	2,10 \pm 0,17
Riñón (1)	0,127 \pm 0,02	9,82 \pm 0,86	1,22 \pm 0,12
Hígado	1,06 \pm 0,20	10,32 \pm 1,58	10,76 \pm 1,93
Bazo	0,090 \pm 0,01	6,94 \pm 1,17	0,61 \pm 0,03
Músculo	8,39 \pm 0,98	0,70 \pm 0,25	5,67 \pm 1,35
Hueso	3,15 \pm 0,35	2,97 \pm 0,71	9,10 \pm 1,09
Piel	3,15 \pm 0,35	0,96 \pm 0,29	3,0 \pm 1,12
Tracto GI	2,58 \pm 0,31	6,10 \pm 2,00	7,80 \pm 1,80
Orina			-
Heces			-
		TOTAL	99,04 \pm 4,8

5

No. de Ratones= 5

Peso Medio= 20,97 \pm 2,46 gramos

Tabla 2
Distribución de la Actividad 24 Horas Después de Inyección I.V. de
¹¹¹In-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios \pm SD

Muestra	Peso del órgano	%ID/	%ID por
	Gramo	Gramo	Órgano
Sangre	1,47 \pm 0,07	21,97 \pm 1,87	32,22 \pm 1,35
Corazón	0,128 \pm 0,03	4,02 \pm 0,23	0,38 \pm 0,01
Pulmón (2)	0,152 \pm 0,02	7,90 \pm 1,61	1,20 \pm 0,18
Riñón (1)	0,128 \pm 0,01	5,94 \pm 0,40	0,76 \pm 0,04
Hígado	1,11 \pm 0,10	10,08 \pm 1,83	11,20 \pm 2,23
Bazo	0,082 \pm 0,01	5,04 \pm 0,75	0,40 \pm 0,02
Músculo	8,41 \pm 0,38	1,24 \pm 0,05	10,44 \pm 0,76
Hueso	3,15 \pm 0,14	2,02 \pm 0,33	6,31 \pm 0,81
Piel	3,15 \pm 0,14	3,75 \pm 0,39	11,77 \pm 1,09
Tracto GI	2,91 \pm 0,27	4,50 \pm 0,52	6,65 \pm 0,56
Orina			0,98
Heces			2,54
TOTAL			87,10 \pm 1,68

5

No. de Ratones= 5

Peso Medio= 21,03 \pm 0,94 gramos

Tabla 3
Distribución de la Actividad 48 Horas Después de Inyección I.V. de
¹¹¹In-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios \pm SD

Muestra	Peso del órgano	%ID/	%ID por
	Gramo	Gramo	Órgano
Sangre	1,45 \pm 0,13	22,41 \pm 3,95	31,90 \pm 2,89
Corazón	0,090 \pm 0,01	4,05 \pm 0,94	0,36 \pm 0,06
Pulmón (2)	0,155 \pm 0,02	8,45 \pm 0,53	1,31 \pm 0,19
Riñón (1)	0,125 \pm 0,01	6,16 \pm 1,15	0,76 \pm 0,07
Hígado	1,040 \pm 0,11	9,41 \pm 2,33	9,84 \pm 3,18
Bazo	0,082 \pm 0,01	5,32 \pm 0,71	0,48 \pm 0,11
Músculo	8,26 \pm 0,77	1,42 \pm 0,58	11,62 \pm 4,67
Hueso	3,10 \pm 0,29	2,08 \pm 0,16	6,41 \pm 0,44
Piel	3,10 \pm 0,29	3,43 \pm 0,59	10,54 \pm 1,69
Tracto GI	2,96 \pm 0,20	5,05 \pm 0,63	7,46 \pm 0,60
Orina			1,46
Heces			6,41
TOTAL			88,49 \pm 6,87

5

No. de Ratones= 5

Peso Medio= 20,65 \pm 1,93 gramos

Tabla 4
Distribución de la Actividad 72 Horas Después de Inyección I.V. de
¹¹¹In-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios \pm SD

Muestra	Peso del órgano	%ID/	%ID por
	Gramo	Gramo	Órgano
Sangre	1,52 \pm 0,06	18,97 \pm 1,31	28,51 \pm 2,03
Corazón	0,094 \pm 0,01	3,71 \pm 0,31	0,35 \pm 0,04
Pulmón (2)	0,161 \pm 0,01	7,60 \pm 0,30	1,18 \pm 0,09
Riñón (1)	0,135 \pm 0,01	5,55 \pm 0,53	0,76 \pm 0,09
Hígado	1,11 \pm 0,11	9,90 \pm 1,77	11,00 \pm 2,03
Bazo	0,095 \pm 0,01	5,12 \pm 0,75	0,48 \pm 0,04
Músculo	8,58 \pm 0,34	1,04 \pm 0,09	8,95 \pm 0,68
Hueso	3,22 \pm 0,12	1,73 \pm 0,34	6,04 \pm 0,51
Piel	3,22 \pm 0,12	3,16 \pm 0,60	10,19 \pm 2,03
Tracto GI	2,79 \pm 0,19	4,53 \pm 0,83	6,37 \pm 1,38
Orina			2,49
Heces			11,50
TOTAL			87,80 \pm 4,79

5

No. de Ratones= 5

Peso Medio= 21,46 \pm 0,84 gramos

Tabla 5
Distribución de la Actividad 1,0 Hora Después de Inyección I.V. de
⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales
Valores Medios ± SD

Muestra	Peso del órgano Gramo	%ID/ Gramo	%ID por Órgano
Sangre	1,27 ± 0,06	39,23 ± 2,45	49,77 ± 1,72
Corazón	0,086 ± 0,01	5,80 ± 0,84	0,50 ± 0,09
Pulmón (2)	0,137 ± 0,01	12,11 ± 1,08	1,66 ± 0,17
Riñón (1)	0,120 ± 0,01	10,23 ± 1,30	1,15 ± 0,12
Hígado	0,921 ± 0,05	12,12 ± 1,72	11,17 ± 1,66
Bazo	0,080 ± 0,01	9,27 ± 0,46	0,74 ± 0,07
Músculo	7,27 ± 0,32	0,78 ± 0,13	5,72 ± 1,05
Hueso	2,73 ± 0,12	4,35 ± 0,39	11,89 ± 1,47
Piel	2,73 ± 0,12	2,12 ± 0,78	5,82 ± 2,24
Tracto GI	2,22 ± 0,06	3,52 ± 1,12	4,22 ± 0,84
Orina	--	--	--
Heces	--	--	--
TOTAL			94,85 ± 3,47

5

No. de Ratones= 5

Peso Medio= 18,17 gramos ± 0,81 gramos

Tabla 6
Distribución de la Actividad 24 Horas Después de Inyección I.V. de
⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios \pm SD

Muestra	Peso del órgano	%ID/	%ID por
	Gramo	Gramo	Órgano
Sangre	1,517 \pm 0,090	8,35 \pm 2,547	12,83 \pm 4,60
Corazón	0,092 \pm 0,005	2,63 \pm 0,142	0,240 \pm 0,006
Pulmón	0,141 \pm 0,005	4,56 \pm 0,393	0,644 \pm 0,047
Riñón	0,138 \pm 0,007	5,63 \pm 0,222	0,779 \pm 0,040
Hígado	0,438 \pm 0,098	5,22 \pm 0,335	2,259 \pm 0,399
Bazo	0,081 \pm 0,003	4,23 \pm 0,180	0,345 \pm 0,011
Músculo	8,668 \pm 0,514	0,976 \pm 0,164	8,55 \pm 1,945
Hueso	3,246 \pm 0,186	1,326 \pm 0,102	4,289 \pm 0,154

5

No. de Ratones= 3

Peso Medio= 21,671 \pm 1,11 gramos

Tabla 7
Distribución de la Actividad 48 Horas Después de Inyección I.V. de
⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios \pm SD

Muestra	Peso del órgano	%ID/	%ID por
	Gramo	Gramo	Órgano
Sangre	1,33 \pm 0,06	17,34 \pm 2,0	23,03 \pm 1,95
Corazón	0,088 \pm 0,01	3,56 \pm 0,31	0,31 \pm 0,04
Pulmón (2)	0,139 \pm 0,01	7,54 \pm 0,88	1,05 \pm 0,15
Riñón (1)	0,122 \pm 0,01	6,53 \pm 0,42	0,79 \pm 0,01
Hígado	0,968 \pm 0,04	9,05 \pm 1,70	8,92 \pm 1,57
Bazo	0,087 \pm 0,01	6,52 \pm 1,13	0,57 \pm 0,07
Músculo	7,26 \pm 0,36	1,05 \pm 0,18	8,01 \pm 1,17
Hueso	2,86 \pm 0,14	3,34 \pm 0,42	9,53 \pm 1,08
Piel	2,86 \pm 0,14	4,13 \pm 0,76	11,75 \pm 1,82
Tracto GI	2,84 \pm 0,19	2,74 \pm 0,34	3,80 \pm 0,30
Orina	--	--	4,29
Heces	--	--	7,67
		TOTAL	79,72 \pm 3,23

5

No. de Ratones= 5

Peso Medio= 19,07 \pm 0,91 gramos

Tabla 8
Distribución de la Actividad 72 Horas Después de Inyección I.V. de
⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios \pm SD

Muestra	Peso del órgano	%ID/	%ID por
	Gramo	Gramo	Órgano
Sangre	1,35 \pm 0,02	15,40 \pm 1,63	20,71 \pm 2,13
Corazón	0,088 \pm 0,01	3,12 \pm 0,24	0,28 \pm 0,01
Pulmón (2)	0,142 \pm 0,01	8,23 \pm 1,05	1,17 \pm 0,20
Riñón (1)	0,123 \pm 0,01	6,45 \pm 0,57	0,79 \pm 0,07
Hígado	0,02 \pm 0,06	8,39 \pm 1,04	8,58 \pm 1,31
Bazo	0,103 \pm 0,01	5,90 \pm 1,19	0,59 \pm 0,08
Músculo	7,68 \pm 0,11	1,01 \pm 0,15	7,73 \pm 1,05
Hueso	2,88 \pm 0,05	3,20 \pm 0,25	9,20 \pm 0,61
Piel	2,88 \pm 0,05	3,97 \pm 0,49	11,42 \pm 1,36
Tracto GI	2,86 \pm 0,18	2,90 \pm 0,65	4,06 \pm 0,93
Orina	--	--	3,00
Heces	--	--	11,08
		TOTAL	78,62 \pm 2,63

5

No. de Ratones= 5

Peso Medio= 19,21 \pm 0,27 gramos

De una manera similar, los demás valores de vida media biológica se asignaron o calcularon usando la ecuación estándar para calcular el $t_{1/2}$ para una desintegración exponencial. Una vez se determinaron estos valores, se determinaron las variables para T_{ue} , T_{e1} , T_{e2} , A_1 , A_2 y A , listadas en las Tablas 9 y 10 para cada conjugado radiomarcado usando las ecuaciones proporcionadas en la parte superior de estas tablas (variables de salida). Estos valores, así como aquellos mostrados en las tablas posteriores, se calcularon usando un programa escrito en la hoja de cálculo Symphony (Lotus Development Corp.) por el Sr. Philip Hagan, MS, Nuclear Medicine Service, VA Medical Center, La Jolla, CA 92161.

Tabla 9

VARIABLES DE ENTRADA	VARIABLES DE SALIDA																		
A0= Dosis administrada	Tue= Tiempo medio de captación eficaz										Te1= Tiempo medio de desaparición eficaz del primer componente								
Tp= Vida media física del radionúclido																			Te2= Tiempo medio de desaparición eficaz del segundo componente
Tu= Tiempo medio de captación biológico																			A1= Actividad acumulada del primer componente
Tb1= Tiempo medio de desaparición biológica del primer componente																			A2= Actividad acumulada del segundo componente
Tb2= Tiempo medio de desaparición biológica del segundo componente																			A= Actividad acumulada total
f1= Fracción de A0 con tiempo medio biológico de Tb1																			Tue= $Tu * Tp / (Tu + Tp)$
f2= Fracción de A0 con tiempo medio biológico de Tb2																			Te1= $Tb1 + Tp / (Tb1 + Tp)$
S= Dosis Media/Unidad de Actividad Acumulada																			Te2= $Tb2 * Tp / (Tb2 + Tp)$
Ejemplo: A1 PARA HÍGADO - $1,44 * 11,000\% * 1,000 * 63,2 * 1,00 = 10.007,5$ microcurios actividad acumulada																			
TABLA DE VALORES DE ENTRADA Y SALIDA USADOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ACUMULADA (A)																			
ADRENALES	Tu (hr) 2,78E-04	f1 0,000%	f2 0,00%	Tb1 (hr) 1.000	Tb2 (hr) 0	Tue (hr) 2,78E-04	Te1 (hr) 63,2	A1 (uCi-hr) 0,0	A2 (uCi-hr) 0,0	A (uCi-hr) 0									
CONTENIDOS DE VEJIGA	2,78E-04	1,000%	0,00%	4	0	2,78E-04	3,8	54,4	0,0	54									
CONTENIDOS DEL ESTÓMAGO	2,78E-04	6,650%	0,00%	1,5	0	2,78E-04	1,5	140,5	0,0	141									
CONTENIDOS DE INT.DELG.	2,78E-04	6,650%	0,00%	3,5	0	2,78E-04	3,3	318,6	0,0	319									
CONTENIDOS_ULI	2,78E-04	6,650%	0,00%	4,5	0	2,78E-04	4,2	404,0	0,0	404									
CONTENIDOS_LLI	2,78E-04	6,650%	0,00%	4,2	0	2,78E-04	4,0	378,6	0,0	379									

	Tu (hr)	f1	f2	Tb1 (hr)	Tb2 (hr)	Tue (hr)	Te1 (hr)	Te2 (hr)	A1 (uCi-hr)	A2 (uCi-hr)	A (uCi-hr)
RIÑONES	2,78E-04	1,220%	0,00%	35	0	2,78E-04	23,0	0,0	404,8	0,0	405
HÍGADO	2,78E-04	11,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	10.007,5	0,0	10.008
PULMONES	2,78E-04	2,100%	1,20%	30	1.000	2,78E-04	20,8	63,2	627,9	1.091,7	1.720
OTR TEJ (TOTAL)	2,78E-04	0,000%									
MÚSCULO	2,78E-04	10,400%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	9.461,7	0,0	9.462
ADIPOSO	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
SANGRE	2,78E-04	58,400%	32,22%	15	1.000	2,78E-04	12,3	63,2	10.319,2	29.313,1	39.632
CEREBRO.	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
CORAZÓN	2,78E-04	0,510%	0,38%	57	1.000	2,78E-04	30,9	63,2	226,9	345,7	573
OVARIOS	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
PÁNCREAS	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
ESQUELETO (TOTAL)	2,78E-04	0,000%									
HUESO CORTICAL	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
HUESO TRABECULAR	2,78E-04	9,100%	6,30%	45	1.000	2,78E-04	27,0	63,2	3.536,8	5.731,6	9.268
MÉDULA (ROJA)	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
MÉDULA (AMARILLA)	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
CARTÍLAGO	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
OTROS CONST.	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0

PIEL	2,78E-04	11,770%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	10.708,1	0,0	10.708
	Tu (hr)	f1	f2	Tb1 (hr)	Tb2 (hr)	Tue (hr)	Te1 (hr)	Te2 (hr)	A1 (uCi-hr)	A2 (uCi-hr)	A (uCi-hr)
BAZO	2,78E-04	0,610%	0,40%	39	1.000	2,78E-04	24,7	63,2	217,1	363,9	581
TESTÍCULOS	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
TIROIDES	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	63,2	0,0	0,0	0,0	0
CUERPO TOTAL	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000							

	Tu (hr)	f1	f2	Tb1 (hr)	Tb2 (hr)	Tue (hr)	Te1 (hr)	Te2 (hr)	A1 (uCi-hr)	A2 (uCi-hr)	A (uCi-hr)
HÍGADO	2,78E-04	9,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	7.795,5	0,0	7.795
PULMONES	2,78E-04	1,200%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	1.039,4	0,0	1.039
OTR TEJ (TOTAL)	2,78E-04	0,000%									
MÚSCULO	2,78E-04	8,720%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	7.552,9	0,0	7.553
ADIPOSO	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
SANGRE	2,78E-04	49,770%	25,90%	13	1.000	2,78E-04	10,8	60,2	7.743,9	22.433,7	30.178
CEREBRO.	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
CORAZÓN	2,78E-04	0,500%	0,36%	51	1.000	2,78E-04	28,4	60,2	204,4	311,8	516
OVARIOS	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
PÁNCREAS	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
ESQUELETO (TOTAL)	2,78E-04	0,000%									
HUESO CORTICAL	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
HUESO TRABECULAR	2,78E-04	11,890%	9,28%	67	1.000	2,78E-04	32,7	60,2	5.604,4	8.038,0	13.642
MÉDULA (ROJA)	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
MÉDULA (AMARILLA)	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
CARTÍLAGO	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
OTROS CONST.	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
PIEL	2,78E-04	15,600%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	13.512,1	0,0	13.512

	Tu (hr)	f1	f2	Tb1 (hr)	Tb2 (hr)	Tue (hr)	Te1 (hr)	Te2 (hr)	A1 (uCi-hr)	A2 (uCi-hr)	A (uCi-hr)
BAZO	2,78E-04	0,740%	0,56%	60	1.000	2,78E-04	31,0	60,2	330,0	485,1	815
TESTÍCULOS	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
TIROIDES	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0
CUERPO TOTAL	2,78E-04	0,000%	0,00%	1.000	0	2,78E-04	60,2	0,0	0,0	0,0	0

Usando los valores de Actividad Acumulada Total (A) de las Tablas 9 y 10, y los valores S proporcionados a partir del Número de Panfleto 11 de MIRD (Tablas 11 y 12, y 13 y 14), se determinaron las estimaciones de la dosis de radiación absorbida para cada uno de los conjugados radiomarcados para los tejidos listados (Tablas 15, 16, 17 y 18). Para la determinación de las estimaciones resumen de dosis de radiación para el conjugado marcado con indio proporcionadas en la Tabla 19, la dosis propia de un órgano dado se sumó a la dosis absorbida producida por la actividad en órganos o tejidos adyacentes. Sin embargo, para calcular los valores de la estimación de la dosis de radiación atribuidos al conjugado marcado con itrio (Tabla 20), algunos de los valores están ausentes para los tejidos listados (por ejemplo, adrenales). Esto se debe a la menor longitud de paso de la partícula β liberada, respecto a la longitud de paso de la partícula γ emitida, proporcionando de esta manera una contribución despreciable de actividad de los tejidos adyacentes, y a la ausencia de datos de biodistribución primaria para estos tejidos.

Tabla 11

S. DOSIS ABSORBIDA POR UNIDAD DE ACTIVIDAD ACUMULADA, (RAD/UCI-H)

VIDA MEDIA DEL INDIO-[111]67,44 HORAS

Órganos Diana	ÓRGANOS FUENTE										
	Adrenales	Contenidos de la Vejiga	Tracto Intestinal					Riñones	Hígado	Pulmones	Otro Tejido (Músculo)
			Contenidos del Estómago	Contenidos Si	Contenidos Uli	Contenidos Lli	Contenidos				
ADRENALES	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	
PARED DE LA VEJIGA	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	
HUESO	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 (PARED DEL ESTOM)	8,8E-06	8,5E-07	3,4E-04	1,1E-05	1,2E-05	5,4E-06	1,0E-05	5,8E-06	5,7E-06	4,3E-06	
GI (SI)	2,5E-06	8,6E-06	7,9E-06	2,1E-04	5,4E-05	3,0E-05	8,6E-06	5,0E-06	6,1E-07	4,8E-06	
GI (PARED DE ULI)	2,8E-06	6,9E-06	1,1E-05	8,3E-05	3,3E-04	1,4E-05	8,6E-06	7,5E-06	7,4E-07	5,0E-06	
GI (PARED DE LLI)	7,1E-07	2,2E-95	3,8E-06	2,4E-05	9,5E-06	4,7E-04	2,5E-06	7,3E-07	3,0E-07	5,2E-06	
RIÑONES	3,7E-05	8,5E-07	1,1E-05	9,2E-06	8,3E-06	2,8E-06	5,2E-04	1,2E-05	2,7E-06	4,4E-06	
HÍGADO	1,5E-05	6,3E-07	5,9E-06	5,6E-06	7,8E-06	8,4E-07	1,2E-05	1,3E-04	7,7E-06	3,4E-06	
PULMONES	7,6E-06	8,2E-08	5,2E-06	7,5E-07	8,3E-07	2,6E-07	2,5E-06	7,8E-06	1,4E-04	4,2E-06	
MÉDULA (ROJA)	9,4E-06	5,3E-06	4,0E-06	1,1E-05	9,1E-06	1,3E-05	9,6E-06	4,1E-06	4,8E-06	5,3E-06	

ÓRGANOS FUENTE

Órganos Diana	Adrenales	Contenidos de la Vejiga	Tracto Intestinal					Riñones	Hígado	Pulmones	Otro Tejido (Músculo)
			Contenidos del Estómago	Contenidos Si	Contenidos Uli	Contenidos Lii	Contenidos				
OTR (MÚSC)	4,8E-06	5,5E-06	4,3E-06	4,8E-06	4,5E-06	5,2E-06	4,4E-06	3,4E-06	4,4E-06	7,5E-06	
OVARIOS	1,8E-06	2,3E-05	1,3E-06	3,3E-05	3,7E-05	6,4E-05	3,6E-06	1,4E-06	3,6E-07	6,3E-06	
PÁNCREAS	2,6E-06	8,6E-07	5,7E-05	6,1E-06	7,1E-06	2,1E-06	2,0E-05	1,2E-05	7,7E-06	5,7E-06	
PIEL	1,8E-06	1,7E-06	1,4E-06	1,4E-06	1,4E-06	1,6E-06	1,8E-06	1,6E-06	1,8E-06	2,5E-06	
BAZO	2,0E-05	7,6E-07	3,1E-05	4,6E-06	4,2E-06	2,4E-06	2,8E-05	2,8E-06	7,1E-06	4,6E-06	
TESTÍCULOS	1,4E-07	1,4E-05	1,8E-07	1,0E-06	9,8E-07	5,9E-06	3,4E-07	2,5E-07	3,9E-08	3,6E-06	
TIROIDES	4,7E-07	1,2E-08	3,5E-07	6,9E-08	7,5E-08	2,7E-08	2,0E-07	6,2E-07	2,6E-06	4,3E-06	
ÚTERO (NOGRVD)	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	
CUERPO TOTAL	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	

REFERENCIA - PANFLETO MIRD NO. 11 PÁGINA 164

Tabla 12

S. DOSIS ABSORBIDA POR UNIDAD DE ACTIVIDAD ACUMULADA, (RAD/UCI-H)

VIDA MEDIA DEL INDIO-[111]67,44 HORAS

Órganos Diana	Ovarios	Páncreas	ÓRGANOS FUENTE							Cuerpo Total
			Esqueleto		Piel	Bazo	Testículos	Tiroides		
			M. Roja	Hueso Cort					Hueso TRA	
ADRENALES	1,1E-06	2,6E-05	7,9E-06	3,9E-06	3,9E-06	2,4E-06	2,0E-05	1,4E-07	4,7E-07	7,0E-06
PARED DE LA VEJIGA	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
HUESO	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 (PARED DEL ESTOM)	2,4E-06	5,9E-05	3,2E-06	1,7E-06	1,1E-06	1,7E-06	3,0E-05	1,5E-07	1,5E-07	7,1E-06
GI (SI)	3,8E-05	5,5E-06	7,9E-06	2,3E-06	2,3E-06	1,5E-06	4,2E-06	1,2E-06	4,2E-08	7,5E-06
GI (PARED DE ULI)	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 (PARED DE LLI)	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
RIÑONES	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
HÍGADO	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
PULMONES	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
MÉDULA (ROJA)	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
OTR (MÚSC)	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

ÓRGANOS FUENTE

Órganos Diana	Ovarios	Páncreas	Esqueleto		Piel	Bazo	Testículos	Tiroides	Cuerpo Total	
			M. Roja	Hueso Cort						Hueso TRA
			OVARIOS	1,0E-02						1,0E-06
PÁNCREAS	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
PIEL	1,4E-06	1,3E-06	2,0E-06	2,3E-06	2,3E-06	3,7E-05	1,5E-06	4,9E-06	2,5E-06	3,7E-06
BAZO	1,6E-06	6,2E-05	2,7E-06	2,0E-06	2,0E-06	1,7E-06	9,1E-04	8,9E-08	3,5E-07	6,8E-06
TESTÍCULOS	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
TIROIDES	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
ÚTERO (NOGRVO)	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
CUERPO TOTAL	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

REFERENCIA - PANFLETO MIRD NO. 11 PÁGINA 165

Tabla 13

S. DOSIS ABSORBIDA POR UNIDAD DE ACTIVIDAD ACUMULADA, (RAD/UCI-H)
 VIDA MEDIA DEL ITRIO-[90] 64 HORAS

Órganos Diana	ÓRGANOS FUENTE									
	Adrenales	Contenidos de la vejiga	Tracto Intestinal				Riñones	Hígado	Pulmones	Otro Tejido (Músculo)
			Contenidos del Estómago	Contenidos Si	Contenidos Uli	Contenidos LLI				
ADRENALES	1,4E-01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PARED DE LA VEJIGA	0,0	5,0E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HUESO	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (PARED DEL ESTOM)	0,0	0,0	4,0E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (SI)	0,0	0,0	2,5E-03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (PARED DE ULI)	0,0	0,0	0,0	4,5-E03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GI (PARED DE LLI)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4E-03	0,0	0,0	0,0	0,0
RIÑONES	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,4E-03	0,0	0,0	0,0
HÍGADO	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1E-03	0,0	0,0	0,0
PULMONES	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0E-03	0,0	0,0
MÉDULA (ROJA)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
OTR TEJ (MUSC)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1E-05	0,0

ÓRGANOS FUENTE

Órganos Diana	Adrenales	Contenidos de la vejiga	Tracto Intestinal					Riñones	Hígado	Pulmones	Otro Tejido (Músculo)
			Contenidos del Estómago	Contenidos Si	Contenidos Uli	Contenidos LLI	Contenidos				
OVARIOS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
PÁNCREAS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
PIEL	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
BAZO	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
TESTÍCULOS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
TIROIDES	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
ÚTERO (NOGRVD)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
CUERPO TOTAL	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	

REFERENCIA - PANFLETO MIRD NO. 11 PÁGINA 144

Tabla 14
S. DOSIS ABSORBIDA POR UNIDAD DE ACTIVIDAD ACUMULADA, (RAD/UCI-H)
VIDA MEDIA DEL ITRIO-[90] 64 HORAS

Órganos Diana	ÓRGANOS FUENTE										Cuerpo Total
	Ovarios	Páncreas	Esqueleto			Piel	Bazo	Testículos	Tiroides	Cuerpo Total	
	M. Roja	Hueso Cort	Hueso TRA								
ADRENALES	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
PARED DE LA VEJIGA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
HUESO	0,0	0,0	1,1E-04	4,0E-04	2,3E-04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
GI (PARED DEL ESTOM)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
GI (SI)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
GI (PARED DE JULI)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
GI (PARED DE LLI)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
RIÑONES	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
HÍGADO	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
PULMONES	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
MÉDULA (ROJA)	0,0	0,0	8,6E-04	3,3E-05	5,7E-04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05
OTR TEJ (MÚSC)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05

ÓRGANOS FUENTE

Órganos Diana	Ovarios	Páncreas	Esqueleto				Piel	Bazo	Testículos	Tiroides	Cuerpo Total
			M. Roja		Hueso Cort	Hueso TRA					
OVARIOS	1,8E-01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05	
PÁNCREAS	0,0	2,0E-02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05	
PIEL	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6E-04	0,0	0,0	0,0	2,8-E05	
BAZO	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1E-02	0,0	0,0	2,8-E05	
TESTÍCULOS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,7E-02	0,0	2,8-E05	
TIROIDES	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,9E-02	2,8-E05	
ÚTERO (NOGRVO)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8-E05	
CUERPO TOTAL	2,8-E05	2,8-E05	2,8-E05	2,8-E05	2,8-E05	2,8-E05	2,8-E05	2,8-E05	2,8-E05	2,8-E05	

REFERENCIA - PANFLETO MIRD NO. 11 PÁGINA 145

Tabla 15

**DOSIS DE RADIACIÓN ABSORBIDA (RAD= A*S)
VIDA MEDIA DEL INDIO-[111] 67,44 HORAS**

Órganos Diana	ÓRGANOS FUENTE										
	Adrenales	Contenidos de la vejiga	Tracto Intestinal					Riñones	Hígado	Pulmones	Otro Tejido
			Contenidos del Estómago	Contenidos SI	Contenidos ULI	Contenidos LLI	Contenidos LLI				
ADRENALES	0,0E+00	3,1E-05	1,0E-03	1,4E-03	1,1E-03	4,9E-04	1,4E-02	1,5E-01	1,3E-02	2,4E-01	
PARED DE LA VEJIGA	0,0E+00	2,4E-02	1,1E-04	2,5E-03	2,6E-03	7,6E-03	3,8E-04	5,2E-03	2,6E-04	2,7E-01	
GI (PARED DEL ESTOM)	0,0E+00	4,6E-05	4,8E-02	3,5E-03	2,2E-02	2,0E-03	4,0E-03	5,8E-02	9,8E-03	2,1E-01	
GI (SI)	0,0E+00	4,7E-04	1,1E-03	6,7E-03	2,2E-02	1,1E-02	3,5E-03	5,0E-02	1,0E-03	2,4E-01	
GI (PARED DE ULI)	0,0E+00	3,8E-04	1,5E-03	2,6E-02	1,3E-01	5,3E-03	3,5E-03	7,5E-02	1,3E-03	2,5E-01	
GI (PARED DE LLI)	0,0E+00	1,2E-03	5,3E-04	7,6E-03	3,8E-03	1,8E-01	1,0E-03	7,3E-03	5,2E-04	2,6E-01	
RIÑONES	0,0E+00	4,6E-05	1,5E-03	2,9E-03	3,4E-03	1,1E-03	2,1E-01	1,2E-01	4,6E-03	2,2E-01	
HÍGADO	0,0E+00	3,4E-05	8,3E-04	1,8E-03	3,2E-03	3,2E-04	4,9E-03	1,3E+00	1,3E-02	1,7E-01	
PULMONES	0,0E+00	4,5E-06	7,3E-04	2,4E-04	3,4E-04	9,8E-05	1,0E-03	7,8E-02	2,4E-01	2,1E-01	
OTR TEJIDOS											
MÚSCULO	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	
ADIPOSO	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	

ÓRGANOS FUENTE

Órganos Diana	Adrenales	Contenidos de la vejiga	Tracto Intestinal				Riñones	Hígado	Pulmones	Otro Tejido
			Contenidos del Estómago	Contenidos SI	Contenidos ULI	Contenidos LLI				
SANGRE	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
CEREBRO	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
CORAZÓN	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
OVARIOS	0,0E+00	1,3E-03	1,8E-04	1,1E-02	1,5E-02	2,4E-02	1,5E-03	1,4E-02	6,2E-04	2,8E-01
PÁNCREAS	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
ESQUELETO										
HUESO CORTICAL	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
HUESO TRABECULAR	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
MÉDULA (ROJA)	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
MÉDULA (AMARILLA)	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
CARTÍLAGO	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
OTROS CONSTIT.	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
PIEL	0,0E+00	9,2E-05	2,0E-04	4,5E-04	5,7E-03	6,1E-04	7,3E-04	1,6E-02	3,1E-03	1,2E-01
BAZO	0,0E+00	4,1E-05	4,4E-03	1,5E-03	1,7E-03	9,1E-04	1,1E-02	2,8E-02	1,2E-02	2,3E-01

ÓRGANOS FUENTE										
Órganos Diana	Adrenales	Contenidos de la vejiga	Tracto Intestinal				Riñones	Hígado	Pulmones	Otro Tejido
			Contenidos del Estómago	Contenidos SI	Contenidos ULI	Contenidos LLI				
TESTÍCULOS	0,0E+00	7,6E-04	2,5E-05	3,2E-04	4,0E-04	2,2E-03	1,4E-04	2,5E-03	6,7E-05	1,8E-01
TIROIDES	0,0E+00	6,5E-07	4,9E-05	2,2E-05	3,0E-05	1,0E-05	8,1E-05	6,2E-03	4,5E-03	2,1E-01
ÚTERO (NOGRVD)	0,0E+00	3,4E-04	8,6E-04	2,3E-03	2,7E-03	2,6E-03	2,7E-03	6,6E-02	1,0E-02	3,7E-01
CUERPO TOTAL	0,0E+00	2,7E-03	3,4E-04	9,2E-03	6,1E-03	8,0E-03	1,3E-03	1,2E-02	4,8E-04	2,8E-01

Tabla 16

DOSIS DE RADIACIÓN ABSORBIDA (RAD= A*S)
 VIDA MEDIA DEL INDIO-[111] 67,44 HORAS

Órganos Diana	ÓRGANOS FUENTE										Cuerpo Total	
	Ovarios	Páncreas	Esqueleto				Piel	Bazo	Testículos	Tiroides		
			M. Roja	Hueso Cort	Hueso TRA							
ADRENALES	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	
PARED DE LA VEJIGA	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 (PARED DEL ESTOM)	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 (SI)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,1E-02	1,6E-02	2,4E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	
GI (PARED DE ULI)	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	
GI (PARED DE LLI)	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	
RIÑONES	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	
HÍGADO	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	
PULMONES	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	
OTR TEJIDOS								0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	
MÚSCULO	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	

	ÓRGANOS FUENTE										Cuerpo Total
	Ovarios	Páncreas	Esqueleto		Piel	Bazo	Testículos	Tiroides			
			M. Roja	Hueso Cort	Hueso TRA						
ADIPOSO	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
SANGRE	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
CEREBRO	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
CORAZÓN	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
OVARIOS	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	0,0E+00
PÁNCREAS	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	0,0E+00
ESQUELETO											
HUESO CORTICAL	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	0,0E+00
HUESO TRABECULAR	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	0,0E+00
MÉDULA (ROJA)	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	0,0E+00
MÉDULA (AMARILLA)	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	0,0E+00
CARTÍLAGO	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	0,0E+00
OTROS CONSTIT.	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	0,0E+00
PIEL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,1E-02	4,0E-01	8,7E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
BAZO	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,9E-02	1,8E-02	5,3E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

	ÓRGANOS FUENTE										Cuerpo Total	
	Ovarios	Páncreas	Esqueleto			Piel	Bazo	Testículos	Tiroides			
			M. Roja	Hueso Cort	Hueso TRA							
Órganos Diana												
TESTÍCULOS	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,8E-02	3,6E-02	1,2E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TIROIDES	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	2,6E-02	2,6E-02	2,0E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
ÚTERO (NOGRVO)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,7E-02	0,0E+00	7,0E-04	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
CUERPO TOTAL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	5,5E-02	4,1E-02	3,8E-03	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Tabla 17

**DOSIS DE RADIACIÓN ABSORBIDA (RAD= A*S)
VIDA MEDIA DEL ITRIO-[90] 64 HORAS**

Órganos Diana	ÓRGANOS FUENTE										
	Adrenales	Contenidos de la Vejiga	Tracto Intestinal			Riñones	Hígado	Pulmones	Otro Tejido		
			Contenidos del Estómago	Contenidos SI	Contenidos ULI	Contenidos LLI					
ADRENALES	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
PARED DE LA VEJIGA	0,0E+00	2,7E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (PARED DEL ESTOM)	0,0E+00	0,0E+00	3,6E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (SI)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	5,0E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (PARED DE ULI)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	1,1E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (PARED DE LLI)	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	0,0E+00	0,0E+00
RIÑONES	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	0,0E+00
HÍGADO	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	0,0E+00	0,0E+00
PULMONES	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	0,0E+00	0,0E+00
OTR TEJIDOS											
MÚSCULO	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	2,7E+00
ADIPOSO	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	2,7E+00
SANGRE	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	2,7E+00

ÓRGANOS FUENTE

Órganos Diana	Adrenales	Contenidos de la Vejiga	Tracto Intestinal				Riñones	Hígado	Pulmones	Otro Tejido
			Contenidos del Estómago	Contenidos SI	Contenidos ULI	Contenidos LLI				
CEREBRO	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	
CORAZÓN	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	
OVARIOS	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	
PÁNCREAS	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	
ESQUELETO										
HUESO CORTICAL	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	
HUESO TRABECULAR	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	
MÉDULA (ROJA)	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	
MÉDULA (AMARILLA)	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	
CARTÍLAGO	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	
OTROS CONSTIT.	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	
PIEL	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	
BAZO	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	
TESTÍCULOS	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	
TIROIDES	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	

Órganos Diana	ÓRGANOS FUENTE										
	Adrenales	Contenidos de la Vejiga	Tracto Intestinal			Riñones	Hígado	Pulmones	Otro Tejido		
			Contenidos del Estómago	Contenidos SI	Contenidos ULI					Contenidos LLI	
ÚTERO (NOGRVD)	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	
CUERPO TOTAL	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	

Tabla 18

DOSIS DE RADIACIÓN ABSORBIDA (RAD= A*S)
 VIDA MEDIA DEL ITRIO-[90] 64,00 HORAS

Órganos Diana	ÓRGANOS FUENTE										Cuerpo Total	
	Ovarios	Páncreas	Esqueleto		Piel	Bazo	Testículos	Tiroides	Cuerpo Total			
			M. Roja	Hueso Cort	Hueso TRA							
ADRENALES	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PARED DE LA VEJIGA	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (PARED DEL ESTOM)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (SI)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (PARED DE ULI)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
GI (PARED DE LLI)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
RIÑONES	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
HÍGADO	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PULMONES	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
OTR TEJIDOS	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
MÚSCULO	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
ADIPOSO	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

ÓRGANOS FUENTE

	Ovarios	Páncreas	Esqueleto				Piel	Bazo	Testículos	Tiroides	Cuerpo Total
			M. Roja		Hueso Cort	Hueso TRA					
Órganos Diana											
SANGRE	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
CEREBRO	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
CORAZÓN	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
OVARIOS	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
PÁNCREAS	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
ESQUELETO											
HUESO CORTICAL	0,0E+00	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
HUESO TRABECULAR	0,0E+00	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
MÉDULA (ROJA)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	7,8E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
MÉDULA (AMARILLA)	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	7,8E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
CARTÍLAGO	0,0E+00	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
OTROS CONSTIT.	0,0E+00	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
PIEL	0,0E+00	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
BAZO	0,0E+00	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
TESTÍCULOS	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

ÓRGANOS FUENTE										
Órganos Diana	Ovarios	Páncreas	Esqueleto			Piel	Bazo	Testículos	Tiroides	Cuerpo Total
			M. Roja	Hueso Cort	Hueso TRA					
TIROIDES	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
ÚTERO (NOGRVD)	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
CUERPO TOTAL	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

Tabla 19

Estimaciones de Dosimetría de Radiación que Resultan de la Administración de 2B8-MX Marcado con Indio-[111] Distribuido Uniformemente en Hombre Estándar (70 kg) y Basado en Datos de Distribución en Animales en 72 Horas Después de la Inyección

CANTIDAD DE ACTIVIDAD=		1.000 MICROCURIOS/DOSIS DE PACIENTE	
	RADS		RADS
ADRENALES	0,493	OVARIOS	0,387
PARED DE LA VEJIGA	0,348	PÁNCREAS	0,362
PARED DEL ESTÓMAGO	0,412	ESQUELETO	
INTESTINO DELGADO	0,434	HUESO CORTICAL	0,474
PARED DEL INTEST. UL	0,533	HUESO TRABECULAR	0,474
PARED DEL INTEST. LL	0,505	MÉDULA (ROJA)	0,602
RIÑONES	0,625	MÉDULA (AMARILLA)	0,602
HÍGADO	1,533	CARTÍLAGO	0,474
PULMONES	0,582	OTROS CONSTIIT.	0,474
OTROS TEJIDOS		PIEL	0,564
MÚSCULO		BAZO	0,854
ADIPOSO		TESTÍCULOS	0,239
SANGRE		TIROIDES	0,276
CEREBRO		ÚTERO (NOGRVD)	0,473
CORAZÓN		CUERPO TOTAL	0,417

5

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

Cálculos Realizados Usando un Molde de Hoja de Cálculo en Symphony (Lotus Development Corporation) y Creado por Phillip L. Hagan, MS

10 Nuclear Medicine Service

VA Hospital

San Diego, CA 92161

Tabla 20

Estimaciones de Dosimetría de Radiación que Resultan de la Administración de 2B8-MX Marcado con Itrio-[90] Distribuido Uniformemente en Hombre Estándar (70 kg) y Basado en Datos de Distribución en Animales en 72 Horas Después de la Inyección

CANTIDAD DE ACTIVIDAD=		1.000 MICROCURIOS/DOSIS DE PACIENTE	
	RADS		RADS
ADRENALES	0,000	OVARIOS	0,000
PARED DE LA VEJIGA	0,271	PÁNCREAS	0,000
PARED DEL ESTÓMAGO	0,356	ESQUELETO	
INTESTINO DELGADO	0,504	HUESO CORTICAL	3,138
PARED DEL INTEST. UL	1,150	HUESO TRABECULAR	3,138
PARED DEL INTEST. LL	1,772	MÉDULA (ROJA)	7,776
RIÑONES	8,366	MÉDULA (AMARILLA)	7,776
HÍGADO	8,575	CARTÍLAGO	3,138
PULMONES	2,079	OTROS CONSTIIT.	3,138
OTROS TEJIDOS		PIEL	10,269
MÚSCULO	2,716	BAZO	8,965
ADIPOSO	2,716	TESTÍCULOS	0,000
SANGRE	2,716	TIROIDES	0,000
CEREBRO	2,716	ÚTERO (NOGRVD)	0,304
CORAZÓN	2,176	CUERPO TOTAL	1,854

5

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

Cálculos Realizados Usando un Molde de Hoja de Cálculo en Symphony (Lotus Development Corporation) y Creado por Phillip L. Hagan, MS

10 Nuclear Medicine Service

VA Hospital

San Diego, CA 92161

1. II. Resultados

A. Estudios *In Vitro* con 2B8 y 2B8-MX-DTPA

1. Producción y Caracterización del Anticuerpo anti-CD20 2B8

5 Un total de nueve fusiones resultaron en tres hibridomas que producían anticuerpos que compitieron eficazmente con el anticuerpo radiomarcado de Coulter B1. En cada caso, el hibridoma se expandió en una placa de 24 pocillos. Los primeros dos anticuerpos aislados de las fusiones 3 y 4, se isotiparon y ambos se identificaron como IgM. Se determinó que el tercer anticuerpo, producido en la fusión 5 y designado 2B8, era un isotipo IgG1 kappa y se seleccionó para estudios de continuación. El clon 2B8.HII se expandió y se puso en almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido. El clon 2B8.HII se subclonó para producir el clon 2B8.HII.G3 y de nuevo para producir el clon 2B8.HII.G3.G9. Este clon se expandió para estudio adicional y el anticuerpo se purificó por cromatografía de afinidad con proteína A.

10 Los ensayos de competición usando 2B8, B1 y Leu 16 no marcados y Coulter B1 radiomarcado demostraron que 2B8 era capaz de inhibir la unión de B1 a CD20 más eficazmente que concentraciones iguales bien de B1 o Leu 16 (Fig. 1). Se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados) en un estudio de competición usando 2B8 conjugado con FITC, B1 nativo y los anticuerpos irrelevantes UPC-10 y S-003 (isotipos IgG 2a y 1, respectivamente).

15 La unión directa al antígeno celular CD20 por los anticuerpos 2B8 y B1 se comparó por análisis FACS usando células SB positivas para CD20 y células HSB negativas para CD20. Los resultados mostrados en la Figura 2 indican que para cantidades comparables de anticuerpo, se unió más 2B8 que B1 a las células SB. No se observó una unión significativa a las células SB con los anticuerpos irrelevantes. Sólo se observó fluorescencia de fondo con todos los reactivos usados con células HSB. Estos resultados confirman la especificidad de la interacción de 2B8 con el antígeno CD20 y sugieren que 2B8 puede tener una mayor afinidad para el antígeno de la superficie celular que B1.

20 Para determinar la afinidad aparente de 2B8, el anticuerpo purificado se radiomarcó con ¹²⁵I y se incubaron concentraciones crecientes del anticuerpo marcado con células SB positivas para el antígeno; la radiactividad asociada con las células se determinó después de un periodo de incubación de 1 hora (Fig. 3). Los resultados sugieren que el anticuerpo 2B8 se une al antígeno CD20 con una constante de afinidad aparente de $4,3 \times 10^{-9}$ M.

25 Los estudios de citometría de flujo con linfocitos de sangre periférica humanos normales indicaron que 2B8 era específico para las células B y no reaccionaba con otros tipos de linfocitos (por ejemplo, células T, monocitos, macrófagos). Se comparó 2B8 marcado con FITC con B1-FITC y Leu 16-FITC usando la misma población de linfocitos humanos. Los resultados mostrados en la Tabla 21 indican que 2B8 reaccionaba con aproximadamente el 14 por ciento de los linfocitos de sangre periférica frente aproximadamente el 12 por ciento para Leu 16 y 11 por ciento para B1. La población de linfocitos basada en otro marcador de linfocitos B (CD-19) fue entre 11 y 14 por ciento. Finalmente, cuando se incubaron linfocitos de sangre periférica humana con 2B8 y bien B1 o Leu 16 y se contratiñeron con el marcador CD19 (Becton/Dickinson) la población con doble tinción de linfocitos B fue 9 por ciento con 2B8, y 10 por ciento bien con B1 o Leu 16. Estos resultados confirman la similitud de estos reactivos.

Tabla 21

Comparación de la Unión de 2B8 a Linfocitos de Sangre Periférica Humana con Otros Reactivos Específicos de Linfocitos B y T

Marcador de Anticuerpo		
5	A. <u>Tinción Única:</u>	Porcentaje de Linfocitos Seleccionados CD45
	Ninguna (autofluorescencia)	0
	B1-FITC (Coulter Immunology, (IgG2a, k)	11
	Leu 16-FITC (Becton Dickinson, IgG1, k)	12
	2B8-FITC (EDEC, IgG1, k)	14
10	B72.3-FITC (IgG1, k control irrelevante)	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
15	B. <u>Tinción doble:</u>	
	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
20	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

La inmunoprecipitación del antígeno celular CD20 radiomarcado bien por 2B8 o B1 resultó en la precipitación de especies de proteína doblete indistinguibles con pesos moleculares de aproximadamente 33 y 35 KD (datos no mostrados).

2. Producción y Caracterización de 2B8-MX-DTPA

- 5 El conjugado 2B8-MX-DTPA se produjo haciendo reaccionar el anticuerpo con un exceso molar 4:1 de ácido isotiocianatobencil-3-metildietilén-triaminopentaacético (4). Típicamente, se introdujeron 1-2 moles de quelato MX-DTPA por mol de anticuerpo 2B8. Como se muestra por los resultados presentados en la Fig. 4, el conjugado 2B8-MX-DTPA no presentó pérdida aparente en la inmunoreactividad, frente a 2B8 nativo, ya que tanto el anticuerpo 2B8 nativo como conjugado presentaron perfiles de inhibición de B1 virtualmente idénticos; los valores CI50 para 2B8 y 2B8-MX-DTPA fueron aproximadamente 3 y 4 µg/mL, respectivamente. Estos resultados se obtuvieron usando anticuerpo B1 marcado con ¹²⁵I en un radioinmunoensayo de célula completa realizado usando células SB. Se obtuvieron resultados similares usando 2B8 ó 2B8-MX-DTPA como inhibidores de la unión de 2B8 marcado con ¹²⁵I a las células SB; tanto 2B8 como su conjugado con MX-DTPA inhibieron la unión de ¹²⁵I-2B8 a las células SB a concentraciones de aproximadamente 3-4 µg/mL (datos no mostrados).
- 10
- 15 Para evaluar la estabilidad *in vitro* del anticuerpo 2B8 nativo y el conjugado 2B8-MX-DTPA, se incubaron muestras en disolución salina normal o disolución salina que contenía 10 mM glicina-HCl, pH 6,8, a 4^o y 30^oC durante 12 semanas y se ensayaron alicuotas semanalmente usando los ensayos siguientes: inmunoreactividad por inmunoensayo enzimático en células completas, SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, y electroforesis en gel con enfoque isoeléctrico. Aunque los ensayos de inmunoreactividad no detectaron pérdida de reconocimiento de antígeno por las muestras de anticuerpo incubadas a cualquiera de las dos temperaturas (Figura 5), el intervalo de enfoque isoeléctrico para el anticuerpo (pH 7,30-8,40 en la semana cero), que era estable a 4^oC, presentó una disminución de 0,2 unidades de pH a 30^oC después de la semana seis (Tabla 22). Este resultado puede ser equívoco, sin embargo, ya que está en el límite del error experimental para el ensayo:
- 20

Tabla 22

RESUMEN pi 2B8/2B8-MX-DTPA

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

Se formularon muestras de 2B8 nativo y 2B8-MX-DTPA en diferentes tampones y se incubaron bien a 40 ó 30°C durante 12 semanas. Durante este periodo, se realizaron varios ensayos incluyendo determinaciones del punto isoelectrico. Los valores mostrados anteriormente muestran el intervalo de punto isoelectrico para el anticuerpo nativo y conjugado, incubado a cada temperatura, en cada una de las formulaciones, y para cada una de las doce semanas durante el estudio de estabilidad. Los encabezamientos representan: 2B8 4 SAL, 2B8 incubado a 4°C en disolución salina; 2B8 30 SAL, 2B8 incubado a 30°C en disolución salina; 2B8 4 GLY, 2B8 incubado a 4°C en disolución salina normal que contiene 10 mM glicina; 2B8 30 GLY, 2B8 incubado a 30°C en disolución salina normal que contiene 10 mM glicina; 2B8-MX 4 SAL; 2B8-MX-DTPA (conjugado) incubado a 4°C en disolución salina; 2B8-MX 30 SAL, conjugado incubado a 30°C en disolución salina; 2B8-MX 4 GLY, conjugado incubado a 4°C en disolución salina normal que contiene 10 mM glicina; y, 2B8-MX 30 GLY, conjugado incubado a 30°C en disolución salina normal que contiene 10 mM glicina.

Finalmente, usando SDS-PAGE no reductora, las muestras de anticuerpo de 30°C presentaron agregados de alto peso molecular después de la semana 1 (Tabla 23). Los análisis densitométricos de los geles indicaron que los agregados representaban entre 8 y 17% de las muestras (Tabla 23). Sin embargo, cuando estas muestras se analizaron por SDS-PAGE reductora, no se encontró evidencia de especies de alto peso molecular, sugiriendo la formación de agregados de anticuerpo covalentes a 30°C. De nuevo, no se observó pérdida de inmunoreactividad.

5

Tabla 23

Estabilidad *In Vitro* de 2B8A. Escaneos Densitométricos de Geles SDS no Reductora

Muestra	Porcentaje		
	Alto MW	Monómero	Bajo MW
Referencia	0	100,00	0
12 sem/4°C/disolución salina	0	95,42	4,58
12 sem/4°C/glicina	0	100,00	0
12 sem/30°C/disolución salina	7,63	83,34	9,03
12 sem/30°C/glicina	16,70	72,11	11,18

5 B. Escaneos Densitométricos de Geles SDS Reductora

Muestra	Porcentaje		
	Alto MW	Monómero	Bajo MW
Referencia	0	100,00	0
12 sem/30°C/disolución salina	0	100,00	0
12 sem/30°C/glicina	0	10,00	0

Durante el curso de este estudio de estabilidad, también se ensayaron muestras de 2B8-MX-DTPA, incubadas tanto a 4^o como a 30^oC, para incorporación de radiometal usando ⁹⁰Y. Las muestras ensayadas en las semanas 4, 8 y 12 incorporaron >90% del ⁹⁰Y, independientemente de la temperatura de incubación.

5 Finalmente, en un estudio separado, se radiomarcaron alicuotas de 2B8-MX-DTPA, incubadas a 4^o y 30^oC durante 10 semanas, con ¹¹¹In y su biodistribución tisular se evaluó en ratones BALB/c. El conjugado de ambas temperaturas de incubación produjo biodistribuciones similares (datos no mostrados). Además, los resultados obtenidos fueron similares a los resultados de biodistribución obtenidos en ratones BALB/c usando conjugado marcado con ¹¹¹I almacenado a 4^oC (véase más adelante).

10 Se encontró que los protocolos de radiomarcaje tanto para ¹¹¹In como ⁹⁰Y eran reproducibles. Típicamente, se obtuvo una radioincorporación de >95% para ¹¹¹In y >90% para ⁹⁰Y. Las actividades específicas para los conjugados marcados con ¹¹¹I y ⁹⁰Y estuvieron rutinariamente en el intervalo de 2-3 y 10-15 mCi/mg de anticuerpo, respectivamente. En el desarrollo inicial de los protocolos de radiomarcaje con ¹¹¹I y ⁹⁰Y, se eliminaron los radioisótopos que no formaban complejo del 2B8-MX-DTPA radiomarcado usando cromatografía de permeación en gel HPLC. En experimentos
15 posteriores, la purificación por HPLC del conjugado marcado con indio se eliminó debido a las altas radioincorporaciones obtenidas (>95%) con este isótopo.

La inmunoreactividad de las preparaciones marcadas con ¹¹¹In y ⁹⁰Y de 2B8-MX-DTPA se analizaron por el método de Lindmo (3). Se encontró que el 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In era 100% inmunoreactivo (Fig. 6) y se determinó que el conjugado marcado con ⁹⁰Y era 60% inmunoreactivo (datos no mostrados).

3. Caracterización de 2B8-MX-DTPA Marcado con ¹¹¹In y ⁹⁰Y

20 Los experimentos preliminares con el conjugado marcado con ⁹⁰Y demostraron que ocurría una degradación significativa y pérdida de inmunoreactividad del anticuerpo a actividades específicas >10 mCi/mg de anticuerpo. Por lo tanto, se desarrolló una formulación para minimizar los efectos de la radiolisis. Aunque se evaluaron varios secuestradores de radicales libres de bajo peso molecular y se encontró que eran eficaces, altas concentraciones de albúmina de suero humano (HSA) fueron las más eficaces para preservar la integridad e inmunoreactividad del anticuerpo (Figuras 7-9).

25 El anticuerpo marcado con ⁹⁰Y se formuló en 1X PBS, pH 7,4 que contenía 75 mg/mL HSA; también se añadió ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) a una concentración final de 1 mM para asegurar que se quelaba todo el ⁹⁰Y que pudiera liberarse del anticuerpo. La degradación de 2B8-MX-DTPA, radiomarcado hasta una actividad específica de 14,6 mCi/mg se evaluó a las 0 y 48 horas usando SDS-PAGE y autorradiografía. Las Figuras 8 y 9 muestran que el anticuerpo radiomarcado no presentaba degradación significativa durante un periodo de 48 h cuando se incubó a 4^oC. El
30 análisis usando cromatografía en capa fina instantánea mostró que la pérdida de ⁹⁰Y era menor de 2% durante la incubación de 48 h (Tabla 24). La inmunoreactividad también fue relativamente constante a 60% (Tabla 24).

Tabla 24

Estabilidad de ⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA Formulado Clínicamente

Tiempo (Horas a 4 ^o C)	Porcentaje de Radiactividad Asociada al Conjugado	Porcentaje de Inmunoreactividad
0	97,2	62
24	96,2	60
48	96,2	60

5 El conjugado radiomarcado (actividad específica de 14,6 mCi/mg) se formuló en PBS, pH 7,4, que contenía 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DTPA y se incubaron alicuotas a 4^oC. La estabilidad del conjugado se analizó a los tiempos mostrados por SDS-PAGE y autorradiografía, cromatografía en capa fina instantánea y por ensayo de unión de células completas. Los resultados muestran que aproximadamente 96% del radiometal permaneció asociado con el conjugado después de 48 horas a 4^oC, y que la inmunoreactividad del anticuerpo permaneció constante a aproximadamente 60%.

10 También se realizaron estudios de formulación con el conjugado marcado con ¹¹¹In; la actividad específica fue 2,2 mCi/mg. El anticuerpo radiomarcado se evaluó en 1X PBS, pH 7,4 que contenía 50 mg/mL HSA. La Figura 10 muestra fotografías de los autorradiogramas para las muestras incubadas en el tiempo cero y 48 h; los análisis densitométricos de los autorradiogramas indican que no había degradación del anticuerpo radiomarcado durante el curso del estudio (Figuras 11, 12). El análisis por cromatografía en capa fina instantánea de las muestras demostró ausencia de pérdida de ¹¹¹In (Tabla 25); además, la inmunoreactividad se mantuvo a aproximadamente 100% (Tabla 25).

15

Tabla 25

Estabilidad de ¹¹¹In-2B8-MX-DTPA Formulado Clínicamente

Tiempo (Horas a 4 ^o C)	Porcentaje de Radiactividad Asociada al Conjugado	Porcentaje de Inmunoreactividad
0	94,0	105
24	96,5	104
48	96,0	100

20 El conjugado radiomarcado (actividad específica de 2,2 mCi/mg) se formuló en PBS, pH 7,4, que contenía 50 mg/mL de albúmina de suero humano y se incubaron alicuotas a 4^oC. La estabilidad del conjugado se analizó por SDS-PAGE y autorradiografía, por cromatografía en capa fina instantánea y por ensayo de unión de células completas. Los resultados muestran que aproximadamente 96% del radiomarcador se retuvo en el conjugado después de 48 horas a 4^oC, y que la inmunoreactividad del anticuerpo permaneció constante a aproximadamente 100%.

5 Cuando una preparación formulada clínicamente de 2B8-MX-DTPA, radiomarcado con ^{90}Y hasta una actividad específica de 14,6 mCi/mg, se incubó durante 96 horas a 37°C en suero humano y se analizó por SDS-PAGE no reductora y autorradiografía, se perdió menos del 4% del radioisótopo durante el curso del periodo de incubación. Los escaneos densitométricos de los autorradiogramas a tiempo cero y 96 h no indicaron degradación significativa del conjugado radiomarcado (Figuras 13-15). Estos resultados se corroboraron por análisis de cromatografía en capa fina analítica de las muestras de tiempo cero y 96 horas (Tabla 26). Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que el conjugado marcado con itrio es estable en las condiciones usadas en este estudio. Se obtuvieron resultados similares con el conjugado 2B8-MX-DTPA marcado con ^{111}In (Figuras 16-18).

Tabla 26

10 **Análisis por Cromatografía en Capa Fina Analítica del Conjugado ^{90}Y -2B8-MX-DTPA**
Incubado en Suero Humano Durante 96 Horas a 37°C

Tiempo (Horas a 37°C)	Porcentaje de Radiactividad Asociada al Conjugado
0	95,1
24	95,2
48	93,2
72	92,0
96	91,4

15 Se analizaron muestras de suero humano que contenían ^{90}Y -2B8-MX-DTPA (actividad específica de 14,6 mCi/mg) en los tiempos mostrados depositando 1 μl de una dilución 1:20 de muestras en tiras de cromatografía en capa fina instantánea; las muestras se analizaron en triplicado. Las tiras de cromatografía se desarrollaron por cromatografía ascendente en 10% acetato de amonio en metanol:agua (1:1, v/v), se secaron y se cortaron a la mitad transversalmente. Se determinó la radiactividad asociada con la mitad interior y superior de cada tira y se calculó el porcentaje de radiactividad asociada al conjugado. (El radiometal libre migra con el frente de disolvente mientras la radiactividad asociada a proteína permanece en el origen). Se muestran las medias de cada determinación de radiactividad asociada al conjugado.

20 **B. Estudios en animales.**

1. Estudios de Farmacología/Toxicología de Alta Dosis con 2B8 y 2B8-MX-DTPA

25 En un estudio GLP realizado en White Sands Research Center (Número de Estudio 920111), se proporcionó a monos cinomolgus inyecciones intravenosas de varias dosis de 2B8. Se tomaron muestras de sangre antes de cada nueva inyección y la sangre se procesó para evaluación por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos (Tabla 27).

Tabla 27

Poblaciones de Células B de Primate Determinadas por Citometría de Flujo, Después de Infusión del Anticuerpo Monoclonal Murino Anti-CD20 2B8

Animal#	Dosis	Día	Células B ^{a, b}	% de Depleción
Grupo I				
452	disolución salina	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	disolución salina	0
1	11,6			6
7	11,2			10
13	8,4			32
38	7,7			38
52	13,1			0
Grupo 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
		13	6,6	62
		38	5,1	71
		52	5,2	68

ES 2 526 723 T3

Animal#	Dosis	Día	Células B ^{a, b}	% de Depleción
Grupo 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
Grupo 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
Grupo 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
		52	13,3	22
716	10 mg/kg	0	34,7	0
		1	18,6	46
		7	8,1	77
		76		

Animal#	Dosis	Día	Células B ^{a, b}	% de Depleción
716	10 mg/kg	13	3,5	90
		38	6,9	80
		52	9,2	61

^aPorcentaje de linfocitos totales.

^bPoblación de células B cuantificada por reactivos marcadores de doble tinción anti-IGG de ratón-RPE + anti IG humana-FITC (anti-IgG de ratón RPE detecta CD20 bloqueado por 2B8 y anti IgG humana FITC detecta Ig en la superficie de células B de mono)

A los animales en los grupos I a IV se les inyectó cada 48 horas durante un total de siete inyecciones; a los animales en el grupo V se les inyectó una vez en el día 0. Los animales en los Grupos III y IV se sacrificaron en el día 14.

No se indicaron efectos farmacotóxicos significativos relacionados con la administración del anticuerpo anti-CD20 2B8 en ningún parámetro clínico evaluado durante o después del estudio. De manera similar, no se indicaron anomalías durante el análisis de las diferentes muestras histopatológicas obtenidas de los animales en los grupos III y IV.

La duración del estudio fue 14 días y los animales se evaluaron durante el estudio en las categorías siguientes: observaciones clínicas, pesos corporales, temperatura corporal, ingesta de alimento y agua, eliminación fecal, químicas séricas, hematología, urianálisis, y exámenes físicos. Además, los animales en cada grupo se sangraron en los días 0, 1, 7, y 13 y la sangre se analizó para niveles séricos de anticuerpo (2B8) y para niveles de células T y B. En el día 13, los animales en los Grupos III y IV se sacrificaron y se examinaron tejidos seleccionados por microscopía óptica después de la preparación de la muestra. Los tejidos evaluados fueron: corazón, bazo, hígado, riñón, pulmón, corteza cerebral, médula espinal, ganglio linfático, estómago, íleo, colon, músculo esquelético, testículo/ovario, páncreas, y médula ósea.

Cuando la sangre de los animales tratados se analizó para niveles de células T y B circulantes, los animales en los grupos II a V presentaron >50% pérdida de células B circulantes hasta el día 13 (Fig. 19); la administración del anticuerpo no tuvo efecto en los niveles de células T (datos no mostrados). Todos los grupos que recibieron 2B8 mostraron saturación de células B y exceso de anticuerpo en el plasma (no mostrado). Los animales en el grupo V, que recibieron una única dosis de 10,0 mg/kg de 2B8 también presentaron reducción en los niveles de células B circulantes equivalente a la observada en los animales en los demás grupos.

Los animales en los grupos I, II y V se examinaron hasta el día 52 (Fig. 20). Los niveles de células B volvieron a >70% del normal sobre el día 38, excepto un animal en el Grupo II (PRO804) y un animal en el Grupo V (PRO716). Los niveles de células B circulantes en estos animales permanecieron a aproximadamente 40% de los niveles normales después de 52 días.

Además de este estudio, se evaluaron los efectos farmacotóxicos de ⁸⁹Y-2B8-MX-DTPA en monos cinomolgus en un estudio GLP realizado en White Sands Research Center (No. de Estudio 920611). Se cargó conjugado de grado clínico con ⁸⁹Y no radiactivo. El conjugado que portaba itrio se formuló en PBS pH 6,8, que contenía 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DTPA (formulación clínica) y se administró intravenosamente como se describe en la Sección de Métodos.

Como se muestra por los resultados en la Figura 21, el 2B8-MX-DTPA marcado con ⁸⁹Y tuvo poco, si es que algún, efecto en las células B circulantes en estos animales, independientemente de la dosis administrada. Además, aparte de una depleción general de linfocitos (20-43%), no se encontraron anomalías significativas en ningún parámetro clínico evaluado, incluyendo química sérica, urianálisis, pesos y temperaturas corporales.

2. Estudios Farmacocinéticos con 2B8 y 2B8-MX-DTPA

Como se ha descrito anteriormente, los animales en el grupo V del estudio GLP recibieron una única dosis de 10,0 mg/kg de 2B8. El análisis por regresión lineal de los datos sugiere que el anticuerpo nativo se aclaró de la circulación de estos monos con un valor $\beta t_{1/2}$ de aproximadamente 4,5 días. En un estudio similar usando ratones BALB/c, se determinó por análisis de regresión lineal (no mostrado) que los valores $\beta t_{1/2}$ para 2B8 nativo y conjugado eran 8,75 días (Fig. 22). Estos resultados sugieren que la conjugación de 2B8 no tuvo efecto en su aclaramiento de ratones BALB/c.

3. Estudios de Biodistribución y Localización Tumoral con 2B8-MX-DTPA Radiomarcado

Tomando como base el experimento de biodistribución preliminar descrito anteriormente (Sección 2d), 2B8 conjugado se radiomarcó con ^{111}In hasta una actividad específica de 2,3 mCi/mg y se inyectaron aproximadamente 1,1 μCi en cada uno de veinte ratones BALB/c para determinar la biodistribución del material radiomarcado. Posteriormente, se sacrificaron grupos de cinco ratones cada uno a 1, 24 48 y 72 horas y sus órganos y una parte de la piel, músculo y hueso se retiraron y procesaron para análisis. Además, se recogieron la orina y las heces y se analizaron para los puntos de tiempo de 24-72 horas. El nivel de radiactividad en la sangre cayó de 40,3% de la dosis inyectada por gramo a 1 hora hasta 18,9% a las 72 horas (Tablas 1-4; Fig. 23). Los valores para el corazón, riñón, músculo y bazo permanecieron en el intervalo de 0,7-9,8% a lo largo del experimento. Los niveles de radiactividad encontrados en los pulmones disminuyeron de 14,2% a 1 hora hasta 7,6% a las 72 horas; de manera similar los valores respectivos de dosis inyectada por gramo en el hígado fueron 10,3% y 9,9%. Estos datos se usaron para determinar estimaciones de la dosis de radiación absorbida de ^{111}In -2B8-MX-DTPA (Tabla 19).

La biodistribución del conjugado marcado con ^{90}Y , que tiene una actividad específica de 12,2 mCi/mg de anticuerpo, se evaluó en ratones BALB/c. Se obtuvieron radioincorporaciones de >90% y el anticuerpo radiomarcado se purificó por HPLC. La deposición de radiactividad en los tejidos se evaluó en los órganos principales, y la piel, músculo, hueso, y orina y heces durante 72 horas y se expresó como porcentaje de dosis inyectada/g de tejido. Los resultados mostrados en las Tablas 5-8 y Figura 24 demuestran que mientras los niveles de radiactividad asociada con la sangre cayeron de aproximadamente 39,2% dosis inyectada por gramo a 1 hora hasta aproximadamente 15,4% después de 72 horas; los niveles de radiactividad asociada con cola, corazón, riñón músculo y bazo permanecieron prácticamente constantes a 10,2% o menos a lo largo del curso del experimento. De forma importante, la radiactividad asociada con el hueso varió de 4,4% de la dosis inyectada por gramo de hueso a 1 hora a 3,2% a las 72 horas. Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que poco itrio libre estaba asociado con el conjugado y que poco radiometal libre se liberaba durante el curso del estudio. Estos datos se usaron para determinar las estimaciones de dosis de radiación absorbida para ^{90}Y -2B8-MX-DTPA (Tabla 20).

Para los estudios de localización tumoral, se preparó 2B8-MX-DTPA y se radiomarcó con ^{111}In hasta una actividad específica de 2,7 mCi/mg. Posteriormente, se inyectaron cien microlitros de conjugado marcado (aproximadamente 24 μCi) en cada uno de 12 ratones atómicos que portaban tumores de células B Ramos. Los tumores variaron en peso de 0,1 a 1,0 gramos. En los puntos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas después de la inyección, se tomaron 50 μL de sangre por punción retro-orbital, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se retiraron la cola, corazón, pulmones, hígado, riñón, bazo, músculo, fémur y tumor. Después del procesamiento y pesado de los tejidos, se determinó la radiactividad asociada con cada muestra de tejido usando un contador gamma y los valores se expresaron como porcentaje de dosis inyectada por gramo.

Los resultados (Fig. 25) demuestran que las concentraciones tumorales del ^{111}In -2B8-MX-DTPA incrementaron de forma constante a lo largo del curso del experimento. El trece por ciento de la dosis inyectada se acumuló en el tumor después de 72 horas. Los niveles sanguíneos, por el contrario, cayeron durante el experimento de más del 30% en el tiempo cero hasta 13% a las 72 horas. Todos los demás tejidos (excepto músculo) contenían entre 1,3 y 6,0% de la dosis inyectada por gramo de tejido al final del experimento; el tejido muscular contenía aproximadamente 13% de la dosis inyectada por gramo.

C. Dosimetría

Los datos de dosimetría resumidos derivados de los estudios de biodistribución en ratones BALB/c normales y presentados en las Tablas 19 y 20, para los conjugados marcados con indio e itrio, respectivamente, concuerdan con los datos presentados en la bibliografía cuando se compara por milicurio de dosis inyectada (5) y sugieren que tanto los

conjugados marcados con itrio como con indio de 2B8 pueden evaluarse de manera segura para eficacia clínica en pacientes con linfoma.

D. Toxicología

1. 2B8: Ensayo de Seguridad General con Dosis Única.

5 Se administró a ratones y cobayas una única dosis intraperitoneal de 2B8 (0,5 mL ó 5,0 mL, respectivamente) y se observaron durante siete días. No se detectaron signos manifiestos de toxicidad.

2. 2B8 y 2B8-MX-DTPA: Estudios de Inmunohistología con Tejidos Humanos.

10 La reactividad tisular del anticuerpo monoclonal murino 2B8 se evaluó usando un panel de 32 tejidos humanos diferentes fijados con acetona. El anticuerpo 2B8 reacciona con el antígeno anti-CD20 que tuvo un patrón muy restringido de distribución tisular, observándose sólo en un subconjunto de células en los tejidos linfoides incluyendo aquellos de origen hematopoyético.

15 En el ganglio linfático, se observó inmunoreactividad en una población de linfocitos B corticales maduros así como células que proliferaban en los centros germinales. También se observó reactividad positiva en la sangre periférica, áreas de células B de las amígdalas, pulpa blanca del bazo, y con 40-70% de los linfocitos medulares encontrados en el timo. También se vio reactividad positiva en los folículos de la lámina propia (Parches de Peyer) de los intestinos gruesos. Finalmente, los agregados de células linfoides o células linfoides dispersas en el estroma de varios órganos, incluyendo la vejiga, mama, cuello uterino, esófago, pulmón, parótida, próstata, intestino delgado y estómago, también fueron positivas con el anticuerpo 2B8.

20 Se encontró que todas las células epiteliales simples, así como epitelio estratificado y epitelio escamoso de diferentes órganos, no eran reactivas. De manera similar, no se vio reactividad con células neuroectodérmicas, incluyendo aquellas en el cerebro, médula espinal y nervios periféricos. También se encontró que los elementos mesenquimales, tales como células de músculo esquelético y liso, fibroblastos, células endoteliales y células inflamatorias polimorfonucleares eran negativos.

25 La reactividad tisular del conjugado 2B8-MX-DTPA se evaluó usando un panel de dieciséis tejidos humanos que se habían fijado con acetona. Como se ha demostrado previamente con el anticuerpo nativo, el conjugado 2B8-MX-DTPA reconoció el antígeno CD20 que presentó un patrón altamente restringido de distribución, encontrándose sólo en un subconjunto de células de origen linfoide. En el ganglio linfático, se observó inmunoreactividad en la población de células B. Se vio reactividad fuerte en la pulpa blanca del bazo y en los linfocitos medulares del timo. También se observó inmunoreactividad en linfocitos dispersos en la vejiga, corazón, intestinos gruesos, hígado, pulmón y útero, y se atribuyó a la presencia de células inflamatorias presentes en estos tejidos. Como se describe con el anticuerpo nativo (anteriormente), no se observó reactividad con células neuroectodérmicas ni con elementos mesenquimales.

III. Discusión

35 El anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 2B8, producido por un clon con la misma designación, presenta una afinidad para el antígeno CD20 de células B que puede ser mayor que la observada para el anticuerpo B1, como se determina por competición con anticuerpos de especificidad conocida para el antígeno CD20, y por análisis Scatchard. Además, los datos de inmunoprecipitación sugieren que el antígeno precipitado por 2B8 parece ser el mismo antígeno que el precipitado por B1, ya que ambos anticuerpos precipitaron un doblete con pesos moleculares relativos de 33 y 35 KD. El análisis citofluorográfico de la especificidad del anticuerpo 2B8 para linfocitos de sangre periférica demuestra que el anticuerpo reacciona específicamente con células B y que no tiene reactividad demostrada con células T u otros tipos de linfocitos. Finalmente, los datos preliminares de estabilidad sugieren que el anticuerpo es estable a 30°C durante 12 semanas sin pérdida de inmunoreactividad.

45 Cuando el anticuerpo 2B8 se conjugó con ácido metilbencil dietilentriaminopentaacético (MX-DTPA), virtualmente no se observó reducción en inmunoreactividad, respecto al anticuerpo nativo. Además, el radiomarcaje del conjugado bien con ¹¹¹In o ⁹⁰Y produjo conjugados marcados con inmunoreactividades de 100% y 60%, respectivamente. Los estudios de estabilidad de los conjugados marcados con ¹¹¹In o ⁹⁰Y incubados en suero humano durante 96 horas a 37°C indicaron

una pérdida despreciable del radiometal durante el curso del estudio, lo que sugiere que los conjugados serán estables cuando se usen clínicamente.

5 Los estudios de localización tumoral en ratones atómicos usando una preparación de 2B8-MX-DTPA marcado con indio demostraron cantidades crecientes del conjugado unido a las células tumorales durante el curso del experimento sin acumulaciones inusuales en otros tejidos. Además, las estimaciones de dosimetría derivadas de los estudios de biodistribución concuerdan con los datos publicados en la bibliografía. Finalmente, los estudios de reactividad cruzada en tejidos humanos con los anticuerpos nativo y conjugado indicaron que ambos anticuerpos reconocen un antígeno con una distribución tisular altamente restringida, reaccionando sólo con un subconjunto de células en tejidos linfoides, incluyendo aquellos de origen hematopoyético. Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que la conjugación
10 no alteró la especificidad de tejido del anticuerpo, y que los conjugados radiomarcados son estables in vivo y reconocen el antígeno CD20 presente en la superficie de tumores producidos experimentalmente en ratones atómicos.

Cuando se usó 2B8 en un estudio de farmacología/toxicología con dosis alta, el anticuerpo no produjo efectos farmacotóxicos significativos en ningún parámetro evaluado, bien durante o después del estudio. De manera similar, no se indicaron anomalías durante el análisis de las diferentes muestras histopatológicas examinadas por microscopía
15 óptica. Sorprendentemente, todas las dosis del anticuerpo usadas produjeron una depleción importante de células B circulantes. Los niveles de células B circulantes, sin embargo, volvieron a niveles aproximadamente normales una vez cesó la administración del anticuerpo. En el grupo de única dosis de monos (Grupo V), el anticuerpo nativo se aclaró de la circulación con un valor $\beta t_{1/2}$ aparente de aproximadamente 4,5 días. De forma predecible, cuando este estudio farmacocinético se realizó en ratones BALB/c, el anticuerpo 2B8 se aclaró con un valor $\beta t_{1/2}$ de 8,75 días. Así, tomados
20 conjuntamente, estos datos sugieren que el anticuerpo nativo también puede proporcionar algún efecto clínico cuando se administra como un adyuvante de los conjugados radiomarcados.

Globalmente, nuestros datos indican que el anticuerpo de alta afinidad 2B8 y su conjugado MX-DTPA presentan un patrón restringido de reactividad en tejidos humanos. Además, en primates, el anticuerpo nativo no es tóxico y produce un aclaramiento transitorio de células B; sin embargo, una vez el anticuerpo se aclara de la circulación los niveles de
25 células B vuelven razonablemente rápidamente. Además, los conjugados 2B8-MX-DTPA marcados con indio e itrio aparecen estables *in vitro*, sin presentar pérdida de radiometal durante incubación prolongada en suero humano. Finalmente, las estimaciones de dosis de radiación derivadas de la biodistribución de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y o ^{111}In en ratones BALB/c concuerdan, por milicurio de dosis inyectada, con las estimaciones de dosis derivadas de estudios clínicos humanos usando anticuerpos anti-idiotipo compartido conjugados radiomarcados con estos isótopos.

30 **IV. RESUMEN DEL DESARROLLO PRE-CLÍNICO DEL PROTOCOLO DE RADIOMARCAJE "MIX-&SHOOT" PARA LA PREPARACIÓN DE ^{90}Y -2B8-MX-DTPA**

A. Introducción.

Se ha evaluado un anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 (2B8) marcado con ^{90}Y en un ensayo clínico de Fase I para el tratamiento de linfoma de células B con recidiva. El protocolo original usado para la preparación del anticuerpo
35 marcado con itrio usó una etapa de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la eliminación de radioisótopo no unido a proteína antes de la formulación y administración a los pacientes. Desafortunadamente, este proceso es particularmente largo, resultando en una exposición mayor del anticuerpo a radioisótopo en un estado no protegido. Esto resulta en una radiolisis incrementada del anticuerpo con una disminución concomitante de la inmunoreactividad. Además, el aspecto laborioso del proceso hace que sea difícil preparar más de una dosis por día en la radiofarmacia. La
40 simplificación del proceso aceleraría la implementación en el sitio clínico como una alternativa al uso de NIPI Pharmacy Services como una radiofarmacia.

De acuerdo con esto, se desarrolló un procedimiento de radiomarcaje revisado, referido como el método "mix-and-shoot", que obvia la necesidad de purificación por HPLC a la vez que mantiene una alta radioincorporación y retención mejorada de la inmunoreactividad. Los estudios de estabilidad *in vitro* así como los estudios de biodistribución en ratones
45 mostraron que el anticuerpo radiomarcado preparado usando el método "mix-and-shoot" es comparable con el material producido usando el proceso de HPLC actual. Los resultados de estos estudios pre-clínicos indican que este nuevo protocolo "mix-&shoot" puede usarse para preparar 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y adecuado para uso en estudios clínicos.

B. Materiales y Métodos

Materiales

1. Células

5 Las líneas celulares linfoblásticas humanas SB (positiva para CD20) y HSB (negativa para CD20) se obtuvieron en la American Type Culture Collection y se mantuvieron en RPMI-1640 que contenía 10% suero bovino fetal y suplementado con glutamina.

2. Anticuerpos

El anticuerpo 2B8 se purificó por el departamento de fabricación a partir de sobrenadante de biorreactor de fibra hueca usando protocolos descritos previamente en el IND (BB-IND 4850/4851).

10 3. Reactivos Adicionales

15 El cloruro de Itrio-[90] se obtuvo de Amersham. Todos los demás reactivos se obtuvieron de fuentes descritas en las publicaciones adjuntas citadas más adelante. Los reactivos usados para los protocolos de radiomarcaje se procesaron para eliminar iones de metales pesados contaminantes que podrían competir con los radioisótopos durante la etapa de radiomarcaje (véase la sección de Métodos). Los reactivos se prepararon en condiciones GMP por el departamento de Fabricación de IDEC según Expedientes de Producción de Lotes establecidos.

Métodos

1. Preparación de 2B8-D4X-DTPA

20 MX-DTPA de grado clínico se obtuvo de Coulter Immunology como la sal disodio en agua y se almacenó a -70°C. El conjugado (2B8-MX-DTPA) fue preparado por el departamento de Fabricación. En estos estudios se usaron dos lotes diferentes de conjugado; ambos fueron proporcionados en disolución salina normal a 10 mg/mL. Los conjugados se usaron para rellenar jeringas de polipropileno estériles de 2 mL y se almacenaron a 2-8°C.

2. Mantenimiento de Condiciones sin Metales

25 Todas las manipulaciones de los reactivos se realizaron para minimizar la posibilidad de contaminación por metales. Se usaron contenedores de plástico de polipropileno o poliestireno tales como matraces, vasos de precipitados y probetas. Éstos se lavaron con Alconox y se aclararon exhaustivamente con agua Milli-Q o Agua para Irrigación (WFIr) antes del uso. Se usaron puntas de pipeta sin metales (BioRad) para manipular de manera exacta pequeños volúmenes. Los volúmenes mayores de reactivos se manipularon usando pipetas serológicas de plástico estériles. Las reacciones se realizaron convenientemente en tubos de microfuga con tapa de rosca de 1,8 mL compuestos por polipropileno.

3. Determinación de Radioincorporación

30 La radioincorporación se determinó usando cromatografía en capa fina instantánea (ITLC) en triplicado según SOP SP-13-008. En general, el protocolo fue como sigue: el conjugado radiomarcado se diluyó 1:20 en 1X PBS que contenía 1 mM DTPA ó 5 mM EDTA y se depositó 1 µL 1,15 cm desde un extremo de una tira de 1 x 5 cm de papel SG de ITLC (Gelman Sciences). El papel se desarrolló usando 10% de acetato de amonio en metanol:agua (1:1; v/v). Las tiras se secaron, se cortaron a la mitad transversalmente, y se determinó la radiactividad asociada con cada sección por contaje de centelleo. La radiactividad asociada con la mitad inferior de la tira (radiactividad asociada a proteína) se expresó como un porcentaje de la radiactividad total determinada sumando los valores de las mitades superior e inferior.

4. Protocolo "Mix and Shoot" para 2B8-MX-DTPA Marcado con Itrio-[90]

40 Los anticuerpos se radiomarcaron con el cloruro de ⁹⁰Y sin vehículo proporcionado por Amersham en 0,04 M HCl. Una alícuota de radioisótopo (10-20 mCi/mg de anticuerpo) se transfirió a un tubo de polipropileno y se añadió 0,02X volumen de 2 M acetato de sodio sin metales para ajustar la disolución a pH 3,6. Inmediatamente, se añadió 2B8-NaDTPA (0,3 mg; 10,0 mg/mL en disolución salina normal) y la disolución se mezcló suavemente. La disolución se comprobó con papel de pH para verificar un pH de 3,8-4,1 y se incubó durante 5 min. La reacción se paró transfiriendo la mezcla de

reacción a un tubo de polipropileno separado que contenía 1XPBS con 75 mg/mL de albúmina de suero humano (HSA) y 1 mM ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y se mezcló suavemente. El anticuerpo radiomarcado se almacenó a 2-8°C.

5 Las actividades específicas se determinaron midiendo la radiactividad de una alicuota apropiada del conjugado radiomarcado. Este valor se corrigió para la eficacia del contador, se relacionó a la concentración de proteína del conjugado, determinada por absorbancia a 280 nm y se expresó como mCi/mg de proteínas.

5. Inmunoreactividad *In Vitro* de Itrio-[90]-2B8-MX-DTPA

10 La inmunoreactividad del conjugado marcado con ⁹⁰Y se determinó usando SOP #SP13-009 basado en una versión modificada del ensayo de unión con células completas descrito por Lindmo. Se añadieron concentraciones crecientes de células SB positivas para CD20 o células HSB negativas para CD20 en fase logarítmica a conjuntos duplicados de tubos de polipropileno de 1,5 mL; volumen final de células, 0,40 mL. El conjugado radiomarcado se diluyó hasta una concentración final de anticuerpo de 1-2,5 ng/mL y se añadieron 0,35 mL a cada tubo. Después de una incubación de 15 la radiactividad total añadida dividido por la radiactividad asociada a las células, frente a la inversa del número de células por tubo. El intercepto del eje de las y representa la fracción inmunoreactiva.

6. Estabilidad *In Vitro* de Itrio-[90]-2B8-MX-DTPA Formulado Clínicamente

20 El conjugado 2B8-MX-DTPA se radiomarcó con ⁹⁰Y y se formuló como se describe en el protocolo "mix & shoot" proporcionado anteriormente. Se prepararon dos lotes de conjugado radiomarcado; un lote se usó para evaluar la estabilidad de la radioincorporación y el otro lote se usó para evaluar la retención de la inmunoreactividad. Los conjugados formulados se incubaron a 4°C durante 48 horas y se analizaron alicuotas en el tiempo 0, 24 h y 48 horas usando SDS-PAGE no reductora y autorradiografía. La inmunoreactividad en cada punto de tiempo se evaluó usando el ensayo descrito anteriormente.

7. Estabilidad *In Vitro* de Itrio-[90]-2B8-NTX-DTPA en Suero Humano

25 La estabilidad de 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y se evaluó por incubación en suero humano a 37°C durante hasta 72 horas. El anticuerpo conjugado se radiomarcó con itrio-[90] y se formuló como se ha descrito anteriormente. El conjugado radiomarcado se diluyó 1:10 con suero humano normal (sin inactivar con calor) y se incubaron alicuotas en tubos de plástico a 37°C. A tiempos seleccionados, se retiraron muestras y se analizaron por SDS-PAGE no reductora y autorradiografía.

30 8. Biodistribución de Itrio-[90]-2B8-MX-DTPA

35 El 2B8-MX-DTPA marcado con Itrio-[90] se evaluó para biodistribución tisular en ratones BALB/c de ocho a diez semanas de edad. El conjugado radiomarcado se preparó y se formuló como se ha descrito anteriormente. Se inyectó a los ratones intravenosamente 5 µCi de 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y y se sacrificaron grupos de cinco ratones a 1, 24, 48 y 72 horas. Después del sacrificio la cola, corazón, pulmones, hígado, riñón, bazo, músculo y fémur se retiraron, lavaron, pesaron; también se retiró una muestra de sangre y piel para el análisis. La radiactividad asociada con cada muestra de tejido se determinó midiendo la radiación bremsstrahlung usando un contador gamma y se determinó el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido y el porcentaje de dosis inyectada por órgano.

9. Dosimetría

40 Los datos de biodistribución obtenidos usando ratones a los que se inyectó 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y se usaron para calcular las estimaciones de la dosis de radiación absorbida de una dosis de 1,0 mCi administrada a un paciente de 70 kg. Las estimaciones se hicieron según los métodos adoptados por el Comité de Medical Internal Radiation Dose (MIRD) de la Society of Nuclear Medicine. Estos cálculos se realizaron por Sr. Phillip Hagan, Nuclear Medicine Service, VA Medical Center, La Jolla, CA 92161.

10. Validación del Protocolo para la Preparación de Dosis Clínicas de Itrio-[90]-2B8-MX-DTPA

(Referencia publicación R&D titulada "Validation of "Mix-and-Shoot" Radiolabeling Protocol for the Preparation of Clinical Doses of ⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA; autor, P. Chinn; fechada 22 de abril, 1994).

C. Resultados

1. Preparación de 2B8-MX-DTPA marcado con Itrio-[90] Usando el Protocolo "Mix-&Shoot"

5 Los experimentos preliminares que evaluaron las cinéticas de la reacción de radiomarcaje con 2B8-MX-DTPA y ⁹⁰Y mostraron que a pH 3,6-4,0, el 95% del radioisótopo se incorporó durante un tiempo de reacción de 5 a 10 min. La reproducibilidad de esta radioincorporación (95,7% ± 1,7%) se confirmó posteriormente en un estudio de validación para el protocolo de aumento de escala (Referencia publicación R&D titulada "Validation of "Mix-and-Shoot" Radiolabeling Protocol for the Preparation of Clinical Doses of ⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA; autor, P. Chinn; fechada 22 de abril, 1994). La
10 preparación de 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y usando este protocolo "mix-&shoot" proporcionó un producto comparable al producido con el método HPLC (véase BB-IND 4850/4851). Se encontró que el protocolo de radiomarcaje era reproducible con actividades específicas que variaron típicamente de 10 a 15 mCi/mg de anticuerpo.

La inmunoreactividad del 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y preparado usando este protocolo fue típicamente mayor del 70%, comparada con el 55-60% observado para los ciclos de validación para el protocolo de HPLC (Figura 26). Esta
15 diferencia se debe probablemente a los efectos reducidos de radiolisis debido al tiempo de incubación reducido con el protocolo "mix-and-shoot". Este resultado fue típico, y, como se discute más adelante, fue representativo de los ciclos de validación para el protocolo de aumento de escala para la preparación de dosis clínicas del conjugado radiomarcado.

2. Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA Marcado con ⁹⁰Y

Los experimentos preliminares con conjugado de anticuerpo marcado con ⁹⁰Y no protegido preparado usando el proceso
20 de HPLC demostraron que la radiolisis causaba una degradación significativa del anticuerpo y pérdida de inmunoreactividad. Por lo tanto, se desarrolló un tampón de formulación para minimizar los efectos de la radiolisis. Se mostró que la albúmina de suero humano (HSA) era eficaz para minimizar la degradación de anticuerpo debida a radiolisis. Se hizo una evaluación con el conjugado radiomarcado preparado con el método "mix-&shoot" para confirmar la eficacia de la formulación para minimizar la radiolisis. El anticuerpo marcado con ⁹⁰Y, radiomarcado hasta una
25 actividad específica de 14,5 mCi/mg de anticuerpo, se formuló en 1X PBS, pH 7,4 que contenía 75 mg/mL HSA y 1 mM DTPA. La degradación del conjugado 2B8-MX-DTPA se evaluó a 0, 24 y 48 horas usando SDS-PAGE y autorradiografía. Las Figuras 2, 3 y 4 muestran que el conjugado radiomarcado no presentó degradación significativa durante un periodo de 48 h cuando se incubó a 4°C. El análisis por cromatografía en capa fina instantánea no mostró pérdida de ⁹⁰Y durante la incubación de 48 h; estos resultados fueron corroborados por análisis con SDS-PAGE/autorradiográfico (Tabla 28). La
30 inmunoreactividad también fue relativamente constante a >88% (Tabla 29).

Tabla 28

Estabilidad de ⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA "Mix-&Shoot" en PBS que Contiene Albúmina de Suero Humano y DTPA

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Porcentaje de Radiactividad Asociada al Conjugado</u>	
	<u>ITLC</u>	<u>SDS/PAGE</u>
0	92,9	96,0
24	95,5	95,4
48	91,3	94,6

Tabla 29

Inmunoreactividad de ⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA "Mix-&Shoot" en PBS que Contiene Albúmina de Suero Humano y DTPA

<u>Tiempo (Horas a 4°C)</u>	<u>Porcentaje de Inmunoreactividad</u>
-----------------------------	--

35

0	87,9
24	88,5
48	90,4

Se incubó un 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y formulado clínicamente a una actividad específica de 15,7 mCi/mg durante 72 horas a 37°C en suero humano. Las muestras analizadas por SDS-PAGE no reductora y autorradiografía (Figura 30) no mostraron pérdida de radioisótopo durante el curso del periodo de incubación (Tabla 30). Los escaneos densitométricos de los autorradiogramas a tiempo cero y 72 h no indicaron degradación significativa del conjugado radiomarcado (Figuras 31 y 32). Estos resultados fueron corroborados por análisis cromatográficos en capa fina (Tabla 30). Debe indicarse que la radioincorporación para el anticuerpo usado en este estudio fue menor que la obtenida en los estudios de validación del protocolo de marcaje. Esta menor radioincorporación se debió a la calidad reducida del lote de cloruro de ^{90}Y usado para esta preparación particular de anticuerpo radiomarcado. La menor radioincorporación no alteró la conclusión de que el conjugado marcado con itrio preparado con el método "mix-and-shoot" es estable en estas condiciones de incubación.

Tabla 30

Estabilidad del Conjugado ^{90}Y -2B8-MX-DTPA Incubado en Suero Humano

Tiempo (Horas a 37°C)	Porcentaje de Radiactividad Asociada al Conjugado	
	<u>ITLC</u>	<u>SDS-PAGE/Autorradiografía</u>
0	85,7	88,8
24	76,4	90,0
72	87,6	88,7

Se analizaron muestras de suero humano que contenían ^{90}Y -2B8-MX-DTPA (actividad específica 15,7 mCi/mg) para ^{90}Y no unido a proteína a los tiempos mostrados usando tiras de cromatografía en capa fina instantánea y SDS-PAGE/autorradiografía.

3. Estudios de Biodistribución con Itrio-[90] 2B8-MX-DTPA

La biodistribución del conjugado marcado con ^{90}Y , con una actividad específica de 11,5 mCi/mg de anticuerpo y una radioincorporación de >95%, se evaluó en ratones BALB/c. La deposición de radiactividad en los tejidos se evaluó para órganos principales, piel, músculo, hueso, orina y heces durante 72 horas y se expresó como porcentaje de dosis inyectada por g de tejido y como porcentaje de dosis inyectada por órgano. Los resultados mostrados en las Tablas 31-34 y Figura 33 muestran que los niveles de radiactividad asociada con la sangre disminuyeron de aproximadamente 43% de dosis inyectada por gramo (%ID/g) a 1 hora hasta aproximadamente 16% después de 72 horas; a 24 h y después, los niveles de radiactividad asociada con corazón, riñón y bazo permanecieron prácticamente constantes a 4-8%. Para el pulmón e hígado, la radiactividad disminuyó de 10-12% a 1 h hasta 8%-10% a 72 h. Para la piel, la radiactividad fue relativamente constante a aproximadamente 3% de 24 h hasta 72 h. La radiactividad en el tracto gastrointestinal fue constante a 0,5-1% de 24 h hasta 72 h. La radiactividad para el músculo permaneció aproximadamente 0,6% a lo largo del curso del estudio. La captación de radiactividad por el fémur (hueso) permaneció menor de 4% a todos los puntos de tiempo lo que indica que la cantidad de itrio libre en la preparación de conjugado era despreciable y que se liberó poco radiometal libre durante el curso del estudio.

Tabla 31
Distribución de la Actividad 1,0 Hora Después de Inyección I.V. de
⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios ± SD			
Muestra	Peso del Órgano Gramo	% ID/ Gramo	% ID por Órgano
Sangre	1,37 ± 0,053	42,74 ± 0,78	58,52 ± 1,74
Corazón	0,101 ± 0,01	8,03 ± 3,33	0,82 ± 0,37
Pulmón (2)	0,126 ± 0,01	12,44 ± 0,94	1,56 ± 0,05
Riñón (1)	0,129 ± 0,01	7,81 ± 1,24	0,997 ± 0,10
Hígado	0,899 ± 0,07	10,08 ± 1,28	9,01 ± 0,52
Bazo	0,077 ± 0,004	10,74 ± 0,96	0,823 ± 0,04
Músculo	7,83 ± 0,28	0,44 ± 0,08	3,43 ± 0,51
Hueso	2,94 ± 0,11	3,44 ± 0,57	10,11 ± 1,80
Piel	2,94 ± 0,11	1,46 ± 0,58	4,24 ± 1,57
Tracto GI	2,33 ± 0,08	1,02 ± 0,19	2,36 ± 0,35
Orina	--	--	--
Heces	--	--	--
TOTAL			94,66 ± 3,47

5

No. de Ratones= 3

Peso Medio= 19,58 gramos ± 0,71 gramos

Tabla 32

Distribución de la Actividad a 24 Horas Después de Inyección I.V. de
⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios \pm SD

Muestra	Peso del Órgano Gramo	% ID/ Gramo	% ID por Órgano
Sangre	1,55 \pm 0,12	19,77 \pm 2,42	30,77 \pm 6,04
Corazón	0,105 \pm 0,01	4,44 \pm 0,55	0,47 \pm 0,08
Pulmón (2)	0,127 \pm 0,02	8,78 \pm 1,61	1,11 \pm 0,21
Riñón (1)	0,139 \pm 0,01	5,02 \pm 0,52	0,69 \pm 0,05
Hígado	0,966 \pm 0,09	8,62 \pm 2,73	8,20 \pm 1,97
Bazo	0,083 \pm 0,01	6,75 \pm 1,27	0,55 \pm 0,064
Músculo	8,83 \pm 0,69	0,692 \pm 0,01	6,12 \pm 0,52
Hueso	3,31 \pm 0,26	2,24 \pm 0,31	7,47 \pm 1,53
Piel	3,31 \pm 0,26	3,33 \pm 0,76	10,88 \pm 1,76
Tracto GI	2,89 \pm 0,43	0,73 \pm 0,09	1,02 \pm 0,05
Orina			2,31
Heces			1,23
		Total:	73,52 \pm 6,18%

5

No. de Ratones= 3

Peso Medio= 22,09 \pm 1,73 gramos

Tabla 33

Distribución de la Actividad a 48 Horas Después de Inyección I.V. de
⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios \pm SD

Muestra	Peso del Órgano Gramo	% ID/ Gramo	% ID por Órgano
Sangre	1,50 \pm 0,14	14,97 \pm 5,77	22,53 \pm 8,48
Corazón	0,104 \pm 0,01	3,99 \pm 1,43	0,415 \pm 0,16
Pulmón (2)	0,122 \pm 0,02	8,41 \pm 1,57	1,04 \pm 0,31
Riñón (1)	0,124 \pm 0,01	3,99 \pm 1,62	0,49 \pm 0,19
Hígado	0,966 \pm 0,13	6,12 \pm 3,21	5,69 \pm 2,25
Bazo	0,079 \pm 0,01	6,05 \pm 2,38	0,46 \pm 0,16
Músculo	8,59 \pm 0,82	0,54 \pm 0,19	4,67 \pm 1,67
Hueso	3,22 \pm 0,31	2,07 \pm 0,84	6,65 \pm 2,56
Piel	3,22 \pm 0,31	2,30 \pm 0,70	7,34 \pm 1,95
Tracto GI	2,63 \pm 0,40	0,652 \pm 0,30	1,67 \pm 0,64
Orina	--	--	2,83
Heces	--	--	2,06
TOTAL			57,28 \pm 17,60

5

No. de Ratones= 3

Peso Medio= 21,48 \pm 2,05 gramos

Tabla 34

Distribución de la Actividad a 72 Horas Después de Inyección I.V. de
⁹⁰Y-2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c Normales

Valores Medios \pm SD

Muestra	Peso del Órgano Gramo	% ID/ Gramo	% ID por Órgano
Sangre	1,45 \pm 0,07	15,87 \pm 4,81	23,14 \pm 7,26
Corazón	0,093 \pm 0,01	4,16 \pm 1,27	0,392 \pm 0,13
Pulmón (2)	0,123 \pm 0,02	10,67 \pm 3,79	1,30 \pm 0,45
Riñón (1)	0,123 \pm 0,01	4,79 \pm 1,03	0,596 \pm 0,16
Hígado	0,876 \pm 0,07	7,26 \pm 1,79	6,39 \pm 1,76
Bazo	0,081 \pm 0,01	7,37 \pm 2,34	0,584 \pm 0,16
Músculo	8,30 \pm 0,39	0,67 \pm 0,13	5,58 \pm 1,22
Hueso	3,11 \pm 0,15	2,58 \pm 0,51	8,05 \pm 1,76
Piel	3,11 \pm 0,15	3,09 \pm 0,82	9,66 \pm 2,68
Tracto GI	2,59 \pm 0,20	0,79 \pm 0,18	2,05 \pm 0,53
Orina	--	--	3,56
Heces	--	--	2,82
		TOTAL	65,47 \pm 14,0

5

No. de Ratones= 3

Peso Medio= 20,76 \pm 0,97 gramos

4. Dosimetría

Las dosis de radiación absorbida para un ser humano de 70 kg "estándar" calculadas para el conjugado marcado con ⁹⁰Y usando los datos de biodistribución en ratón (valores de %ID/órgano en las Tablas 31-34) se presentan en la Tabla 35. Estos resultados son comparables a los resultados obtenidos previamente usando 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y preparado usando el método de radiomarcaje con HPLC.

5

Tabla 35

Estimaciones de Dosimetría de Radiación que Resultan de la Administración de 2B8-MX Marcado con Itrio-[⁹⁰] Distribuido Uniformemente en Ser Humano Estándar (70 kg) y Basados en los Datos de Distribución en Animales en 72 Horas Después de la Inyección

CANTIDAD DE ACTIVIDAD=		1.000 MICROCURIOS/DOSIS DE PACIENTE	
	RADS		RADS
ADRENALES	0,534	OVARIOS	0,534
PARED DE LA VEJIGA	0,534	PÁNCREAS	0,534
PARED DEL ESTÓMAGO	0,534	ESQUELETO	
INTESTINO DELGADO	1,158	HUESO CORTICAL	1,466
PARED DEL INTEST. UL	1,657	HUESO TRABECULAR	1,466
PARED DEL INTEST. LL	2,380	MÉDULA (ROJA)	4,452
RIÑONES	7,015	MÉDULA (AMARILLA)	2,096
HÍGADO	7,149	CARTÍLAGO	1,466
PULMONES	2,157	OTROS CONSTIT.	1,466
OTROS TEJIDOS		PIEL	6,603
MÚSCULO	2,646	BAZO	4,973
ADIPOSO	2,646	TESTÍCULOS	0,534
SANGRE	2,646	TIROIDES	0,534
CEREBRO	2,112	ÚTERO (NOGRVD)	0,767
CORAZÓN	2,646	CUERPO TOTAL	1,755

10

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

Cálculos Realizados Usando un Molde de Hoja de Cálculo en Symphony (Lotus Development Corporation) y Creado por Phillip L. Hagan, MS, Nuclear Medicine Service, VA Hospital, San Diego, CA 92161

15

5. Validación del Protocolo para la Preparación de Dosis Clínicas de Itrio-[90]-2B8-MX-DTPA

Se prepararon un total de diez lotes de validación en MPI Pharmacy Services, Inc. Los resultados del ensayo en cada lote se resumen en la Tabla 36. Se calculó el valor medio para cada resultado del ensayo y las desviaciones estándar se indicaron cuando fue apropiado. Para evaluar la variabilidad del proceso debida a diferentes tiempos de marcaje, los lotes #1 a #8 se prepararon usando un tiempo de marcaje de 10 min; los lotes #9 y #10 se prepararon usando un tiempo de reacción de 5 min. Tomando como base los resultados del ensayo para los diez lotes de validación, se establecieron especificaciones de liberación. Las especificaciones de liberación se resumen en la Tabla 37.

Tabla 36
Resultados del Ensayo para los Diez Lotes de Validación de 2B8-MX-DTPA Marcado con ⁹⁰Y Preparados Usando "Mix-&-Shoot"

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	media
% de inmunoreactividad	72,8	93,3	71,7	70,2	60,6	68,2	79,5	72,4	88,2	68,5	74,5 ± 9,8
endotoxina (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
% de radioincorporación	97,5	97,0	93,5	96,0	94,7	94,9	95,9	96,5	97,5	93,5	95,7 ± 1,4
conc. de anticuerpo (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
radiactividad (mCi/ml)	1,22	1,22	0,98	1,26	1,51	1,55	1,06	0,98	1,28	1,02	1,21 ± 0,21
act. específica (mCi/mg)	10,0	12,0	11,2	9,8	11,3	13,0	11,3	11,1	11,5	10,7	11,2 ± 0,9
v											

Tabla 37

Especificaciones de Liberación para 2B8-MX-DTPA Marcado con ⁹⁰Y

Preparado Usando el Protocolo "Mix-&Shoot"

<u>Ensayo</u>	<u>Especificación</u>	<u>Método</u>
Inmunoreactividad	≥ 60%	RIA
Endotoxina	< 5 EU/ml	LAL
Incorporación de radiomarcador	≥ 90%	ITLC
Conc. de anticuerpo	0,075-0,150 mg/ml	A ₂₈₀
Conc. de radiact. ¹	≥ 6,0 mCi/ml	calibración de dosis
Actividad específica ¹	≥ 9,0 mCi/mg de anticuerpo	A ₂₈₀ /calib. de dosis
Radiact. vial total ¹	≥ 6,0 mCi	calibración de dosis
pH	6,0-8,0	papel de pH
conc. total de proteína	65-85 mg/ml	A ₂₈₀
ensayo de esterilidad	aprobado	CFR 610.12

5 ¹ (calibración de tiempo cero)

D. Discusión

El protocolo de radiomarcaje original para preparar 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y utilizaba una etapa de purificación por HPLC particularmente laboriosa y larga para eliminar ^{90}Y no unido a proteína de la preparación. Con el fin de simplificar este proceso y hacerlo más susceptible para uso en el sitio clínico, los esfuerzos se dirigieron a eliminar la etapa de HPLC en favor de lo que se ha denominado un protocolo "mix-and-shoot". El objetivo fue identificar condiciones de radiomarcaje que resultarían en una radioincorporación muy alta del isótopo en el conjugado, obviando de esta manera la necesidad de la etapa de purificación. Se descubrió que podría obtenerse > 95% de radioincorporación a pH 3,6 con una incubación de cinco a diez minutos. Un beneficio adicional de este protocolo fue una retención incrementada de la inmunoreactividad (< 70%), presumiblemente debido al tiempo de exposición más corto del anticuerpo al radioisótopo de alta energía antes de la adición de albúmina de suero humano que proporciona protección frente a la radiolisis. Esta retención de la inmunoreactividad es superior a la observada previamente usando el método de HPLC.

Los estudios de estabilidad con el conjugado marcado con ^{90}Y preparado usando el protocolo "mix-and-shoot" incubado en tampón de formulación (1XPBS que contenía 75 mg/mL de albúmina de suero humano y 1 mM DTPA) durante hasta 48 h a 4°C no mostraron pérdida de radioisótopo y mostraron retención completa de inmunoreactividad. Los estudios de estabilidad realizados con suero humano durante 72 horas a 37°C también indicaron una pérdida mínima de radioisótopo. Estos resultados de estabilidad son comparables con los observados previamente con conjugado radiomarcado usando el protocolo de HPLC.

La biodistribución en ratones BALB/c usando el conjugado marcado con ^{90}Y preparado con el método "mix-and-shoot" indicó ausencia de deposición inusual en tejidos. Estos resultados sugieren que el anticuerpo radiomarcado no se alteró significativamente como para alterar dramáticamente las características *in vivo* del anticuerpo. También, estos resultados son comparables con los obtenidos previamente con el conjugado radiomarcado preparado usando el método de radiomarcaje con HPLC (véase BB-IND 4850/4851). Las estimaciones de dosimetría para un ser humano de 70 kg "estándar" calculadas a partir de los datos de biodistribución para ratones concuerdan con los obtenidos con conjugado radiomarcado usando el procedimiento de HPLC (véase BB-IND 4850/4851). Además, los resultados de dosimetría son comparables con los resultados obtenidos para pacientes incluidos en un ensayo clínico en curso (estudio IDEC #1315), cuando se compara por milicurio de dosis inyectada. Para seis pacientes en el estudio, los valores medios (rads \pm SD) para el cuerpo completo, corazón, hígado y bazo fueron $1,40 \pm 0,57$, $10,50 \pm 4,68$, $9,89 \pm 8,91$, y $9,75 \pm 6,00$, respectivamente.

Antes de implementar el protocolo de marcaje "mix-and-shoot" para preparar ^{90}Y -2B8-MX-DTPA de grado clínico, fue necesario evaluar la reproducibilidad del protocolo. Por lo tanto, se prepararon diez lotes de validación usando diferentes lotes de cloruro de ^{90}Y . Para los diez lotes preparados, los valores de inmunoreactividad obtenidos usando el método "mix-and-shoot" estuvieron en el intervalo de 60,6% a 93,3% con una media de 74,5% y una mediana de 72,1%. Esta retención de inmunoreactividad es significativamente mejor que el aproximadamente 60% obtenido previamente usando el método de HPLC actual (intervalo de 54,9% a 65,1%; media de 60,2%). La radioincorporación media para los diez lotes fue 95,7% (intervalo de 93,5% a 97,5%). Este valor es comparable al observado previamente con el método de HPLC (intervalo de 91,7% a 93,7% y una media de 93,1%). También, los resultados para endotoxina, concentración de anticuerpo, concentración de radiactividad, actividad específica, radiactividad vial total, concentración total de proteína, pH, y esterilidad fueron comparables para los diez lotes. Conjuntamente, estos resultados confirmaron la reproducibilidad del método "mix-and-shoot". Además, evaluamos la variabilidad del proceso debida a diferentes tiempos de marcaje realizando reacciones durante 5 y 10 minutos. Como no hubo diferencias significativas indicadas para los dos tiempos de reacción, se decidió que se usaría el tiempo de incubación más corto en el protocolo final.

E. Resumen

Hemos desarrollado un procedimiento de marcaje, referido como el método "mix-and-shoot", para la preparación de dosis clínicas de 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y que obvia la necesidad de la etapa actualmente usada de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la eliminación de radioisótopo no unido a proteína. El protocolo simplificado elimina esta etapa laboriosa de purificación mientras mantiene un alto nivel de incorporación del radioisótopo (>95%) y una retención mejorada de la inmunoreactividad (>70%). Se encontró que el conjugado radiomarcado formulado clínicamente era estable *in vitro* cuando se incubó a 4°C durante 48 horas tomando como base la retención

del radioisótopo e inmunoreactividad. Además, el conjugado radiomarcado era estable cuando se incubó en suero humano a 37°C durante 72 horas. Los estudios de biodistribución en ratones BALB/c demostraron ausencia de deposición inusual en tejidos, incluyendo hueso. Las estimaciones de dosis de radiación absorbida para un ser humano de 70 kg "estándar" fueron comparables con las obtenidas en un estudio clínico en curso usando 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y. Los resultados de estos estudios mostraron que 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y producido usando el protocolo "mix-and-shoot" era comparable con el preparado usando el proceso convencional de HPLC. La validación del protocolo de aumento de escala para preparar conjugado radiomarcado de grado clínico mostró que el método era reproducible y que el producto era comparable con el producido usando el método actual de HPLC. Los resultados de estos estudios pre-clínicos indican que este nuevo protocolo "mix-&-shoot" puede usarse para preparar 2B8-MX-DTPA marcado con ⁹⁰Y adecuado para uso en estudios clínicos.

Descripción Detallada

Ejemplo 1. Radioincorporación - Kits y Ensayos

I. Resumen

Un objetivo de la presente descripción fue idear protocolos de kit de radiomarcaje para la preparación de 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In y ⁹⁰Y (In2B8 e Y2B8, respectivamente) y establecer especificaciones de liberación para productos clínicos. Los protocolos del kit de radiomarcaje son reproducibles respecto a la radioincorporación y unión a células SB positivas para el antígeno e indican la idoneidad del kit de radiomarcaje para uso en los ensayos clínicos. Se recomienda que las especificaciones de liberación de In2B8 e Y2B8 para radioincorporación y unión se establezcan a $\geq 95\%$ y $\geq 70\%$, respectivamente.

II. Introducción

Actualmente se está evaluando un anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 marcado con ⁹⁰Y (Y2B8) en estudios clínicos para el tratamiento de linfoma de células B con recidiva. El isótopo de itrio carece de un componente gamma lo que le hace no idóneo para sistemas de formación de imágenes. Por lo tanto, se usará 2B8-MX-DTPA marcado con ¹¹¹In (In2B8) para evaluar la localización tumoral y dosimetría en pacientes antes de o después del tratamiento con el terapéutico marcado con itrio. Los protocolos usados actualmente para la preparación de Y2B8 e In2B8, referidos como los métodos "mix-&-shoot", producen anticuerpos radiomarcados adecuados para estudios clínicos. Sin embargo, la simplificación del proceso de marcate aceleraría la preparación de dosis en un entorno clínico.

El nuevo kit de radiomarcaje está comprendido preferiblemente por cuatro componentes: 1.) 2B8-MX-DTPA en disolución salina normal con bajo contenido en metal a 2 mg/mL, 2.) 50 mM acetato sódico usado para ajustar la disolución de radioisótopo a pH de marcate apropiado, 3.) tampón de formulación (1X PBS, pH 7,4 que contiene 7,5% albúmina de suero humano y 1 mM DTPA), 4.) un vial de vidrio de 10 mL vacío (vial de reacción). Todos los componentes se ensayan para ser estériles y sin pirógenos.

Este informe resume la validación de este kit de radiomarcaje que es simple y fácil de usar y que rinde anticuerpos radiomarcados con $\geq 95\%$ de radioincorporación y retención aceptable de unión a células positivas para el antígeno. Las especificaciones de ensayo de liberación se recomiendan para los productos clínicos.

III. Materiales y Métodos para la Radioincorporación

A. Reactivos en el Kit de Radiomarcaje

1. 2B8-MX-DTPA, IDEC; Lote# 082395RM2
2. 50 mM Acetato Sódico, bajo contenido en metal, IDEC; Lote# 082395RM3
3. Tampón de Formulación (1X PBS, pH 7,4 que contiene 7,5% (p/v) albúmina de suero humano y 1 mM DTPA), IDEC, Lote# 082395RM1
4. Vial de reacción, 10 mL, IDEC

B. Materiales y Equipo

1. Kit de Radioincorporación Biodex Tec-Control, Cat.#151-770
2. Guantes: sin polvo
3. Jeringas de polipropileno estériles
- 5 4. Agujas para jeringas estériles
5. Tubos pequeños con cierre; 1,5 ml

C. Métodos

1. Preparación de Y2B8 e In2B8 Usando el Kit de Radiomarcaje

10 Los reactivos del kit se prepararon y usaron para rellenar viales de vidrio con septo. Se lavaron viales de borosilicato de tipo I (2 ó 10 mL) con agua estéril para inyección (WFI) y se autoclavaron antes de llenarlos. Se lavaron septos de goma de butilo con WFI estéril y se autoclavaron antes del uso. Los reactivos se introdujeron manualmente y se sellaron en una habitación Clase 100 y se ensayaron para pirogenicidad y esterilidad usando métodos USP.

a. Preparación de In2B8

Reactivos Adicionales:

- 15 1. Indio-[111]: sal cloruro, sin vehículo, en HCl.

Precauciones:

1. Todas las etapas se realizan preferiblemente usando técnica aséptica.
2. Debe permitirse que los componentes del kit de radiomarcaje alcancen temperatura ambiente antes del uso.
3. El producto final debe administrarse al paciente dentro de las 8 horas siguientes a completar la etapa 9 siguiente.

20 Protocolo de Radiomarcaje de In2B8

Procedimiento

1. El volumen de ¹¹¹InCl₃ para añadir al vial de reacción se calculó como sigue:

a. Concentración de radiactividad en el momento de radiomarcaje en mCi/ml:

C₀= Concentración de radiactividad en el momento de la calibración (véase el Certificado de Análisis del fabricante).

25 Δt= Cambio en el tiempo (número positivo es post calibración, número negativo es pre calibración).

$$\text{Concentración de Radiactividad en el momento del marcaje} = \frac{C_0}{e^{0,0103(\Delta t)}}$$

b. Volumen de ¹¹¹InCl₃ para añadir al vial de reacción:

$$\frac{5,5 \text{ mCi}}{\text{Concentración de Radiactividad en el momento del marcaje}} = \text{Volumen para añadir al vial de reacción}$$

2. El volumen de 50 mM acetato sódico para añadir al vial de reacción se calculó como sigue:

ES 2 526 723 T3

Volumen de $^{111}\text{InCl}_3$ añadido (Etapa 1b) X (1,2)= Volumen de 50 mM acetato sódico para añadir.

3. El septo del vial de reacción y el vial de 50 mM acetato sódico se limpiaron con alcohol. Usando una jeringa de 1 cc, se transfirió al vial de reacción el volumen calculado de 50 mM acetato sódico (Etapa 2).
4. El septo de la fuente de $^{111}\text{InCl}_3$ se limpió con alcohol. El vial se ventiló con una aguja equipada con un filtro de 0,2 μm . Usando una jeringa estéril de 1 cc, se transfirió al vial de reacción el volumen requerido (Etapa 1b) de $^{111}\text{InCl}_3$. El vial se mezcló invirtiéndolo varias veces.
5. El septo del vial de 2B8-MX-DTPA se limpió con alcohol. Usando una jeringa de 1 cc, 1,0 mL de 2B8-MX-DTPA se transfirió lentamente al vial de reacción. El vial se mezcló invirtiéndolo varias veces.
6. Se dejó que la reacción procediera durante 30 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente.
7. El volumen total de mezcla de reacción se calculó sumando conjuntamente el volumen de $^{111}\text{InCl}_3$ añadido (Etapa 4), el volumen de 50 mM acetato sódico añadido (Etapa 3) y el volumen de 2B8-MX-DTPA añadido (Etapa 5).
8. El volumen del Tampón de Formulación para añadirse al Vial de Reacción para obtener un volumen final de 10 mL se calculó restando la cantidad total calculada en la etapa 7 a 10.
9. El vial del Tampón de Formulación se limpió con alcohol y el vial se ventiló. Debido a la viscosidad del Tampón de Formulación, el vial de reacción se ventiló usando una aguja equipada con un filtro de jeringa de 0,2 μm . Usando una jeringa estéril de 10 cc equipada con una aguja de calibre apropiado, se transfirió al vial de reacción el volumen del Tampón de Formulación calculado en la Etapa 8. La aguja ventilada se retiró del vial de reacción y el vial se mezcló invirtiéndolo varias veces. (Producto Final). Este vial se incubó al menos 5 minutos antes de hacer el "Ensayo de Radioincorporación". El color de la disolución era ámbar y el vial estaba lleno, confirmando que se había añadido el Tampón de Formulación.
10. La radiactividad total del vial del Producto Final se midió usando el conjunto de instrumentación apropiado para la medida de ^{111}In .
11. El Producto Final se almacenó inmediatamente a 2^o-8^oC para el "Ensayo de Unión" y "Ensayo de Radioincorporación".

25 b. Preparación de Y2B8

Reactivos Adicionales:

1. Itrio-[90]: sal cloruro, sin vehículo, en HCl.

Precauciones:

1. Todas las etapas deben realizarse usando técnica aséptica.
2. Debe permitirse que los componentes del kit de radiomarcaje alcancen temperatura ambiente antes del uso.
3. El producto debe administrarse al paciente dentro de las 8 horas siguientes a completar la etapa 8 siguiente.

Protocolo de Radiomarcaje de Y2B8

1. El volumen de $^{90}\text{YCl}_3$ para añadir al vial de reacción se calculó como sigue:
 - a. Concentración de radiactividad en el momento de radiomarcaje:
35 C_0 = Concentración de radiactividad en el momento de la calibración (véase el Certificado de Análisis del fabricante).
 Δt = Cambio en el tiempo (número positivo es post calibración, número negativo es pre calibración).

ES 2 526 723 T3

$$\text{Concentración de Radiactividad en el momento del marcaje} = \frac{C_0}{e^{0,0108(\Delta t)}}$$

b. El volumen de $^{90}\text{YCl}_3$ para añadir al vial de reacción:

$$\frac{45 \text{ mCi}}{\text{Concentración de Radiactividad en el momento del marcaje}} = \text{Volumen para añadir al vial de reacción}$$

2. El volumen de 50 mM acetato sódico para añadir al vial de reacción se calculó como sigue:

5 a. Para $^{90}\text{YCl}_3$ en 0,040 M HCl (Amersham):

Volumen $^{90}\text{YCl}_3$ (Etapa 1b) x (0,8) = volumen de acetato sódico para añadir

b. Para $^{90}\text{YCl}_3$ en 0,050 M HCl (Nordion):

Volumen $^{90}\text{YCl}_3$ (Etapa 1b) x (1,0) = volumen de acetato sódico para añadir

10 3. Los septos del vial de reacción y el vial de acetato sódico se limpiaron con alcohol. Usando una jeringa de 1 cc, se transfirió al vial de reacción el volumen calculado (Etapa 1a ó 1b) de 50 mM acetato sódico (Etapa 2). El vial se mezcló invirtiéndolo varias veces.

4. El septo del vial de la fuente de $^{90}\text{YCl}_3$ se limpió con alcohol. El vial con una aguja equipada con un filtro estéril de 0,2 μm . Usando una jeringa estéril de 1 cc, se transfirió al vial de reacción el volumen requerido (Etapa 1b) de $^{90}\text{YCl}_3$. El vial se mezcló invirtiéndolo varias veces.

15 5. El septo del vial de 2B8-MX-DTPA se limpió con alcohol. Usando una jeringa estéril de 3 cc, se transfirieron al vial de reacción 1,5 mL de 2B8-MX-DTPA. El vial se mezcló invirtiéndolo varias veces.

6. El volumen total de mezcla de reacción se calculó sumando la cantidad de cloruro de Y-90 añadida (Etapa 4), más la cantidad de 50 mM acetato sódico añadida (Etapa 3) más la cantidad de 2B8-MX-DTPA añadida (Etapa 5).

20 7. El volumen del Tampón de Formulación para añadirse al Vial de Reacción para obtener un volumen final de 10 mL se calculó restando el volumen total de reacción calculado en la etapa 6 a 10.

25 8. El vial del Tampón de Formulación se limpió con alcohol y el vial se ventiló. Debido a la viscosidad del Tampón de Formulación, el vial de reacción usando una aguja equipada con un filtro de jeringa de 0,2 μm . Usando una jeringa estéril de 10 cc equipada con una aguja de calibre apropiado, se transfirió al vial de reacción el volumen del Tampón de Formulación calculado en la Etapa 7. La aguja ventilada se retiró del vial de reacción y el vial se mezcló invirtiéndolo varias veces. (Producto Final). El vial se incubó al menos 5 minutos antes de hacer el "Ensayo de Radioincorporación". El color de la disolución era ámbar y el vial de reacción estaba lleno, confirmando de esta manera que se había añadido el Tampón de Formulación.

9. La radiactividad total del vial del Producto Final se midió usando el conjunto de instrumentación apropiado para la medida de ^{90}Y .

30 10. El Producto Final se almacenó inmediatamente a 2^o-8^oC hasta que se requirió para la administración al paciente.

11. Ensayo de inmunoreactividad:

Usando una jeringa de 1 mL, se retiraron asépticamente 0,1 mL del vial de reacción y se transfirieron a un tubo con tapa de rosca separado de 1,5 mL. El tubo se almacenó inmediatamente a 2^o-8^oC para el "Ensayo de Unión" y "Ensayo de Radioincorporación".

La validación de los protocolos del kit de radiomarcaje se realizó en IDEC Pharmaceuticals (San Diego, CA), MD Anderson Health Center (Houston, TX), Mayo Clinic (Rochester, MN) y City of Hope (Duarte, CA). Todos los componentes del kit, incluyendo 2B8-MX-DTPA de grado clínico, se prepararon por IDEC Pharmaceuticals en condiciones GMP (Buenas Prácticas de Fabricación según el Código de Regulaciones Federales) y se determinó que eran estériles y sin pirógenos.

5

Los anticuerpos radiomarcados se formularon con 1X PBS que contenía 7,5% (p/v) albúmina de suero humano (HSA; grado clínico; Baxter-Hyland) y 1 mM DTPA. Los resultados de los ensayos de liberación realizados en cada lote de validación se describen más adelante.

Se prepararon seis lotes de validación cada uno de In2B8 e Y2B8 por cinco operadores. Estos lotes se designaron como sigue y se realizaron en las instalaciones siguientes:

10

In2B8:

#1: IDEC Pharmaceuticals

#2: IDEC Pharmaceuticals

#3: IDEC Pharmaceuticals

15 #4: MD Anderson Health Center

#5: Clínica Mayo

#6: City of Hope

Y2B8:

#1: IDEC Pharmaceuticals

20 #2: IDEC Pharmaceuticals

#3: IDEC Pharmaceuticals

#4: MD Anderson Health Center

#5: Clínica Mayo

#6: City of Hope

25 2. Preparación de Células SB y HSB Liofilizadas

Las líneas celulares humanas SB (positiva para CD20) y HSB (negativa para CD20) se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se cultivaron en matraces T usando RPMI-1640 que contenía 10% suero bovino fetal suplementado con 2% glutamina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂. Típicamente, las células se dividieron 1:2 en días alternos y se recogieron a 0,5-2,5 x 10⁶ células/mL y con una viabilidad >80%. Las concentraciones celulares se determinaron usando un hemocitómetro y la viabilidad se determinó por exclusión de azul de tripán.

30

Las células se recogieron a temperatura ambiente a una densidad celular de 0,5-2 X 10⁶ células/mL por centrifugación (1.300 rpm en una centrífuga Sorvall) y se lavaron dos veces con 1X HBSS. Las células sedimentadas se resuspendieron hasta 50 x 10⁶ células/mL en 1X HBSS que contenía 1% (p/v) albúmina de suero bovino (BSA) y 10% (p/v) manitol (tampón de liofilización), se dispensaron 0,5 mL en tubos de microfuga de polipropileno de 1,5 mL con juntas tóricas y se almacenaron a -70°C y se liofilizaron toda la noche a 30-60 militoros. Los tubos de células liofilizadas se almacenaron desecados a 2-8°C y se reconstituyeron en agua estéril para los ensayos; los tubos de células liofilizadas en tubos de microfuga se almacenaron con desecante.

35

3. Ensayos Analíticos

Los métodos analíticos usados para ensayar los lotes de validación de In2B8 e Y2B8 se describen más adelante. Los ensayos siguientes se realizaron para cada lote de validación:

1. Ensayo de Unión usando células SB liofilizadas
- 5 2. Ensayo de Radioincorporación de Y2B8/In2B8 usando el Kit Biodex

a. Ensayos de Unión

10 El porcentaje de unión se evaluó por cada operador usando células SB positivas para CD20 liofilizadas según los protocolos siguientes para In2B8 e Y2B8, respectivamente. Estos ensayos proporcionan un método rápido y eficaz para confirmar que el anticuerpo radiomarcado todavía reconoce CD20 como un antígeno. En un sitio clínico, también se evaluaron las células HSB negativas para CD20. Las células liofilizadas se prepararon y almacenaron según el método anterior, "Preparación de Células SB y HSB Liofilizadas".

i. Ensayo de Unión de In2B8

Reactivos Adicionales:

1. Indio-[111]-2B8-MX-DTPA
- 15 2. Células SB liofilizadas; tres tubos que contienen 25×10^6 células/tubo.
3. Células HSB liofilizadas; tres tubos que contienen 25×10^6 células/tubo.
4. Agua estéril para irrigación o agua estéril para inyección.
5. Tampón de dilución (1X PBS, pH 7,2-7,4 que contiene 1% Albúmina de Suero Bovino (BSA), y 0,02% Azida Sódica filtrado por $0,2 \mu\text{m}$ y almacenado a temperatura ambiente.
- 20 6. Tubos de ensayo de vidrio o plástico para contar radiactividad.

Procedimiento:

Puesta a punto del ensayo (Parte no radiactiva)

1. Se obtuvieron tres tubos de células SB y HSB liofilizadas.
2. Se añadió un volumen de 0,50 mL de SWFI (agua estéril para inyección) a cada tubo, y los tubos se agitaron con vórtex hasta que se obtuvieron suspensiones homogéneas.
- 25 3. Cuatro tubos de microfuga de 1,5 mL vacíos. A tres de los tubos se añadieron 0,50 mL de Tampón de dilución, que representa un control sin células.
4. Al otro tubo de microfuga de 1,5 mL, se añadieron ,99 mL de Tampón de dilución; este tubo se marcó 1:100.
5. Se obtuvo un tubo de polipropileno estéril de 50 mL con tapa y se añadieron al tubo 10 mL de Tampón de dilución.

30 Puesta a punto del ensayo (Parte Radiactiva)

1. Se obtuvo el anticuerpo radiomarcado almacenado a 2^0-8^0C .
2. Se tomó un volumen de 0,01 mL con una P20 y se añadió al tubo de microfuga de 1,5 mL que contenía 0,99 mL de Tampón de dilución (dilución 1:100). La punta se lavó y el tubo se agitó con vórtex suavemente para mezclar.
3. Se tomó un volumen de 0,20 mL con una P200 de la dilución 1:100 y se añadió al tubo cónico que contenía 10 mL de
- 35 Tampón de dilución. El tubo se mezcló concienzudamente.

Protocolo del Ensayo

1. Se añadió un volumen de 0,50 mL del $^{111}\text{In}2\text{B8-MX-DTPA}$ diluido a todos los tubos.
2. Las tapas se aseguraron con firmeza en todos los tubos, y los tubos se mezclaron continuamente durante 60 minutos.
3. Después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, todos los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a un mínimo de 2.000 g.
4. Se transfirió un volumen de 0,75 mL de cada sobrenadante a tubos apropiados para el instrumento de contaje.
5. Se contó la radiactividad en los tubos usando un contador gamma, ajustando para el fondo.

ii. Ensayo de Unión de Y2B8

Reactivos Adicionales:

1. $^{90}\text{Y}2\text{B8-MX-DTPA}$
2. Células SB liofilizadas
3. Agua estéril para irrigación o agua estéril para inyección
4. Tampón de dilución (1X PBS, pH 7,2-7,4 que contiene 1% Albúmina de Suero Bovino (BSA), y 0,02% Azida Sódica)

Procedimiento:

15 Prep de muestra de anticuerpo radiomarcado

1. Se obtuvo el anticuerpo radiomarcado almacenado a $2^{\circ}\text{-}8^{\circ}\text{C}$.
2. Se tomó un volumen de 10 μL con una P20 y se añadió a un tubo de microfuga de 1,5 mL que contenía 990 μL de Tampón de dilución (dilución 1:100). La punta se lavó y el tubo se agitó con vórtex suavemente.
3. Se obtuvo un tubo de polipropileno estéril de 50 mL con tapa y 10 mL de Tampón de dilución al tubo, usando una pipeta serológica de 10 mL.
4. Se tomó un volumen de 35 μL con una P200 del tubo de la dilución 1:100 y se añadió al tubo cónico que contenía 10 mL de Tampón de dilución. Mezclar concienzudamente.

20 Prep Celular Liofilizada

1. Se obtuvieron tres tubos de células SB liofilizadas.
2. Se añadió un volumen de 0,5 mL de SWFI a cada tubo, y los tubos se agitaron con vórtex hasta que se obtuvieron suspensiones celulares únicas.
3. Se obtuvieron tres tubos de microfuga de 1,5 mL vacíos; a tres de los tubos, se añadieron 0,5 mL de Tampón de dilución, lo que representa un control sin células.

Protocolo del Ensayo

1. Se añadió un volumen de 0,5 mL del $^{90}\text{Y}2\text{B8-MX-DTPA}$ diluido a cada tubo.
2. Los tubos se pusieron en un mezclador vertical durante 45 minutos, después de tener la certeza que las tapas estaban cerradas de forma segura.
3. Después de 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, las células se sedimentaron por microcentrifugación durante 5 minutos.
4. Se transfirió un volumen de 0,8 mL del sobrenadante a viales de centelleo.

5. Se añadió a cada vial mezcla de centello.

6. Se determinó la cantidad de radiactividad en cada vial usando un contador de centelleo, ajustando para el fondo.

b. Ensayo de Radioincorporación

5 El porcentaje de radioincorporación se determinó por cromatografía en capa fina instantánea (ITLC) usando el Kit Radiocromatográfico Biodex Tec-Control según el protocolo siguiente:

Materiales y Equipo Adicionales:

1. 2B8-MX-DTPA radiomarcado con ^{111}In o ^{90}Y

2. Tubos para contar tiras de TLC radiactivas

3. Tijeras

10 4. Jeringa estéril, 1 cc

5. Agujas estériles, 26G

6. Contador gamma o contador de centelleo

7. Pipeta

Procedimiento:

15 1. En primer lugar debe leerse el Manual de Operación Biodex completo.

2. Cada muestra radiomarcada en triplicado se ensayó según las instrucciones del kit; se reveló una tira por vial.

3. Para dispensar la muestra radiomarcada en la tira de cromatografía, se usó una pipeta para dispensar 1 μl en la línea de origen. Alternativamente, puede dispensarse una pequeña gota dispensada de una aguja 26G unida a una jeringa estéril de 1 cc.

20 4. Cada sección se contó para actividad usando el contador apropiado, es decir, contador gamma para ^{111}In y un contador de centelleo para ^{90}Y , ajustando para el fondo.

5. Se siguieron las instrucciones de Biodex para calcular el porcentaje de anticuerpo radiomarcado.

IV. Resultados

Los resultados del ensayo en cada lote de validación de In2B8 o Y2B8 se resumen en las Tablas 38 y 39.

25

Tabla 38. Resultados del Ensayo de Liberación para la Validación de Y2B8

Número de Lote	% de Radioincorporación	% de Unión
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
	Media= 98,8	Media 82,3
	Desviación Estándar= 1,24	Desviación Estándar= 3,4
	% CV= 1,25%	CV= 4,2%

5

Tabla 39. Resultados del Ensayo de Liberación para la Validación de In2B8

Número de Lote	% de Radioincorporación	% de Unión
1	99,4	86,2
2	98,7	86,8
3	99,3	85,8
4	98,3	86,7
5	99,0	82,1
6	99,3	83,0
	Media= 99,0	Media= 85,2
	Desviación Estándar= 0,43	Desviación Estándar= 2,06
	% CV= 0,45%	CV= 2,42%

10

V. Discusión y Conclusiones

Para simplificar los métodos actuales de radiomarcaje para In2B8 e Y2B8, se desarrolló un kit de cuatro componentes. Las concentraciones de acetato sódico y 2B8-MX-DTPA se redujeron hasta 50 mM y 2 mg/mL, respectivamente, para permitir transferencias exactas de volumen usando jeringas. Todos los componentes del kit se introdujeron preferiblemente en viales de vidrio con septo y se ensayaron para esterilidad y pirogenicidad por IDEC antes de la liberación, eliminando así la necesidad de realizar estos ensayos en los sitios clínicos. En el sitio, todas las manipulaciones de los reactivos se realizan usando jeringas y agujas estériles. Por lo tanto, la adherencia a técnica aséptica encontrada normalmente en un entorno de radiofarmacia asegura que los anticuerpos radiomarcados y formulados son adecuados para la administración a pacientes.

La reproducibilidad y fortaleza de los protocolos de radiomarcaje para In2B8 e Y2B8 se evaluaron realizando varios ciclos de validación usando diferentes lotes de cada radioisótopo. Para los seis lotes de validación de In2B8 preparados, la unión varió de 82,1% hasta 86,8% con una media de 85,1%; los valores de radioincorporación fueron aproximadamente 99% (intervalo de 98,3% a 99,4%). Para los seis lotes de validación de Y2B8 preparados, el porcentaje de unión obtenido estuvo en el intervalo de 78,6% a 87,0% con una media de 82,3%. Los valores de radioincorporación para Y2B8 promediaron 98,8% (intervalo de 96,3% a 99,5%). Conjuntamente, estos resultados confirman la reproducibilidad y fortaleza de los métodos de kit de radiomarcaje para la preparación tanto de In2B8 como Y2B8. Tomando como base estos resultados de validación, se recomienda que se establezcan las especificaciones de liberación para radioincorporación y unión en $\geq 95\%$ y $\geq 70\%$, respectivamente, tanto para In2B8 como Y2B8.

Además, debido a la facilidad incrementada de uso y el potencial reducido para errores durante la preparación, se recomienda que se use el porcentaje de unión usando células positivas para CD20 liofilizadas y radioincorporación para el ensayo de liberación de In2B8 e Y2B8 en los sitios clínicos.

En resumen, estos resultados indican conjuntamente que In2B8 e Y2B8 preparados usando el kit de radiomarcaje son adecuados para uso en el entorno clínico. Además, para ambos anticuerpos radiomarcados, se establecen especificaciones de liberación que reflejan los resultados de varios ciclos de validación por los cinco operadores diferentes.

Ejemplo 2. Radioincorporación y Unión - Kits y Ensayos

I. Resumen.

El anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 designado 2B8 se ha clonado en células CHO para rendir una línea celular con una alta expresión. La especificidad del anticuerpo derivado de CHO para células humanas positivas para CD20 se demostró por análisis FACS y unión competitiva. Se observó una unión despreciable a células T humanas. Se determinó que la afinidad del anticuerpo para células positivas para CD20 era $1,3 \times 10^{-10}$ M usando un ensayo de unión competitiva. El anticuerpo se hizo reaccionar con el agente quelante MX-DTPA para formar un conjugado, 2B8-MX-DTPA, con pérdida despreciable de inmunoreactividad (el valor de afinidad fue $4,4 \times 10^{-10}$ M. La conjugación óptima con el quelante, según se determina midiendo la radioincorporación de ^{111}In , se consiguió después de ocho horas de reacción. Los protocolos de radiomarcaje para 2B8-MX-DTPA se optimizaron para ^{90}Y o ^{111}In respecto al pH y tiempo de incubación para asegurar una máxima radioincorporación ($\geq 95\%$) y retención de inmunoreactividad ($\geq 70\%$). Se recomendaron especificaciones de liberación para In2B8 e Y2B8 preparados usando 2B8-MX-DTPA derivado de CHO en ensayos clínicos para radioincorporación ($\geq 95\%$) y unión a células humanas positivas para CD20 liofilizadas y reconstituidas ($\geq 70\%$). Tomados conjuntamente, estos resultados indican la idoneidad de 2B8-MX-DTPA derivado de CHO para uso en ensayos clínicos.

II. Introducción

El anticuerpo 2B8 usado previamente se produjo en biorreactores de fibra hueca. Para reducir los costes de fabricación de este anticuerpo, se ha clonado y expresado en células CHO para rendir una línea celular de producción con una alta expresión. Este ejemplo describe los resultados de la caracterización in vitro de los productos anticuerpo 2B8 derivado de CHO, el anticuerpo conjugado (2B8-MX-DTPA) y el anticuerpo marcado con ^{90}Y e ^{111}In preparados usando los protocolos clínicos del kit de radiomarcaje.

III: Materiales y Métodos

A. Reactivos

- 5 Las líneas celulares humanas SB (positiva para CD20) y HSB (negativa para CD20) se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se cultivaron en matraces T usando RPMI-1640 que contenía 10% suero bovino fetal suplementado con 2% glutamina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂. Típicamente, las células se dividieron 1:2 en días alternos y se recogieron a 0,5-2,5 x 10⁶ células/mL y con una viabilidad >80%. Las concentraciones celulares se determinaron usando un hemocitómetro y la viabilidad se determinó por exclusión de azul de tripán. La información específica sobre los lotes celulares se registra en el Cuaderno# 1553 y en la carpeta titulada "Cell Activity Logbook 1995 & 1996" escrito por Ron Morena.
- 10 El 2B8 derivado de CHO se produjo en condiciones GMP en la instalación de fabricación de IDEC. El anticuerpo se formuló en disolución salina normal con bajo contenido en metal a 11,5 mg/ml. Se determinó que los anticuerpos eran homogéneos por SDS-PAGE. 2B8-MX-DTPA se produjo en condiciones GMP según PSBR-043 a partir de 2B8 derivado de CHO y se formuló en disolución salina con bajo contenido en metal a 2 mg/mL (Lotes# 0165A y 0165B).
- 15 El cloruro de ¹¹¹In de grado farmacéutico se obtuvo en Amersham (Reino Unido) o Cyclotron Products Inc. (Coral Gables, FL). El cloruro de itrio[90] se obtuvo en Amersham (Reino Unido), Nordion International (Kanatta, Canadá) o Pacific Northwest National Laboratory (Richland, WA). El MX-DTPA preparado en GMP se obtuvo en Hauser Chemical (Boulder, CO). El ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) calcio trisodio de grado clínico se obtuvo en Heyl (Berlín, Alemania). TAG-NHS se obtuvo en IGEN Inc. (Rockville, MD). Los lechos anti-CD19 murinos se adquirieron en Dynal Inc. (Lake Success, NY). El anti-ratón F(ab')₂ de cabra marcado con FITC se adquirió en Jackson ImmunoResearch.
- 20 Los reactivos que requerían la eliminación de metales pesados contaminantes se trataron en lotes con Chelex 100 (BioRad Industries) o con Sefarosa Quelante (Pharmacia) pasando disoluciones a través de una columna. Las disoluciones madre con bajo contenido en metal se diluyeron con Agua Estéril para Irrigación (SWFIR). Las disoluciones se almacenaron en contenedores de plástico estériles.

Los reactivos adicionales se describen a continuación para métodos específicos.

25 B. Materiales y Equipo

1. Analizador Origen; IGEN Inc. Modelo #1100-1000; IDEC #1492
2. Contador de centelleo Top-Count; Packard, Modelo #A9912; IDEC #1329
3. Contador gamma; Isodata, Modelo # 20-10; IDEC #0628
4. Kit Radiocromatográfico Tec-Control, Biodex, Modelo #151-770
- 30 5. Liofilizador; Virtis, Modelo Freezemobile 12; IDEC #0458

Los materiales y equipos adicionales se describen para métodos específicos.

C. Métodos

1. Preparación de Células SB y HSB Liofilizadas

- 35 Las células se cultivaron como se ha descrito anteriormente y se recogieron a temperatura ambiente a una densidad celular de 0,5-2 X 10⁴ células/mL por centrifugación (1.300 rpm en una centrífuga Sorvall) y se lavaron dos veces con 1X HBSS. Las células sedimentadas se resuspendieron a 50 x 10⁶ células/mL en 1X HBSS que contenía 1% (p/v) albúmina de suero bovino (BSA) y 10% (p/v) manitol (tampón de liofilización), se dispensaron 0,5 mL en tubos de microfuga de polipropileno de 1,5 mL con juntas tóricas y se almacenaron a -70°C y se liofilizaron toda la noche a 30-60 militoros. Los tubos de células liofilizadas se almacenaron desecados a 2-8°C y se reconstituyeron en agua estéril para los ensayos;
- 40 los tubos de células liofilizadas en tubos de microfuga se almacenaron con desecante.

2. Análisis de Unión por FACS

5 La unión directa de los anticuerpos a células B humanas se determinó por citometría de flujo. Se incubaron concentraciones crecientes de anticuerpo en 1X PBS, pH 7,2, que contenía 1% (p/v) BSA (tampón de unión) con 5×10^6 células positivas para CD20 (SB) o negativas para CD20 (HSB) durante 30 min. en hielo. Las células se lavaron por centrifugación, se resuspendieron en tampón de unión y se incubaron con anti-ratón F(ab')₂ de cabra marcado con FITC durante 30 min. en hielo. Después de incubar con el reactivo secundario, las células se lavaron por centrifugación y se resuspendieron en 1X PBS que contenía 1,1% (v/v) formaldehído para fijar las células. La intensidad de fluorescencia media se determinó usando citometría de flujo.

3. Ensayos de Unión Competitiva

10 La inmunoreactividad de 2B8 y 2B8-MX-DTPA se determinó por unión competitiva a células SB positivas para CD20 usando el método electroquimioluminiscente de ORIGEN (Leland y Powell). Se recogieron células SB en fase logarítmica del cultivo y se lavaron dos veces con 1X HBSS. Las células se diluyeron en 1X PBS pH 7,2 que contenía 1% (p/v) albúmina de suero bovino. En algunos experimentos, se usaron células liofilizadas después de reconstitución con agua estéril.

15 El anticuerpo traza marcado con rutenio se preparó incubando 2B8 derivado de CHO (lote #165) en 1X PBS, pH 7,2, con el quelante éster N-hidroxisuccinimida de rutenio (II) tris-bipiridina (TAG-NHS) en una proporción molar 15:1 de TAG-NHS a anticuerpo. Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, protegida de la luz, la reacción se paró con glicina durante 10 min. El TAG que no había reaccionado se eliminó por cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Pharmacia PD-10 equilibrada con 1X PBS. La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteínas Bradford. La incorporación de TAG se determinó midiendo la absorbancia a 455 nm. Se calculó que la proporción molar de TAG a proteína era 3,0.

25 Los ensayos se realizaron en tubos de polipropileno de 12 X 75 mm. Se incubaron cantidades variadas de anticuerpo de competición (0,002-17 µg/mL) en 1X PBS, pH 7,2, que contenía 1% (p/v) BSA con 0,08 µg/mL de 2B8 de CHO marcado con TAG, 0,08 mg/mL de lechos anti-CD19 y 167.000 células/mL. Después de incubar a temperatura ambiente con mezclado orbital durante 3 h, se determinó la electroquimioluminiscencia (ECL) relativa usando el instrumento ORIGEN. Se determinaron los valores de ECL media para muestras en duplicado y se representaron frente a la concentración de anticuerpo de competición usando software Kaleidagraph. Para algunos experimentos, se representó el porcentaje de inhibición. Las curvas de competición se ajustaron y se determinaron los valores CE 50 (concentración de anticuerpo que proporciona un 50% de unión máxima) usando el programa de 4 parámetros siguiente:

$$30 \quad y = \frac{m_1 - m_4}{1 + (m_0/m_3)^{m_2}} + m_4; m_1 = ; m_2 = ; m_3 = ; m_4 =$$

m0= variable independiente

m1= respuesta de señal cero en unidades ECL relativas

m2= parámetro de curvatura

m3= CE50 en µg/mL

35 m4= respuesta de señal máxima en unidades ECL relativas

Los valores de afinidad promedio se calcularon a partir de los valores CE50 y la concentración conocida del anticuerpo traza usando el método de Muller.

4. Preparación de 2B8-MX-DTPA

40 El agente quelante, ácido 1.isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) se proporcionó como un polvo seco (ácido libre) y se almacenó desecado a -20^o ó -70^oC. Aproximadamente 3 mg de anticuerpo 2B8 de CHO en disolución salina normal con bajo contenido en metal se ajustaron a pH 8,6 añadiendo una décima parte del volumen de 50 mM borato sódico, pH 8,6. El anticuerpo a 10-11 mg/mL se incubó a una proporción molar 4:1 de MX-DTPA a proteína añadiendo MX-DTPA disuelto en 50 mM borato sódico, pH 8,6. Después de incubar a temperatura ambiente (2

a 24 h), el quelante que no había reaccionado se eliminó del conjugado por diafiltración repetitiva en disolución salina normal con bajo contenido en metal usando filtros de centrifuga Centricon 30.

5. Preparación de In2B8 e Y2B8

5 In2B8 se preparó usando el protocolo del kit de radiomarcaje como se describe en la presente memoria. El anticuerpo se marcó hasta una actividad específica de 3 mCi/mg y se formuló a 0,2 mg/mL. Brevemente, se transfirieron 0,5 a 2 mCi de cloruro de ¹¹¹In a un tubo de microfuga sin metal y se ajustó a aproximadamente pH 4,2 usando un volumen 1,2X de 50 mM acetato sódico con bajo contenido en metal. Se añadió 2B8-MX-DTPA a 2 mg/mL a la disolución de acetato de indio y después de incubar a temperatura ambiente durante 30 min., el anticuerpo marcado se formuló a 0,2 mg/mL en 1X PBS, pH 7,2 que contenía 7,5% (p/v) albúmina de suero humano y 1 mM DTPA (4% a 6% concentración final de HSA). Todas las muestras se ensayaron para radioincorporación en triplicado; los valores fueron >95%.

15 Y2B8 también se preparó usando una versión a pequeña escala del protocolo del kit de radiomarcaje descrito en el Ejemplo 1. El anticuerpo se marcó hasta una actividad específica de 15 mCi/mg y se formuló a 0,3 mg/mL. Brevemente, se transfirieron 0,5 a 2 mCi de cloruro de ⁹⁰Y a un tubo de microfuga sin metal y se ajustó a aproximadamente pH 4,2 usando un volumen 1,2X de 50 mM acetato sódico con bajo contenido en metal. Se añadió 2B8-MX-DTPA a 2 mg/mL a la disolución de acetato de ⁹⁰Y y después de incubar a temperatura ambiente durante 5 min., el anticuerpo marcado se formuló a 0,3 mg/mL en 1X PBS, pH 7,2 que contenía 7,5% (p/v) albúmina de suero humano y 1 mM DTPA (concentración final de HSA, 4% a 6%). Todas las muestras se ensayaron para radioincorporación en triplicado; los valores fueron >95%.

20 Las concentraciones de radiactividad de los productos radiomarcados finales se calcularon tomando como base la cantidad de radiactividad añadida a la mezcla de reacción y por referencia al Certificado de Análisis para el radioisótopo. La concentración de anticuerpo de las mezclas de reacción paradas se calculó a partir de la cantidad conocida de anticuerpo añadida.

25 Para los estudios cinéticos de radiomarcaje que evaluaban el efecto del pH en la radioincorporación y unión, el pH de las mezclas de reacción se ajustó añadiendo cantidades variadas de 50 mM acetato sódico con bajo contenido en metal (0,8 a 2,2X volumen de la disolución de radioisótopo).

6. Determinación de la Radioincorporación para In2B8 e Y2B8

30 La cantidad de radiactividad asociada con los conjugados (radioincorporación) en los productos finales o muestras de incubación se determinó usando un kit disponible comercialmente fabricado por Biodex (Kit Radiocromatográfico Tec-Control; véase Ejemplo 1). En general, se aplicó 1 µL de las muestras de ensayo en duplicado o triplicado usando una micropipeta y se reveló según la hoja de instrucciones de Biodex. Se contaron mitades de tiras para radiactividad en tubos de vidrio usando un contador gamma Isodata o un contador de centelleo Packard Top Count como se describe más adelante. La incorporación de radiomarcador se calculó dividiendo la cantidad de radiactividad en la mitad superior de la tira por la radiactividad total encontrada en las mitades superior e inferior. Este valor se expresó como un porcentaje y se determinó el valor medio.

35 7. Determinación de Inmunoreactividad de In2B8 e Y2B8

La inmunoreactividad se evaluó usando el método de Lindmo et al y como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

8. Ensayo de Unión Directa para In2B8 e Y2B8

40 Los mismos protocolos como se describe en la presente memoria se usaron para determinar la unión a células SB positivas para CD20 para In2B8 e Y2B8, respectivamente. In2B8 e Y2B8 se prepararon y formularon como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo, se diluyeron muestras de In2B8 o Y2B8 con tampón de dilución de ensayo (1XPBS, pH 7,2, que contenía 1% (p/v) albúmina de suero bovino (BSA) hasta 40 ng/mL y 11 ng/mL, respectivamente.

Las células positivas para el antígeno (SB) y negativas para el antígeno (HSB) se mantuvieron en RPMI 1640 suplementado con 10% suero de ternera fetal a 37°C y 5% CO₂. Las células (viabilidad >90% según se determina por exclusión de azul de tripán) se recogieron a temperatura ambiente a una densidad celular de 0,5-2 x 10⁶ células/mL por

centrifugación (1.300 rpm en una centrifuga Sorvall) y se lavaron dos veces con 50 mL 1X HBSS. Las células sedimentadas se resuspendieron hasta 50×10^6 células/mL en 1X HBSS pre-enfriado que contenía 1% (p/v) albúmina de suero bovino (BSA) y 10% (p/v) manitol (tampón de liofilización). Se dispensaron suspensiones celulares en tubos de microfuga de polipropileno de 1,5 mL con juntas tóricas a 50×10^6 células/mL (0,5 mL por tubo) y se liofilizaron toda la noche a 30 a 60 millores. Las células liofilizadas se almacenaron desecadas a $2-8^\circ\text{C}$ y se reconstituyeron en agua estéril para los ensayos.

Las células SB y HSB liofilizadas en tubos de polipropileno de 1,5 mL se reconstituyeron hasta 50×10^6 células/mL usando agua estéril. Se añadió a las células In2B8 o Y2B8 diluido, en triplicado, y se incubó durante 45 a 60 min con mezclado vertical a temperatura ambiente, respectivamente. Después de incubar, las células se sedimentaron por centrifugación y se determinó la radiactividad unida a las células contando las muestras en un Contador Gamma Isodata o un contador de centello Packard Top Count como se describe más adelante. La radiactividad unida (B) a las células se calculó restando la radiactividad no unida (sobrenadante) de la radiactividad total añadida. La radiactividad total se determinó a partir de la radiactividad contada en los tubos sin células. El porcentaje de unión se calculó expresando las cuentas unidas como un porcentaje de las cuentas totales.

15 9. Medida de la Radiactividad

Las muestras de radioincorporación se contaron durante 1 min. usando un contador gamma Isodata. El contador se ajustó para ventanas de energía de 100-500 KeV y el fondo se ajustó a cero inmediatamente antes del uso para las muestras usando ^{111}In . El contador gamma Isodata también se usó para contar las tiras de ITLC que tenían ^{90}Y dispensado en ellas. Las ventanas de energía para la detección de la radiación bremsstrahlung fueron 100-1.000 KeV.

20 Para los ensayos de unión, las muestras ^{90}Y se transfirieron a placas de 24 pocillos y mezcla MicroScint 40 y se contaron en un Packard Top Count durante 1 min usando ajustes de energía mínimo y máximo. Las muestras de indio-[111] se contaron durante 1 min. usando un contador gamma Isodata. El contador se ajustó para ventanas de energía de 100-500 KeV y el fondo se ajustó a cero inmediatamente antes del uso.

10. Especificaciones de Liberación para Dosis Clínicas de In2B8 e Y2B8

25 Se establecieron especificaciones de liberación para la radioincorporación y unión a células positivas para CD20 preparando seis dosis de cada uno de In2B8 e Y2B8 usando dos lotes de 2B8-MX-DTPA de grado clínico (lotes # 0219 y 0220) preparados según la presente descripción e introducidos en condiciones GMP. Los ensayos de liberación se realizaron como se ha descrito anteriormente.

IV. Resultados

30 A. Caracterización de 2B8 Derivado de CHO

Usando análisis citométrico de flujo, se demostró que 2B8 de CHO se une directamente a células SB positivas para CD20 sin unirse a células HSB negativas para CD20 (Figura 34). No se indicó unión significativa a células SB o HSB para un anticuerpo de isotipo irrelevante ($\gamma 1\kappa$) (S004).

35 La unión de 2B8 de CHO a células positivas para CD20 se evaluó en ensayos de competición usando el sistema de detección electroquimioluminiscente ORIGEN. Se incubaron células SB positivas para el antígeno liofilizadas y reconstituidas con cantidades crecientes de anticuerpo en presencia de 2B8 de CHO traza marcado con rutenio. Los resultados mostraron que 2B8 de CHO inhibe la unión a células positivas para CD20 en el mismo grado que el anticuerpo derivado de biorreactores de fibra hueca (2B8-49) (Figura 35). Los valores CE50 se determinaron gráficamente y se usó el método de Muller (1980) para calcular los valores de afinidad promedio. Se determinó que la afinidad para 2B8 de CHO era $1,3 \times 10^{-10}$ M; el anticuerpo 2B8 derivado de bioreactores de fibra hueca proporcionó un valor de afinidad de $2,5 \times 10^{-10}$ M. La unión no específica fue despreciable como se demuestra por la ausencia de competición con el anticuerpo de isotipo irrelevante, S004.

B. Caracterización de 2B8-MX-DTPA Derivado de CHO

El conjugado de 2B8 (2B8-MX-DTPA) se preparó usando un protocolo similar al usado para el 2B8-49 caracterizado previamente. Las reacciones se realizaron usando aproximadamente 3 mg de anticuerpo y una proporción molar 4:1 de quelante a anticuerpo. Se evaluaron los tiempos de incubación de 2, 4, 8, 17 y 24 h para determinar el tiempo de reacción que proporcionaba una retención aceptable de la unión a células positivas para CD20 y alta radioincorporación con ^{111}In . Las curvas de unión competitiva que comparan 2B8 de CHO con el conjugado 2B8-MX-DTPA de CHO con reacción durante 8-24 h fueron similares, indicando que el proceso de conjugación no alteró significativamente la unión del anticuerpo al antígeno CD20 (Figura 36). Usando los valores CE50 determinados gráficamente (Figura 36), las constantes de afinidad para los anticuerpos no conjugado y conjugado variaron de $2,3 \times 10^{-10}$ M a $5,9 \times 10^{-10}$ M (Tabla 40). La radioincorporación fue >95% para los tiempos de conjugación de 8 a 24 h (Tabla 30).

Tabla 40. Efecto del Tiempo de la Reacción de Conjugación en Radioincorporación e

Inmunoreactividad de 2B8-MX-DTPA de CHO

Tiempo de Incubación (h)	Radioincorporación (%)	Afinidad (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	$4,4 \times 10^{-10}$

C. Caracterización de In2B8 e Y2B8 Preparados a Partir de 2B8-MX-DTPA Derivado de CHO

El 2B8-MX-DTPA de CHO marcado con indio-[111] (In2B8) se preparó usando el protocolo del kit de radiomarcaje a pequeña escala descrito previamente para el anticuerpo derivado de biorreactor con fibra hueca (Ejemplo 1). Brevemente, el anticuerpo conjugado (2B8-MX-DTPA derivado de CHO; lote # 0165A) se incubó con acetato de ^{111}In al pH indicado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción se formularon con PBS, pH 7,2, que contenía 7,5% (p/v) albúmina de suero humano y 1 mM DTPA. Las muestras formuladas de In2B8 se ensayaron para radioincorporación usando cromatografía en capa fina instantánea. La unión de In2B8 a células positivas para CD20 se determinó usando células SB liofilizadas y reconstituidas. Para comparación, el conjugado preparado a partir de anticuerpo producido por hibridoma (2B8-49) se incubó con acetato de ^{111}In durante 30 min. a pH 4,2 (condiciones establecidas previamente para este anticuerpo).

Se realizaron estudios de cinética para determinar las condiciones de marcaje que proporcionaban una retención máxima de la unión a células positivas para CD20 y alta radioincorporación (Tablas 41 y 42). El anticuerpo conjugado (2B8-MX-DTPA derivado de CHO) se incubó a temperatura ambiente con acetato de ^{111}In a pH 4,2 durante los tiempos indicados (Tabla 42).

Tabla 41. Cinética de Radiomarcaje de In2B8: Efecto del pH en la Radioincorporación y Unión a Células Positivas para CD20

<u>pH de la Reacción</u>	<u>Radioincorporación (%)</u>	<u>Unión (%)</u>
3,0	97,7	85,3
3,7	98,5	83,9
4,0	98,6	84,1
4,3	98,0	84,0
4,6	98,9	83,4
Control (2B8-49)	99,3	86,5

Tabla 42. Cinética de Radiomarcaje de In2B8: Efecto del Tiempo de Incubación en la Radioincorporación y Unión a Células Positivas para CD20

5

<u>Tiempo de Incubación (min)</u>		<u>Radioincorporación (%)</u>	<u>Unión (%)</u>
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
Control (2B8-49)		99,4	87,8

Los resultados demostraron que para el intervalo de pH 3,0 a 4,6 y un tiempo de incubación de 30 min, se consiguió >97% de radioincorporación del radioisótopo mientras se mantenía la unión a aproximadamente 84%. Los valores de radioincorporación y unión no variaron para tiempos de incubación de 15 a 45 min para las reacciones a pH 2,9 a 4,6 (Tabla 42). Los resultados fueron comparables a los obtenidos usando el anticuerpo 2B8-49 (Tablas 41 y 42).

- 10 El anticuerpo marcado con itrio-[90] se preparó incubando el anticuerpo conjugado (2B8-MX-DTPA derivado de CHO) con acetato de ⁹⁰Y al pH indicado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción se formularon en PBS, pH 7,2, que contenía 7,5% (p/v) albúmina de suero humano y 1 mM DTPA. Las muestras formuladas de Y2B8 se ensayaron para radioincorporación usando cromatografía en capa fina instantánea. La unión de Y2B8 a células positivas para CD20 se determinó usando células SB liofilizadas y reconstituidas. Para comparación, el conjugado preparado a partir de anticuerpo producido por hibridoma (2B8-49) se incubó con acetato de ⁹⁰Y durante 5 min. a pH 4,2 (condiciones establecidas previamente para este anticuerpo).
- 15

Se realizaron estudios de cinética similares para evaluar la preparación del anticuerpo marcado con ⁹⁰Y (Y2B8). Para las reacciones de radiomarcaje en el intervalo de pH 3,9 a 4,7 y un tiempo de incubación de 5 min, la radioincorporación fue >96% con >80% de retención de unión a células positivas para CD20 (Tabla 43). Se obtuvieron resultados similares para tiempos de incubación de 3, 5 y 10 min para el intervalo de pH 2,9 a 4,6 (Tabla 44). Entonces, el anticuerpo conjugado (2B8-MX-DTPA derivado de CHO) se incubó a temperatura ambiente con acetato de ⁹⁰Y a pH 4,2 durante los tiempos indicados (Tabla 44). Los resultados fueron comparables a los obtenidos usando el anticuerpo 2B8-49 (Tablas 43 y 44).

20

Tabla 43. Cinética de Radiomarcaje de Y2B8: Efecto del pH en la Radioincorporación y Unión a Células Positivas para CD20

pH de la Reacción	Radioincorporación (%)	Unión (%)
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
Control (2B8-49)	99,3	82,6

Tabla 44. Cinética de Radiomarcaje de Y2B8: Efecto del Tiempo de Incubación en la Radioincorporación y Unión a Células Positivas para CD20

Tiempo de Incubación (min)	Radioincorporación (%)	Unión (%)	
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
Control (2B8-49)	99,2	84,2	

5 Las inmunoreactividades para In2B8 e Y2B8 preparados a partir de 2B8 de CHO se determinaron usando el método de Lindmo et al. Se incubaron cantidades crecientes de células SB positivas para CD20 recién recogidas con una cantidad fija de In2B8 o Y2B8 en condiciones de exceso de antígeno. El análisis de representación recíproca de los datos de unión permitió determinar inmunoreactividades de 80,6% y 72,2% para In2B8 e Y2B8, respectivamente (Figuras 37 y 38).

10 D. Especificaciones de Liberación para In2B8 e Y2B8 Derivados de CHO

15 Se usaron dos lotes de kits de radiomarcaje In2B8/Y2B8 de grado clínico para preparar seis lotes cada uno de In2B8 e Y2B8. In2B8 e Y2B8 se prepararon usando versiones a pequeña escala de los protocolos de radiomarcaje usados actualmente en los estudios clínicos. Cada lote de 2B8-MX-DTPA radiomarcado se ensayó para radioincorporación y unión a células humanas positivas para CD20 (SB) y negativas para CD20 (HSB). Estos resultados se resumen en las Tablas 45 y 46. Para los seis lotes de In2B8 preparados, la radioincorporación varió de 98,9% a 99,3% con una media de 99,1%. La unión a células positivas para CD20 varió de 81,9% a 85,1% con una media de 83,6%; la unión a células negativas para CD20 fue <4%. Para los seis lotes de Y2B8 preparados, la radioincorporación varió de 97,4% a 98,7% con una media de 98,2%. La unión a células positivas para CD20 varió de 81,4% a 82,7% con una media de 81,9%; la unión a células negativas para CD20 fue <8%.

20

Tabla 45. Resultados del Ensayo de Liberación para In2B8 Derivado de CHO Preparado Usando el Protocolo del Kit de Radiomarcaje

Ciclo #	Radioincorporación (%)	Unión (%)	
		Células SB	Células HSB
#1 (Lote #0219)	99,1	81,9	2,8
#2 (Lote #0219)	99,3	83,2	2,8
#3 (Lote #0219)	99,2	83,6	3,7
#4 (Lote #0220)	99,0	83,8	2,6
#5 (Lote #0220)	98,9	84,1	2,6
#6 (Lote #0220)	98,9	85,1	3,3
	Media = 99,1%	Media= 83,6%	Media= 2,9%
	SD= 0,2%	SD= 1,1%	SD= 0,4%

5 Tabla 46. Resultados del Ensayo de Liberación para Y2B8 Derivado de CHO Preparado Usando el Protocolo del Kit de Radiomarcaje

Ciclo #	Radioincorporación (%)	Unión (%)	
		Células SB	Células HSB
#1 (Lote #0219)	98,7	82,1	7,4
#2 (Lote #0219)	98,6	82,7	0,7
#3 (Lote #0219)	98,3	82,2	7,2
#4 (Lote #0220)	97,4	81,8	1,7
#5 (Lote #0220)	97,6	81,4	2,2
#6 (Lote #0220)	98,4	81,4	1,1
	Media = 98,2%	Media= 81,9%	Media= 3,4%
	SD= 0,5%	SD= 0,5%	SD= 3,1%

V. Discusión y Conclusiones

- 10 El anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 (2B8) clonado y expresado en células CHO (2B8 derivado de CHO) mantiene la especificidad para células humanas positivas para CD20 como se muestra por análisis FACS y de unión competitiva. La unión a células T humanas fue mínima. Se determinó que la afinidad del anticuerpo para células humanas positivas para CD20 era $1,3 \times 10^{-10}$ M usando un ensayo de unión competitiva. Usando el mismo ensayo, el anticuerpo 2B8 derivado de biorreactores de fibra hueca proporcionó un valor de afinidad de $2,5 \times 10^{-10}$ M.
- 15 El anticuerpo 2B8 de CHO se hizo reaccionar con MX-DTPA para formar un conjugado, 2B8-MX-DTPA, mientras se mantenía una retención adecuada de la inmunoreactividad. La incorporación óptima del quelante se determinó midiendo la radioincorporación con ^{111}In y se consiguió después de ocho horas de incubación a temperatura ambiente. Los protocolos de radiomarcaje para el conjugado 2B8-MX-DTPA se optimizaron para ^{90}Y o ^{111}In respecto al pH y tiempo de incubación para asegurar una radioincorporación y retención de inmunoreactividad máximas.

Los resultados de varias preparaciones de In2B8 e Y2B8 demuestran la reproducibilidad del protocolo de radiomarcaje usado para preparar dosis clínicas. Tomando como base estos resultados de radiomarcaje, se sugiere que se establezcan las especificaciones de liberación para radioincorporación y unión, usando células positivas para CD20 liofilizadas, a $\geq 95\%$ y $\geq 70\%$, respectivamente. Tomados conjuntamente, estos resultados demuestran la comparabilidad de 2B8 derivado de CHO y 2B8-49 derivado de fibra hueca e indican la idoneidad del 2B8-MX-DTPA derivado de CHO para uso en estudios clínicos.

Finalmente, la presente descripción describe un procedimiento de marcaje, referido como el método "mix-and-shoot", para la preparación de dosis clínicas de anticuerpos radiomarcados que obvia la necesidad de la etapa usada actualmente de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la eliminación de radioisótopo no unido a proteína. El protocolo simplificado elimina esta laboriosa etapa de purificación mientras mantiene un alto nivel de incorporación del radioisótopo ($>95\%$) y retención mejorada de la inmunoreactividad ($>70\%$). Se encontró que el conjugado radiomarcado formulado clínicamente era estable *in vitro* cuando se incubó a 4°C durante 48 horas tomando como base la retención del radioisótopo y la inmunoreactividad. Además, el conjugado radiomarcado era estable cuando se incubó en suero humano a 37°C durante 72 horas. Los estudios de biodistribución en ratones BALB/c demostraron ausencia de deposición inusual en tejidos, y ausencia de acumulación significativa en el hueso. Las estimaciones de las dosis de radiación absorbidas para un ser humano de 70 kg "estándar" fueron comparables con las obtenidas en un estudio clínico en curso usando 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y . Los resultados de estos estudios mostraron que 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y producido usando el protocolo "mix-and-shoot" fue comparable con el preparado usando el proceso convencional de HPLC. La validación del protocolo de aumento de escala para preparar conjugado radiomarcado de grado clínico mostró que el método era reproducible y que el producto era comparable con el producido usando el método actual de HPLC. Los resultados de estos estudios pre-clínicos indican que este nuevo protocolo "mix-&-shoot" puede usarse para preparar 2B8-MX-DTPA marcado con ^{90}Y adecuado para uso en estudios clínicos.

Referencias

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

REIVINDICACIONES

1. Un método para radiomarcarse un anticuerpo conjugado con quelante con ^{111}In para administración a un paciente que comprende:
 - 5 (i) mezclar el anticuerpo conjugado con quelante con una disolución que contiene ^{111}In para formar una mezcla;
 - (ii) incubar la mezcla a una temperatura apropiada durante aproximadamente 30 minutos para producir un anticuerpo radiomarcado, en el que el anticuerpo radiomarcado tiene más del 95% de radioincorporación, y
 - (iii) diluir el anticuerpo radiomarcado en un tampón de formulación hasta una concentración apropiada para administración al paciente, de manera que pueda administrarse directamente al paciente sin purificación adicional de ^{111}In no incorporado, en el que el tampón de formulación comprende disolución salina tamponada con fosfato o disolución salina fisiológica, un radioprotector y quelante no conjugado.
- 10 2. El método según la reivindicación 1 en el que el anticuerpo conjugado con quelante comprende un anticuerpo anti-CD20.
3. El método según la reivindicación 2 en el que el anticuerpo anti-CD20 es 2B8-MX-DTPA.
- 15 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la disolución que contiene ^{111}In se ajusta a un pH de aproximadamente 3 a 5 antes de mezclarla con el anticuerpo conjugado con quelante.
5. El método según la reivindicación 4 en el que el pH se ajusta con una disolución de acetato sódico con bajo contenido en metal.
- 20 6. El método según la reivindicación 5 en el que la disolución de acetato sódico está a una concentración de aproximadamente 10 a 1.000 mM.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que la cantidad de volumen de ^{111}In usada es aproximadamente 4 a 6 mCi dividida por la concentración de radiactividad en el momento del marcaje.
8. El método según la reivindicación 7 en el que la cantidad de volumen de ^{111}In usada es 5,5 mCi dividida por la concentración de radiactividad en el momento del marcaje.
- 25 9. El método según la reivindicación 8 en el que aproximadamente 1 ml de anticuerpo conjugado con MX-DTPA a una concentración de aproximadamente 0,5 a 30 mg/ml se mezcla con la disolución que contiene ^{111}In .
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que el tampón de formulación se añade en una cantidad necesaria para conseguir un volumen final total de 10 ml a 50 ml.
- 30 11. El método según la reivindicación 10 en el que el radioprotector es albúmina de suero humano (HSA), ascorbato, ácido ascórbico, fenol, un sulfito, glutatión, cisteína, ácido gentísico, ácido nicotínico, palmitato de ascorbilo, HOP(:O)H₂, glicerol, sulfoxilato sódico de formaldehído, Na₂S₂O₅, Na₂S₂O₃, o SO₂.
12. El método según la reivindicación 11 en el que el radioprotector es HSA.
13. El método según la reivindicación 12 en el que la HSA está a una concentración de aproximadamente 1 a 25% (p/v).
14. El método según la reivindicación 13 en el que la concentración de HSA es aproximadamente 7,5% (p/v).
- 35 15. El método según la reivindicación 11 en el que el radioprotector es ascorbato.
16. El método según la reivindicación 15 en el que el ascorbato está a una concentración de aproximadamente 1 a 100 mg/ml.
17. El método según la reivindicación 10 en el que el quelante no conjugado es DTPA.

18. El método según la reivindicación 17 en el que la concentración de DTPA es aproximadamente 1 mM.

FIG. 1

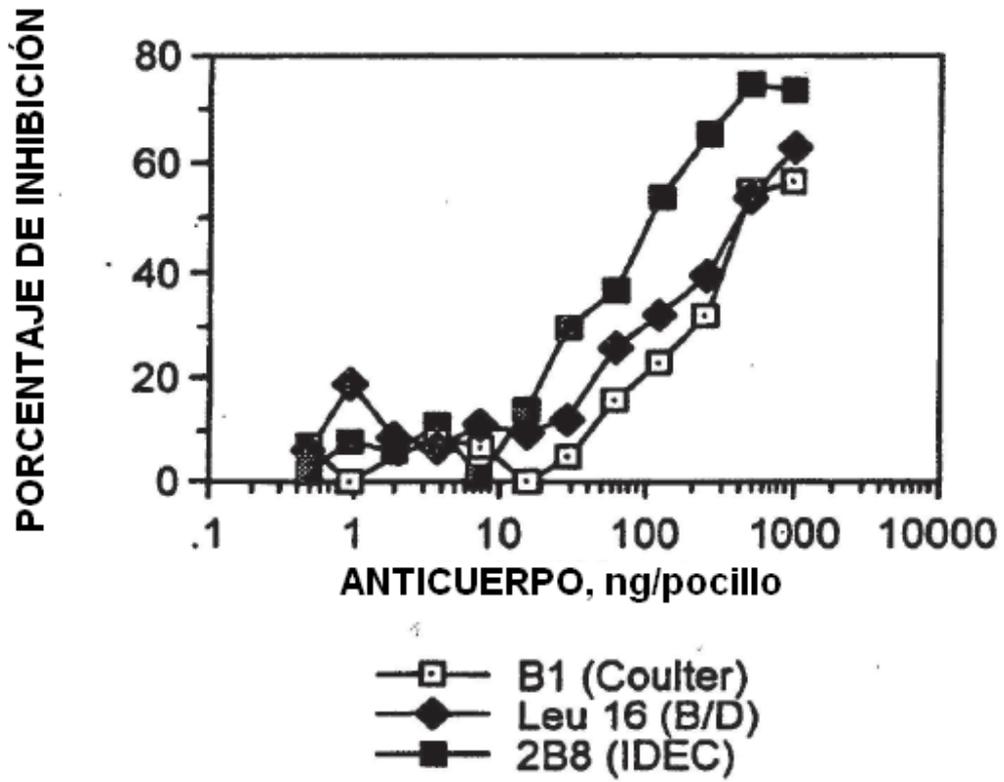


FIG. 2

Análisis FACS de la Unión de 2B8 a Antígeno CD20 Presente en Células B Humanas

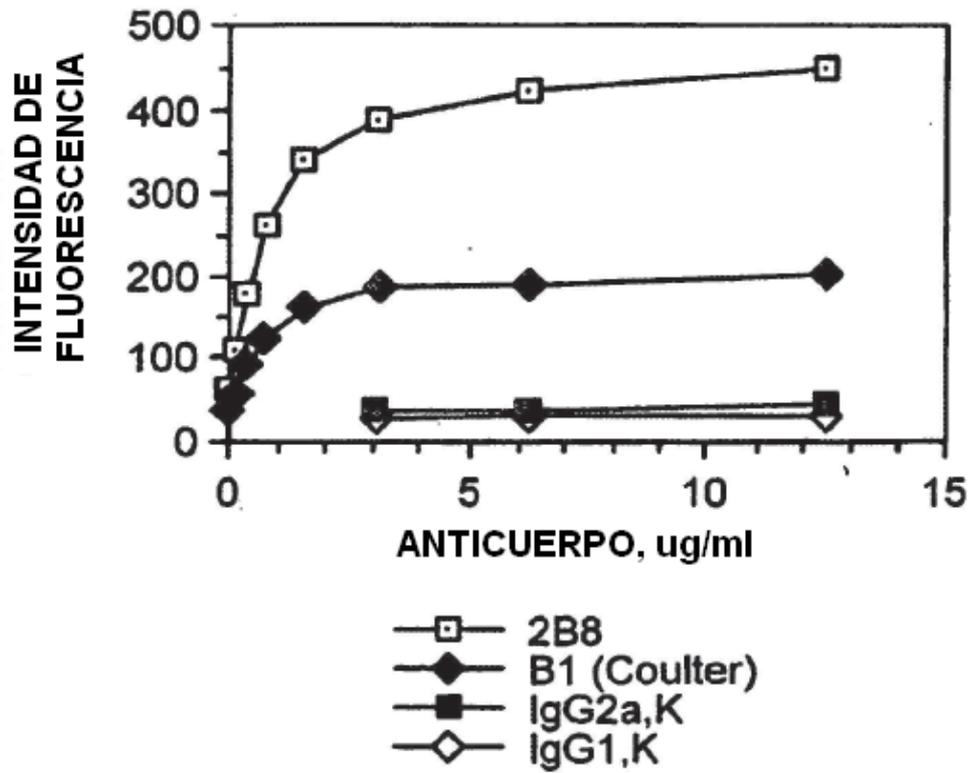


FIG. 3

Análisis Scatchard de la Unión de 2B8 a Células B

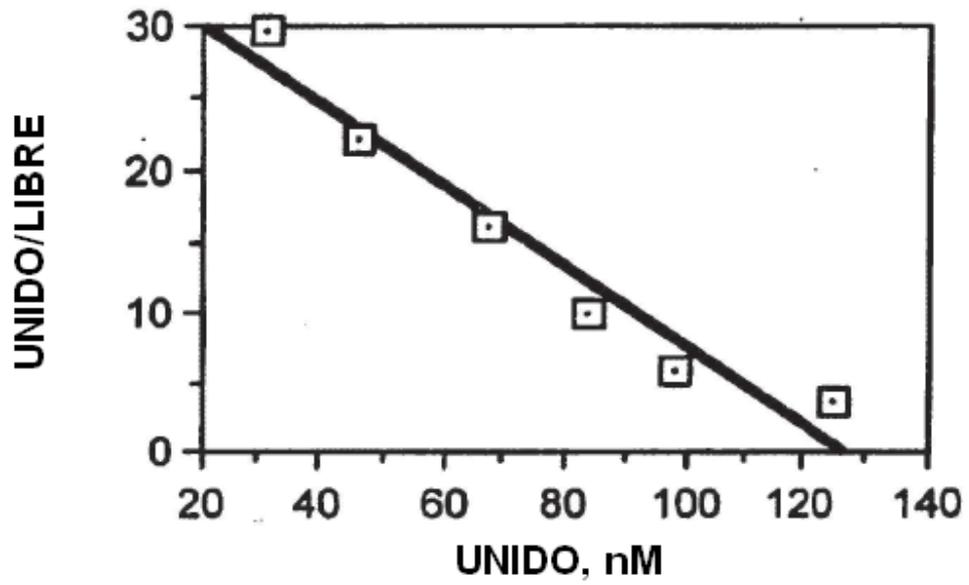


FIG. 4

Inhibición de Mab Anti-CD20 B1 Radiomarcado por B1 No marcado, 2B8 y 2B8 Conjugado con MX-DTPA

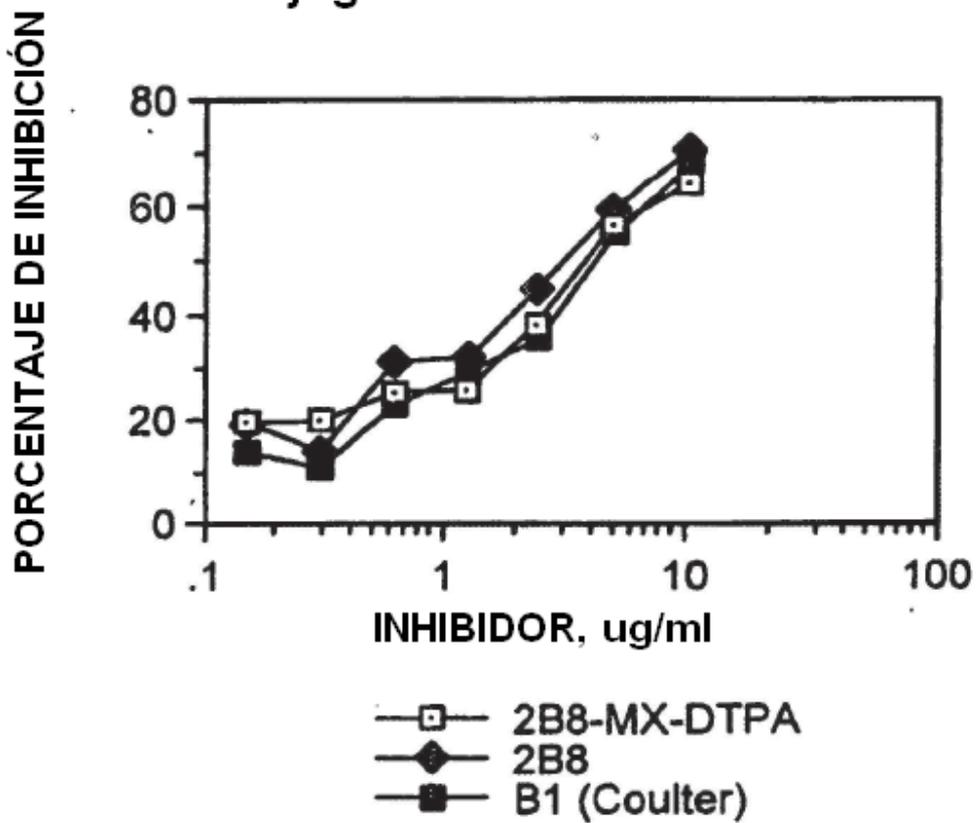


FIG. 5A

Inmunoreactividad de 2B8 Durante Incubación a 4° y 30° C

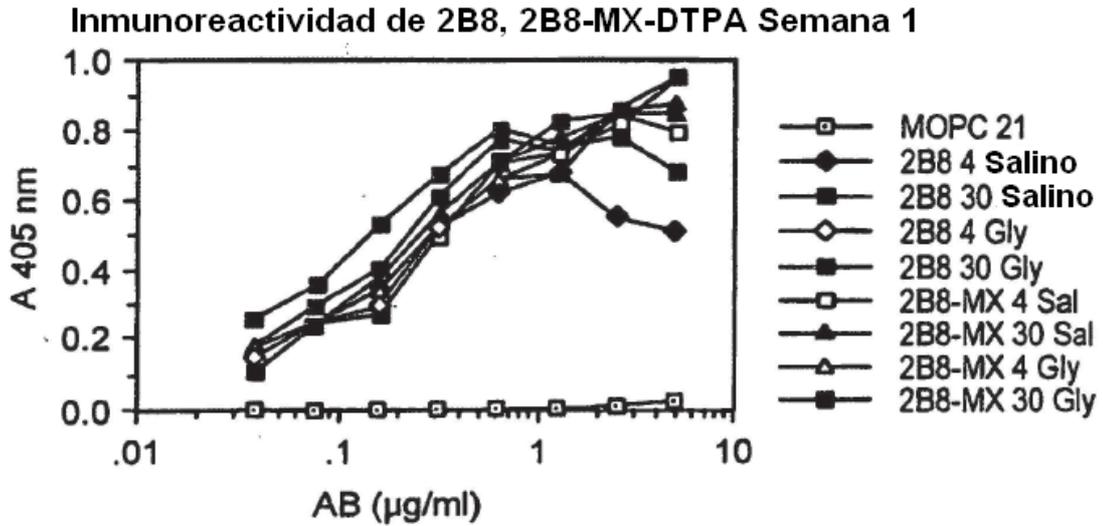


FIG. 5B

Inmunoreactividad de 2B8 Durante Incubación a 4° y 30° C

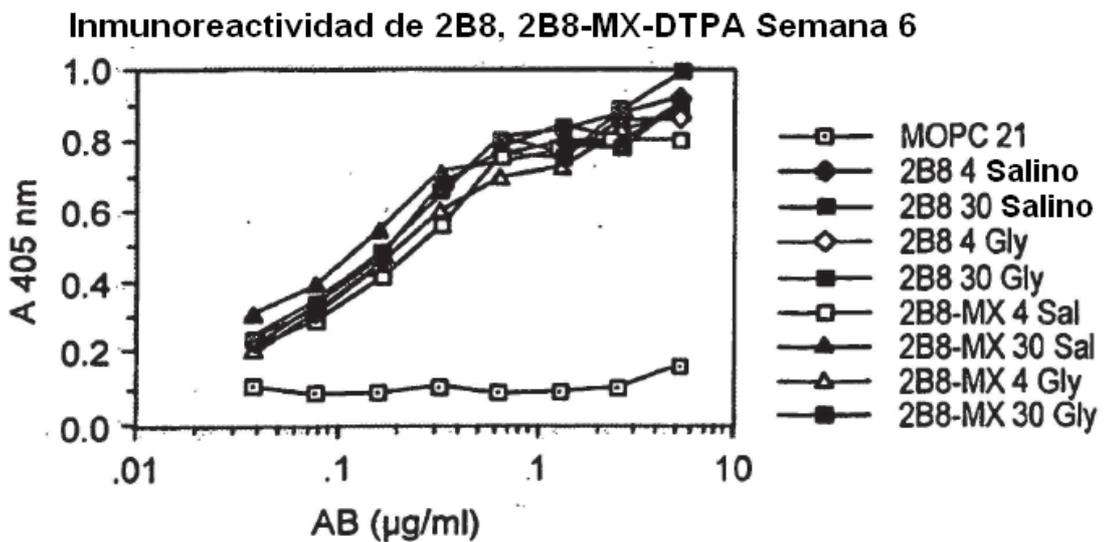


FIG. 5C

Imunoreactividad de 2B8 Durante Incubación a 4° y 30° C

Imunoreactividad de 2B8, 2B8-MX-DTPA Semana 12

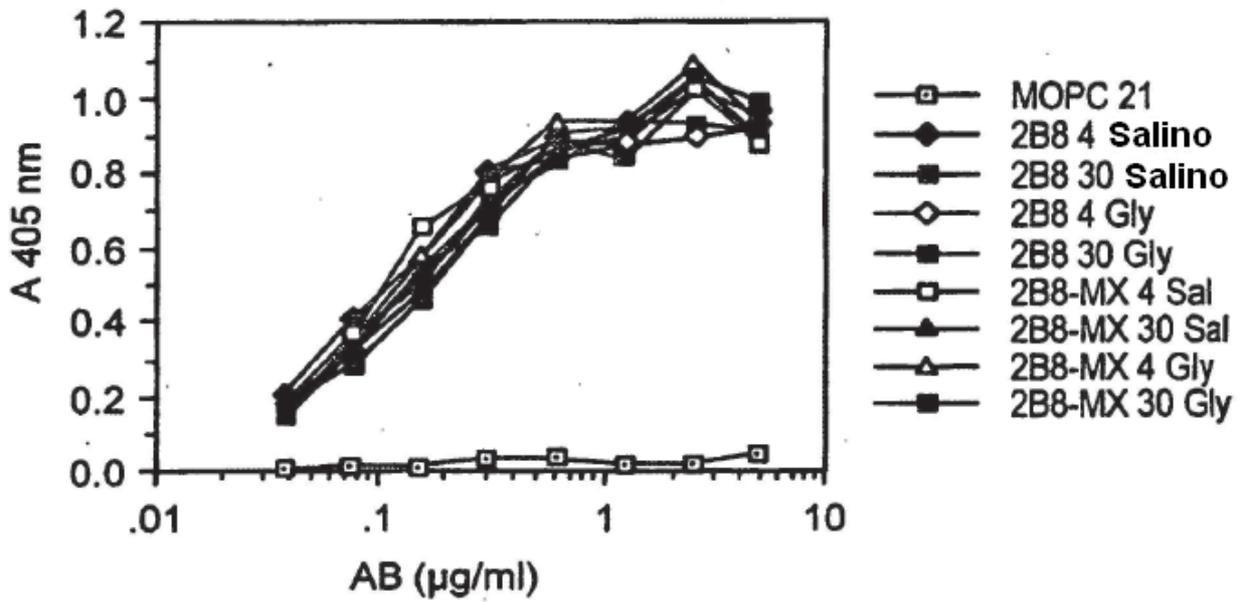


FIG. 6A

Unión de 2B8-MX-DTPA Marcado con ^{111}In
a Células Humanas Positivas para CD-20

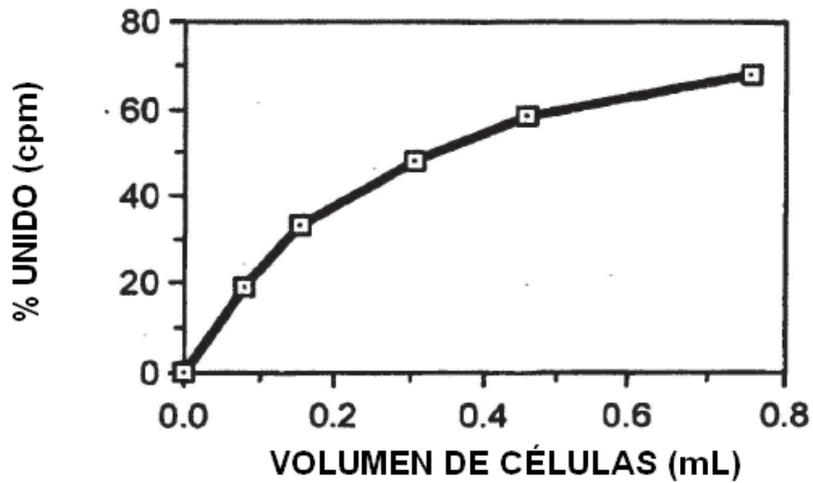


FIG. 6B

Unión de 2B8-MX-DTPA Marcado con ^{111}In
a Células Humanas Positivas para CD-20

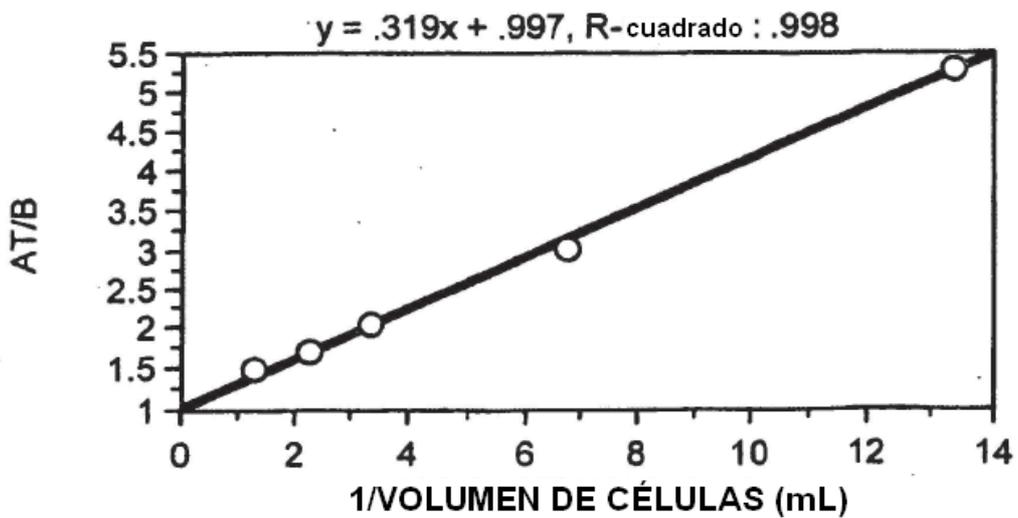


FIG. 7

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y en PBS que Contiene
Albúmina de Suero Humano y DTPA

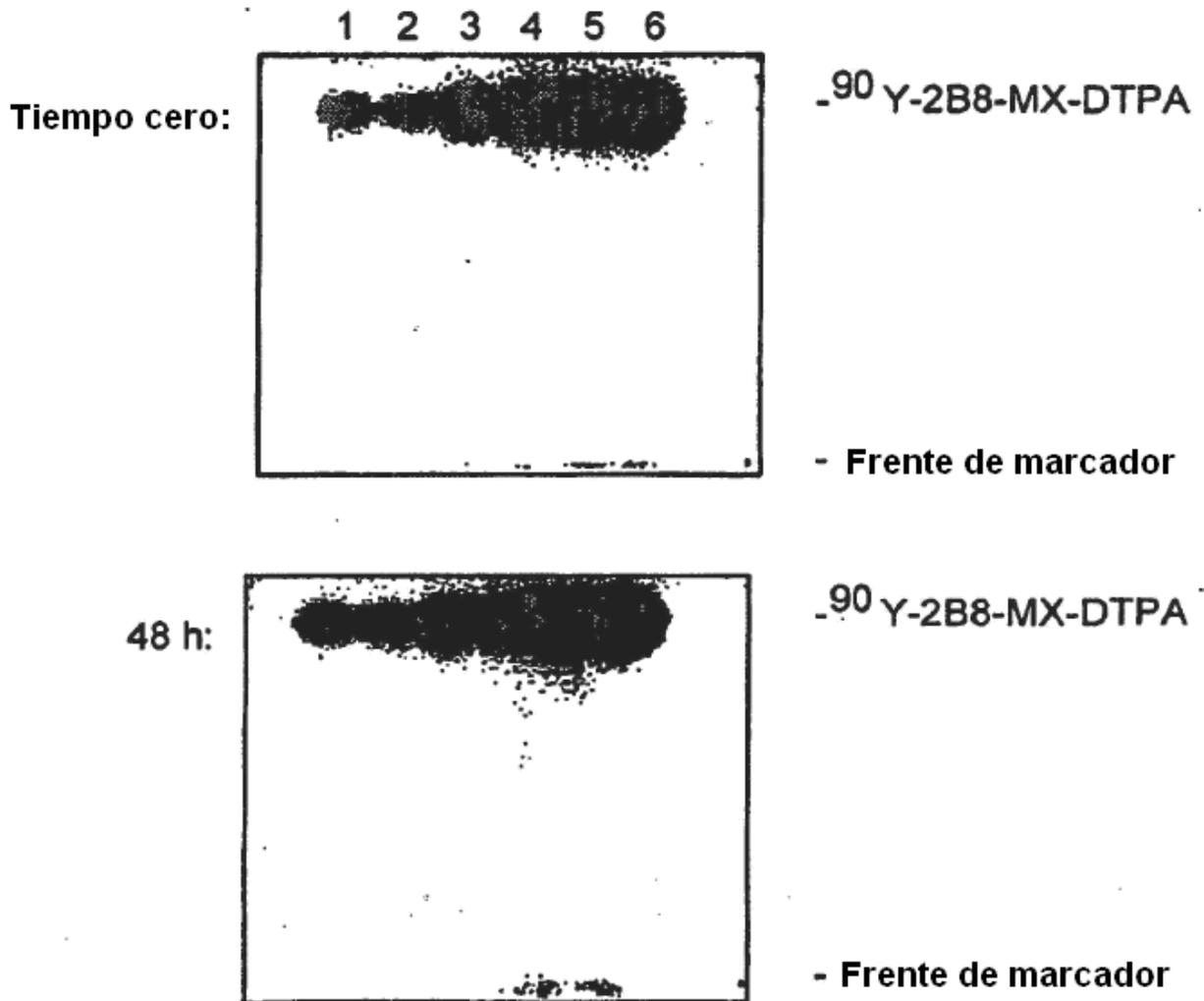


FIG. 8

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y en PBS que Contiene
Albúmina de Suero Humano y DTPA

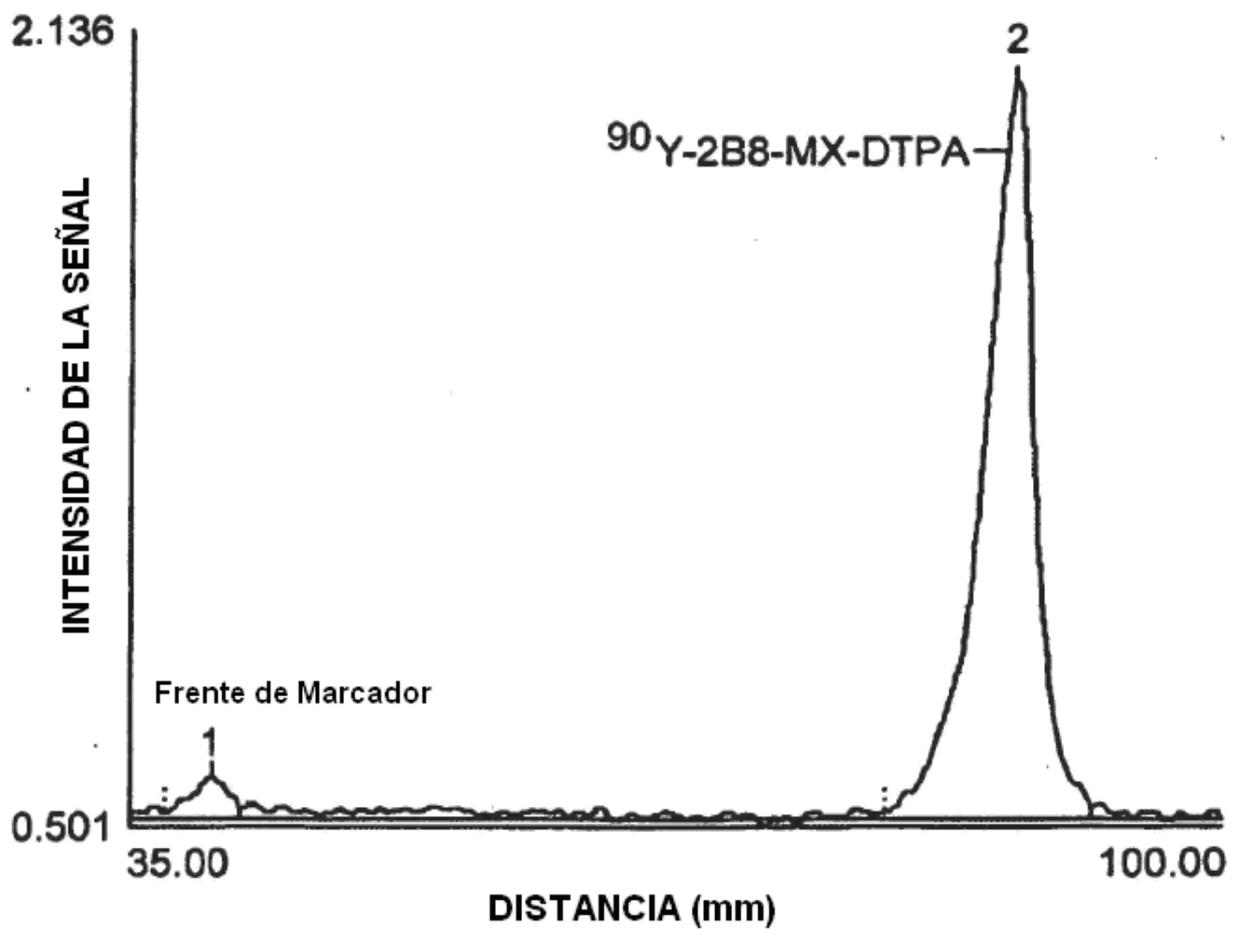


FIG. 9

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y en PBS que Contiene
Albúmina de Suero Humano y DTPA

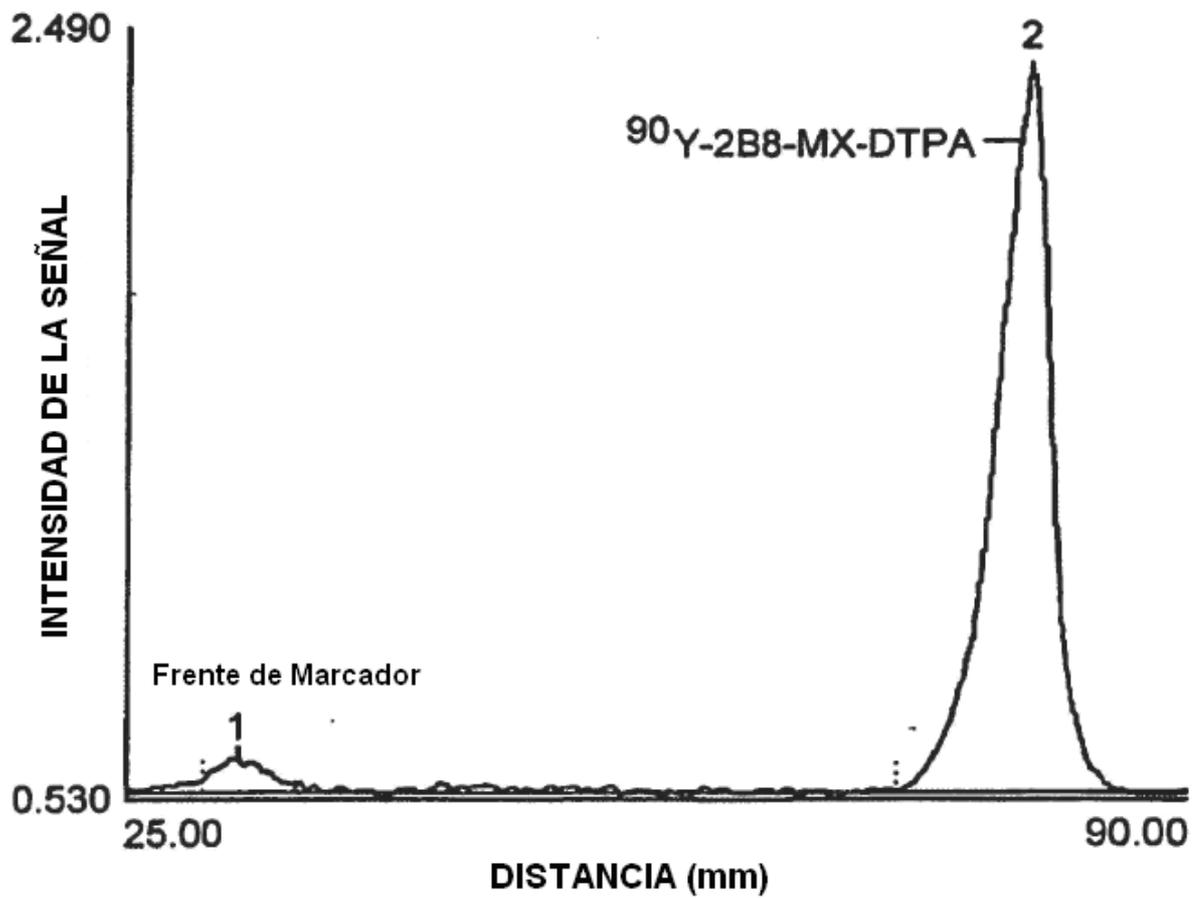


FIG. 10

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{111}In en PBS que Contiene
Albúmina de Suero Humano

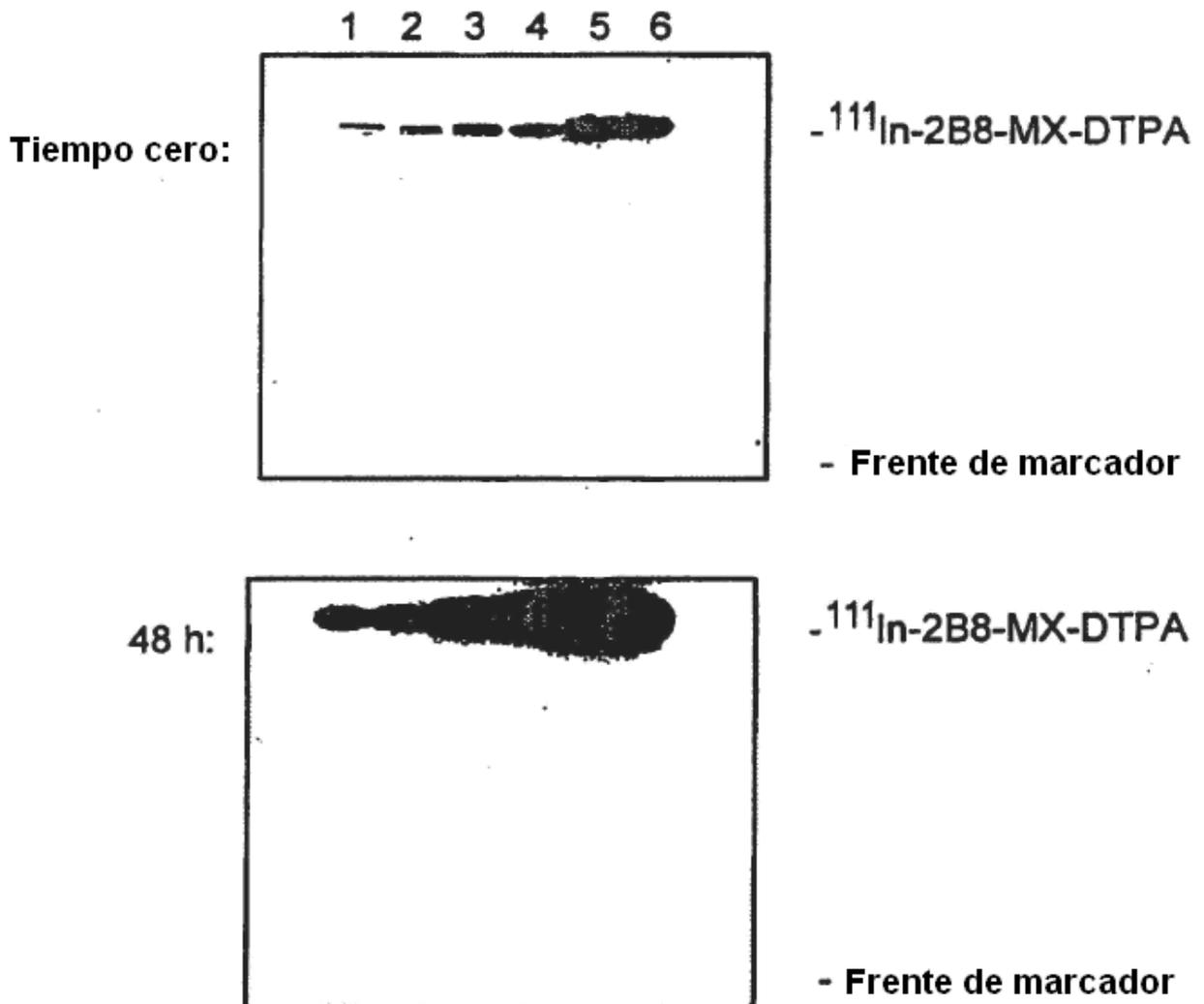


FIG. 11

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{111}In en PBS que Contiene
Albúmina de Suero Humano

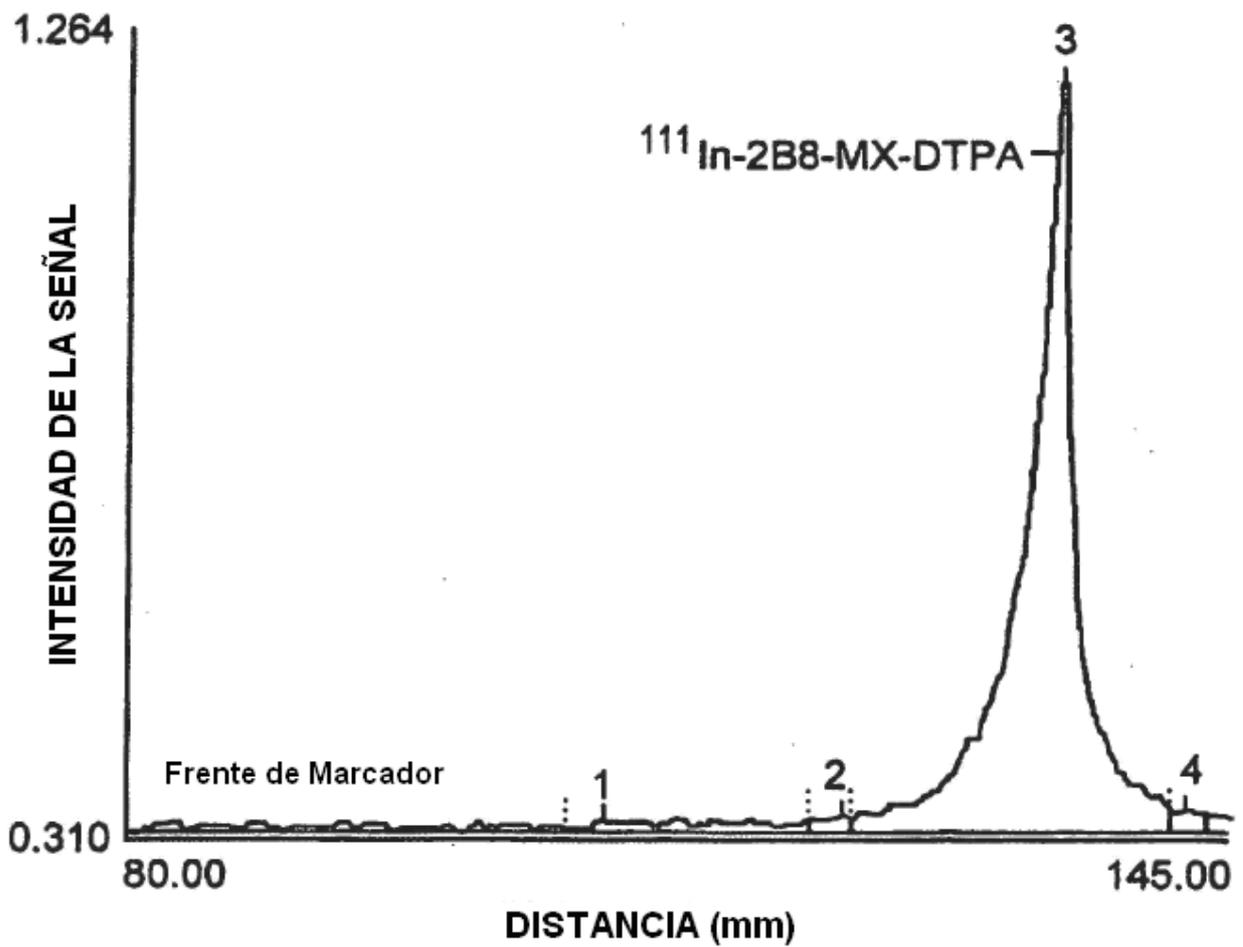


FIG. 12

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{111}In en PBS que Contiene
Albúmina de Suero Humano

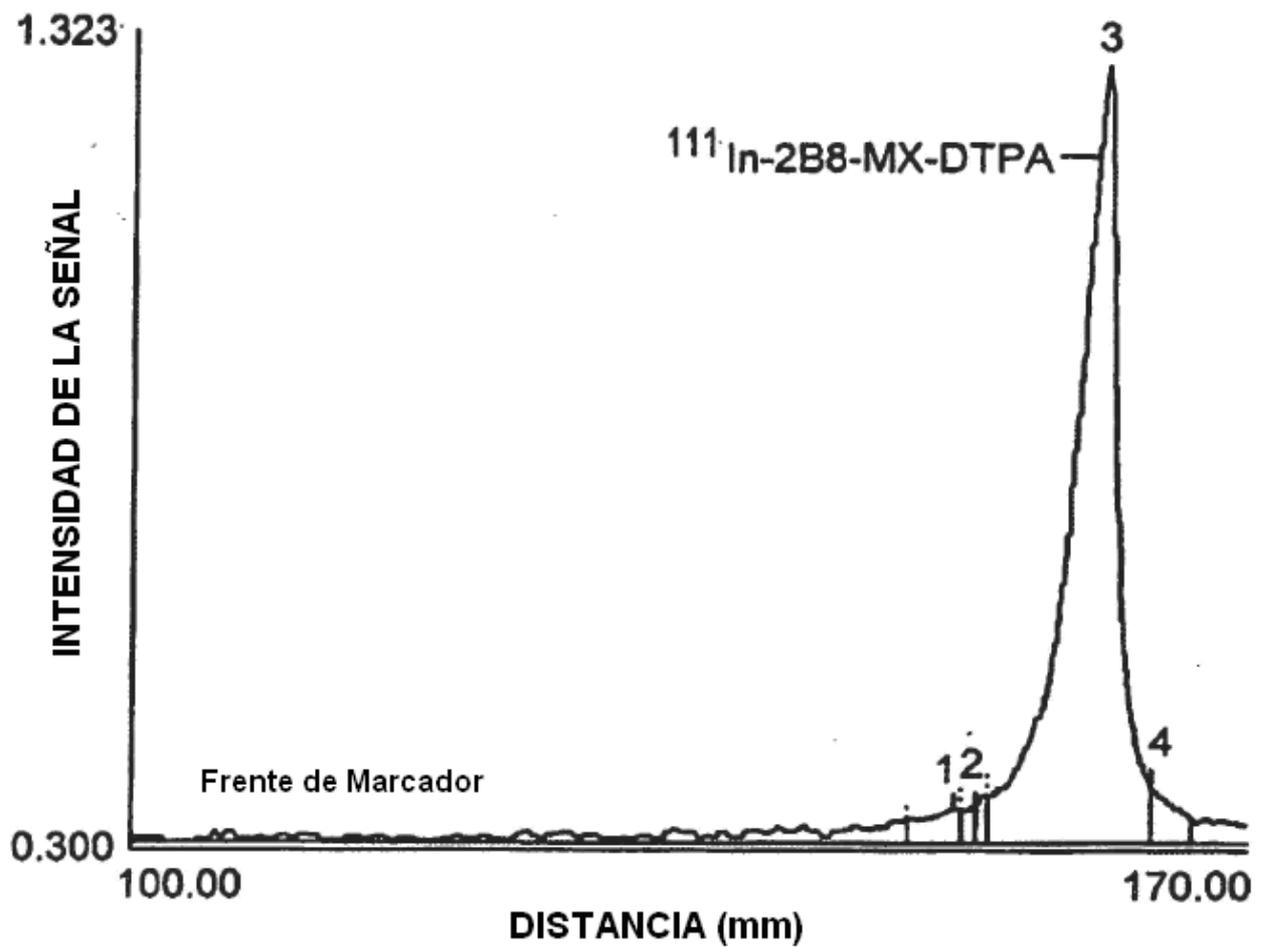


FIG. 13

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y Incubado en
Suero Humano

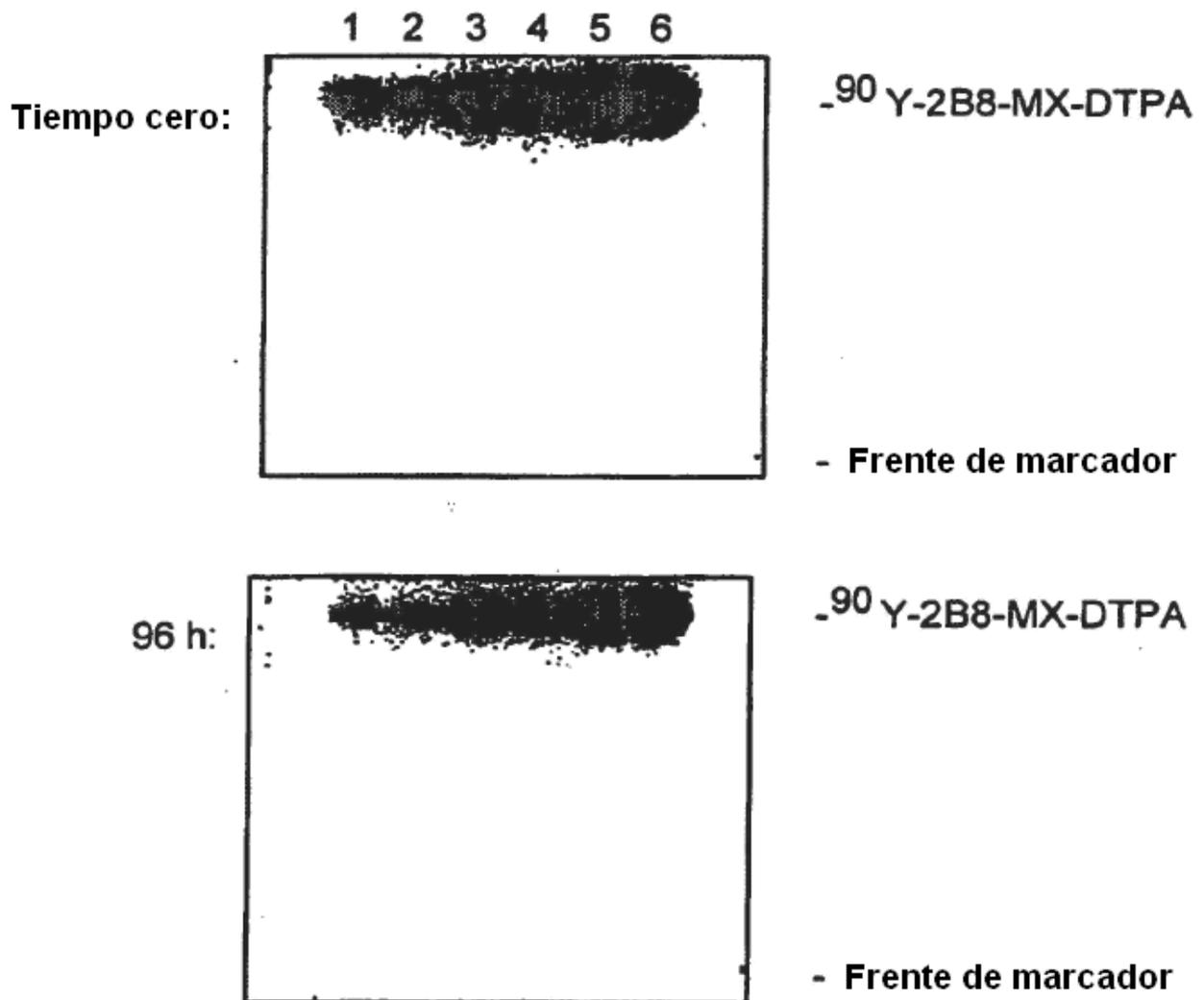


FIG. 14

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y Incubado en Suero Humano

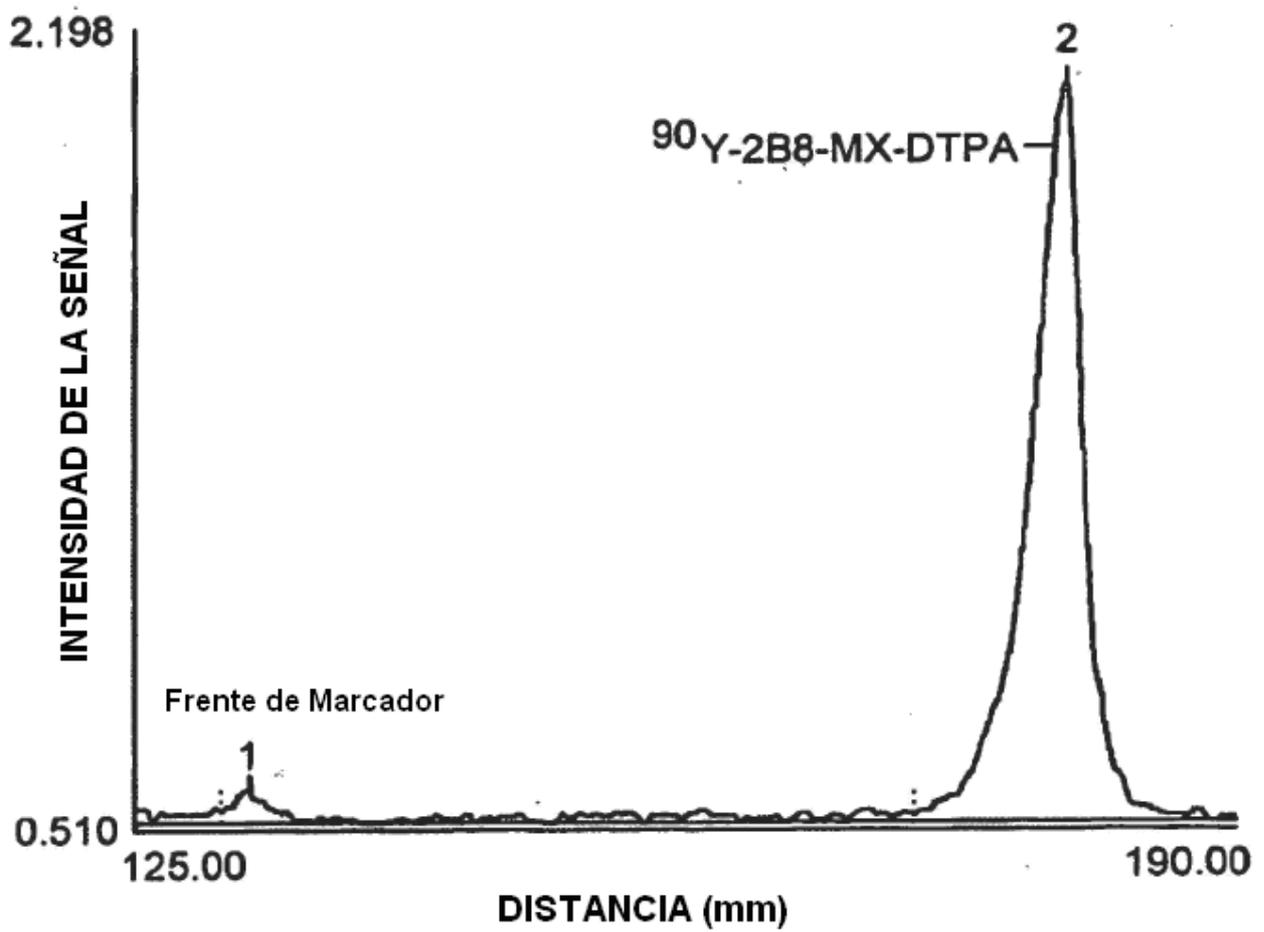


FIG. 15

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y Incubado en Suero Humano

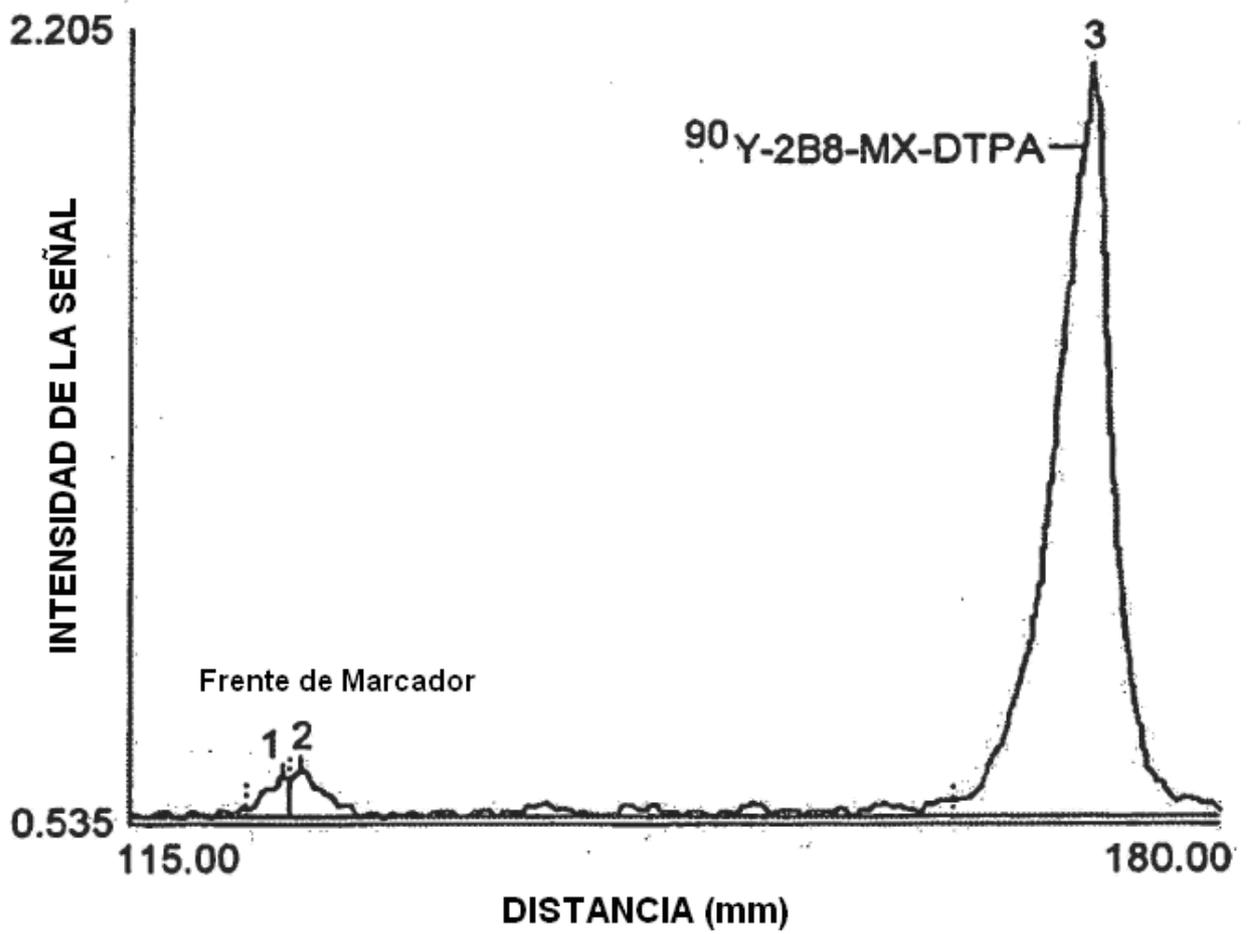


FIG. 16

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{111}In en PBS que Contiene
Albúmina de Suero Humano

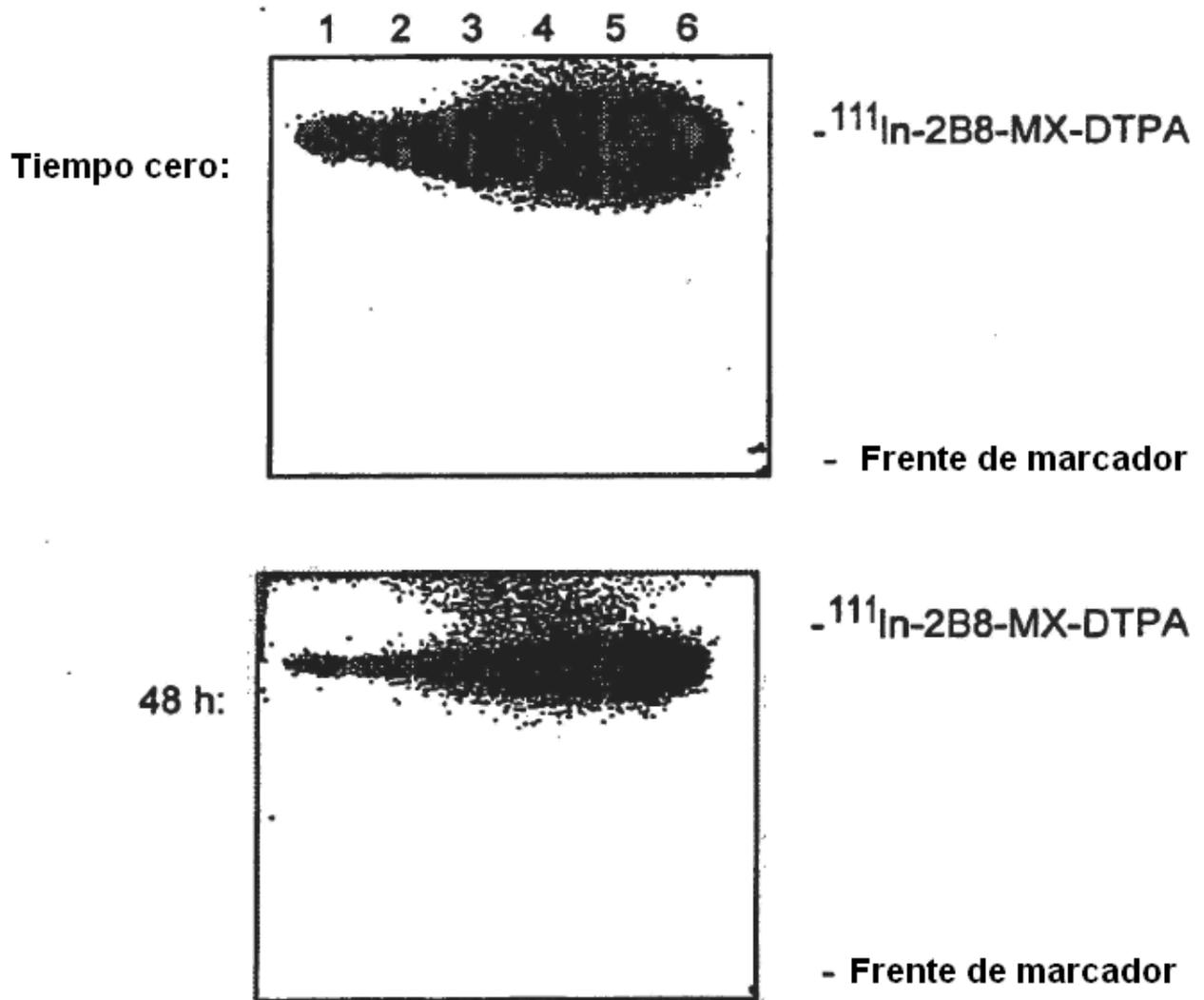


FIG. 17

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{111}In Incubado en Suero Humano

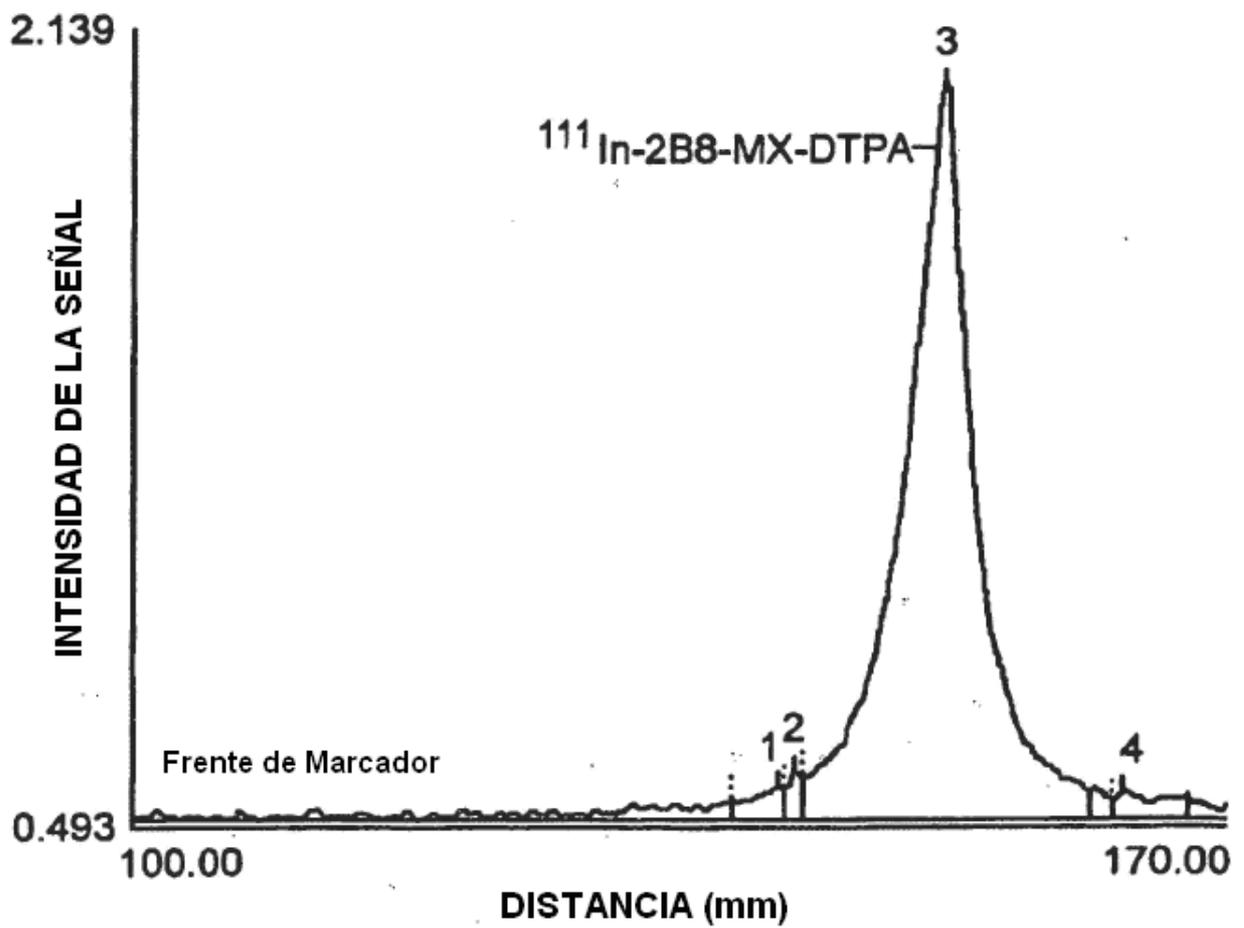


FIG. 18

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{111}In Incubado en Suero Humano

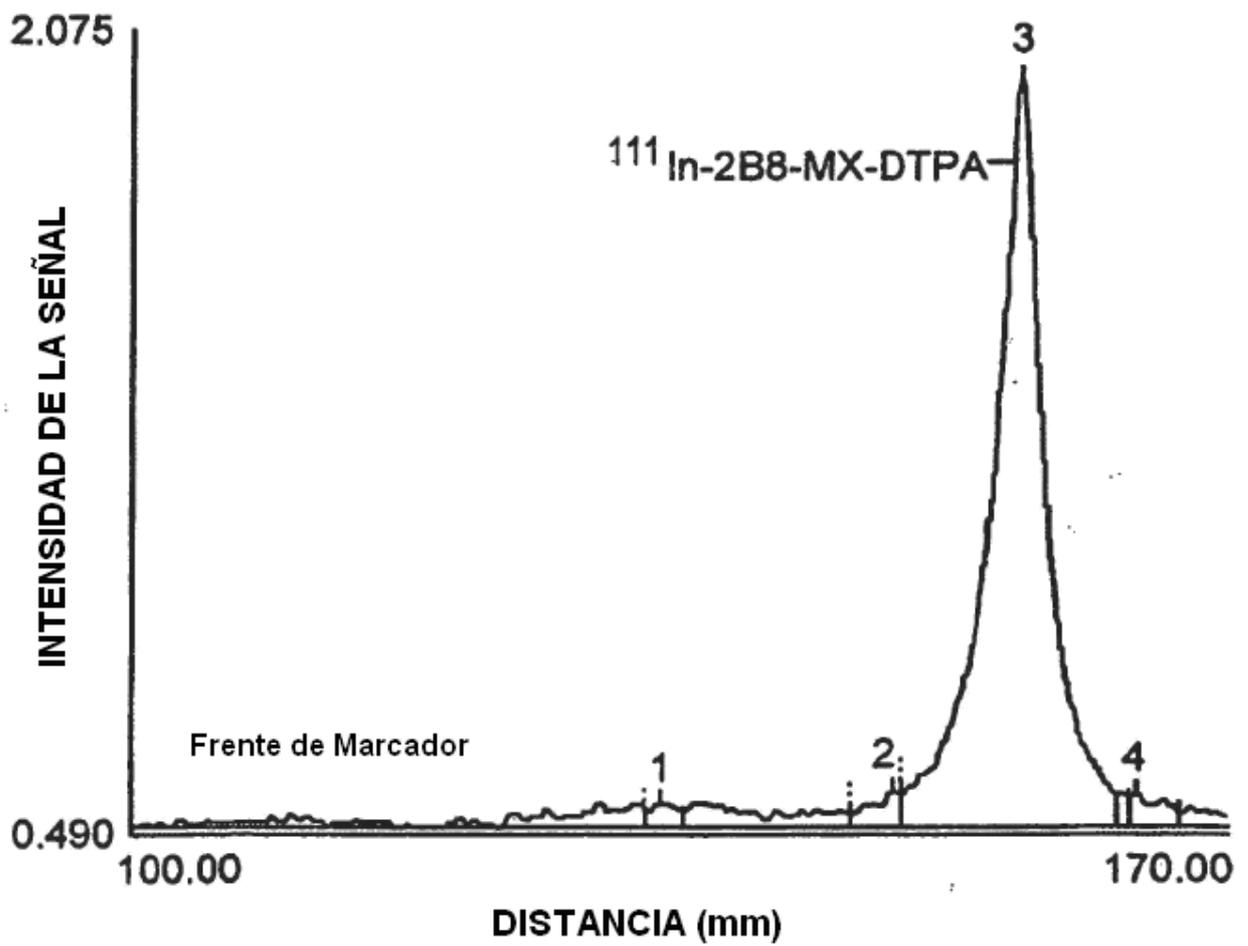


FIG. 19

Efecto de Infusión de 2B8 en Niveles de Linfocitos B en Monos Cinomolgus, Día 0 hasta Día 13

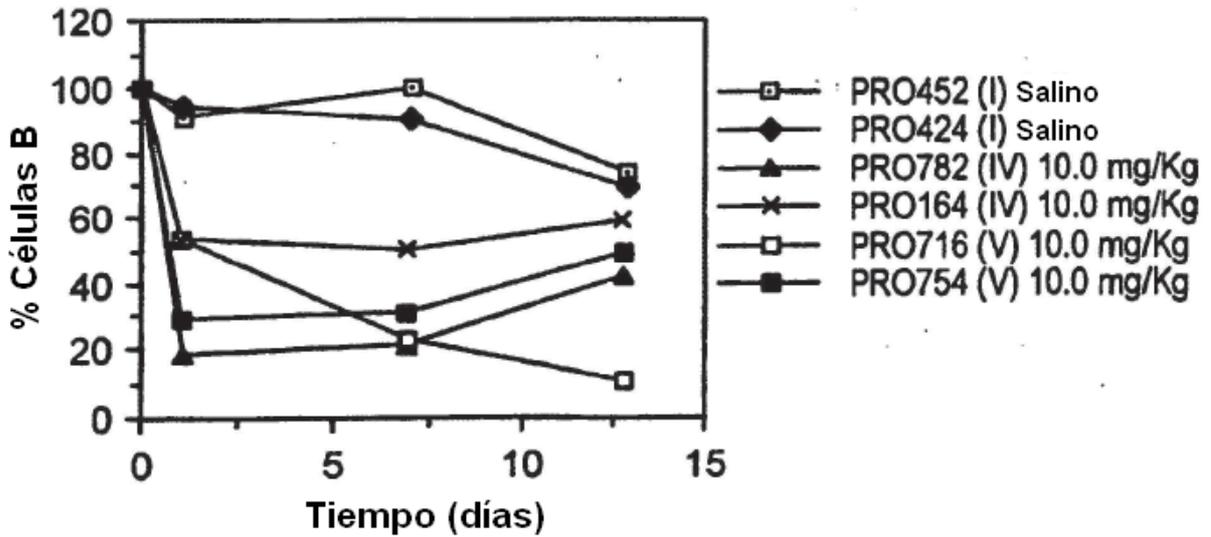
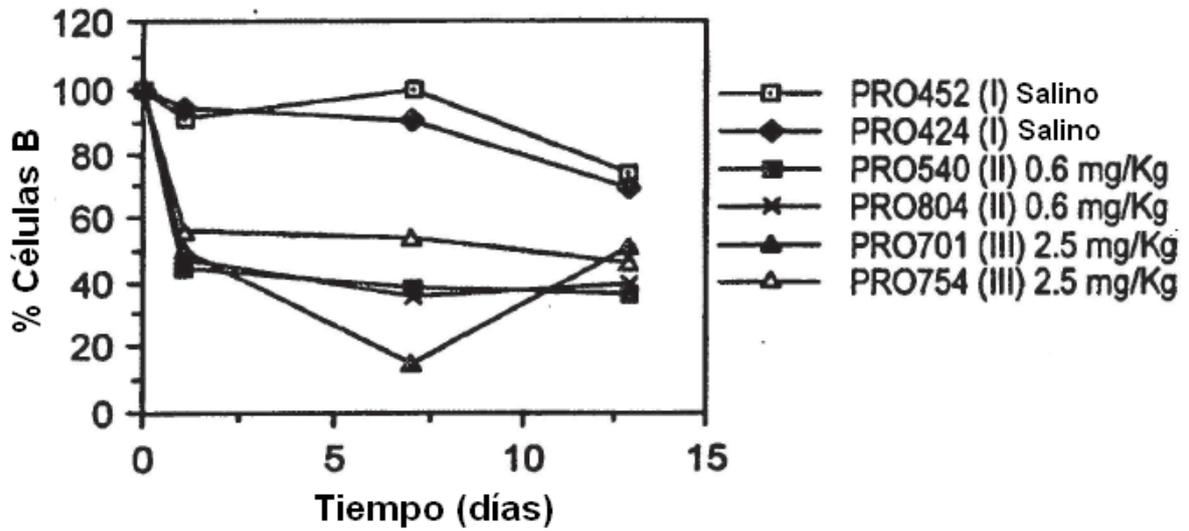


FIG. 20

Recuperación de Niveles de Células B Circulantes en Monos Cinomolgus a los que se Inyectó Anticuerpo Monoclonal Murino Anti-CD20 2B8

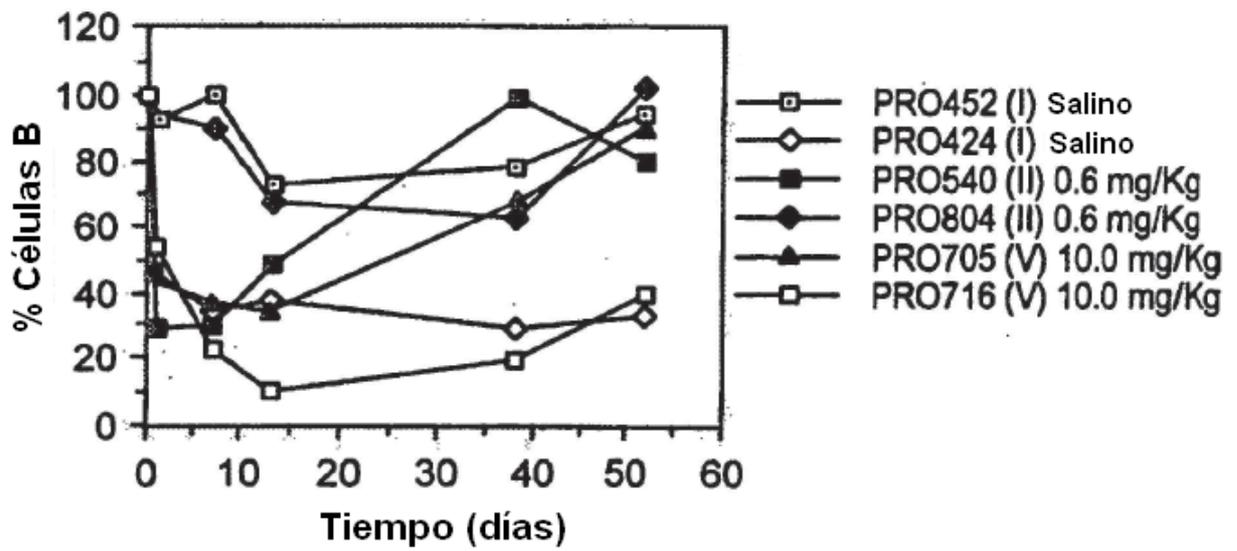


FIG. 21

Efecto de 2B8-MX-DTPA en Células B Circulantes en Monos Cinomolgus

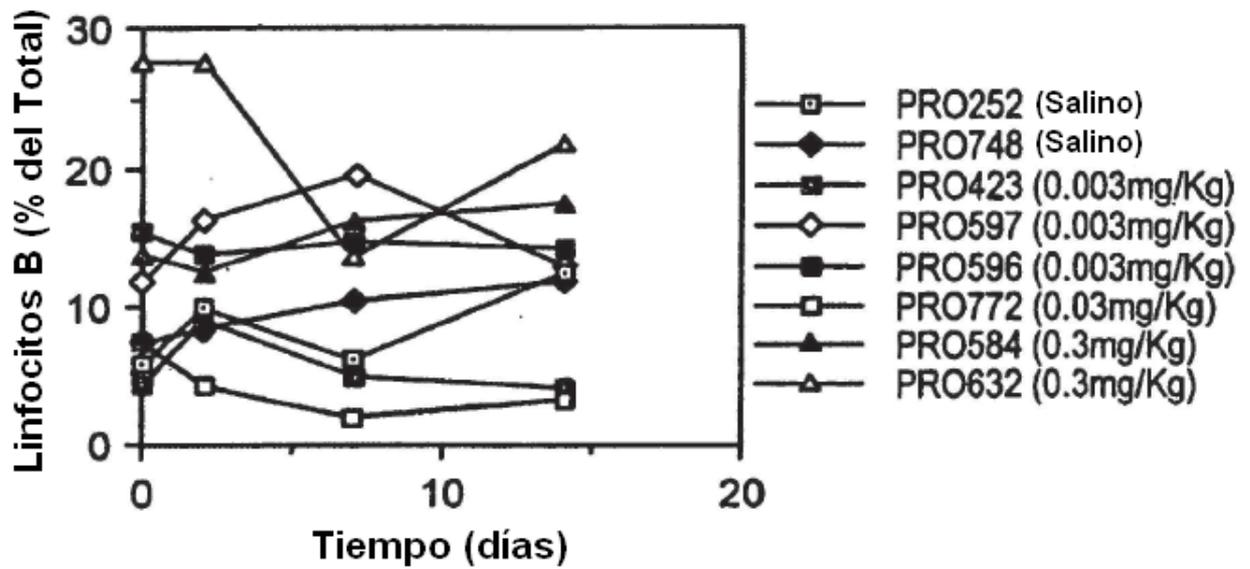


FIG. 22A

Aclaramiento de 2B8 de Monos Cinomolgus
Después de una Única Inyección de 10 mg/kg

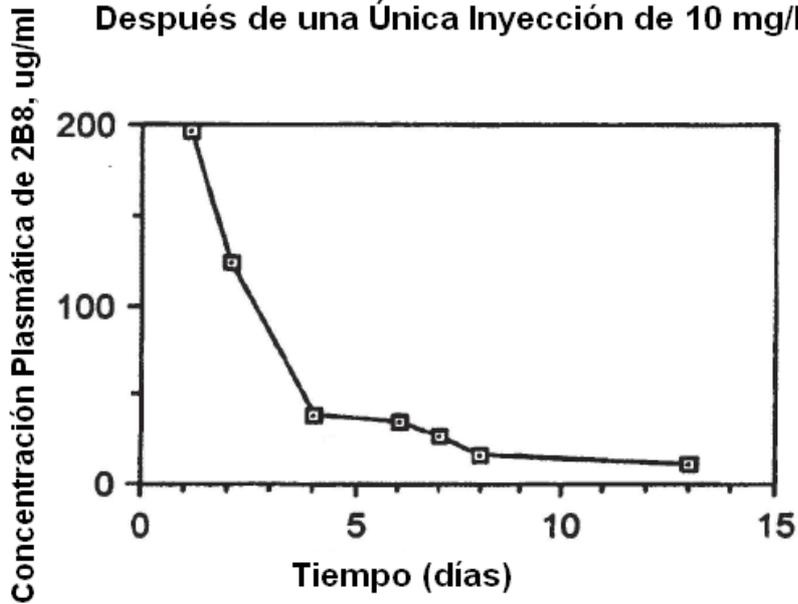


FIG. 22B

Aclaramiento Sanguíneo de 2B8,
2B8-MX-DTPA en Ratones BALB/c

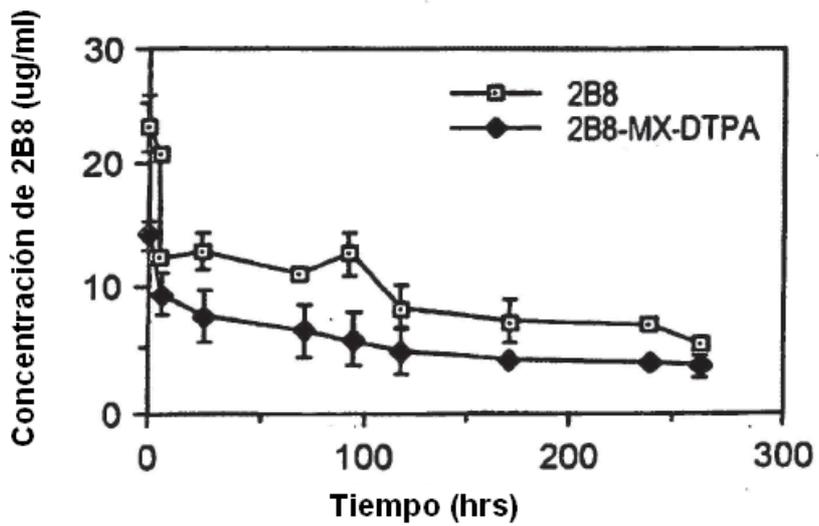


FIG. 23

Biodistribución de [111]-In-2B8-MX-DTPA

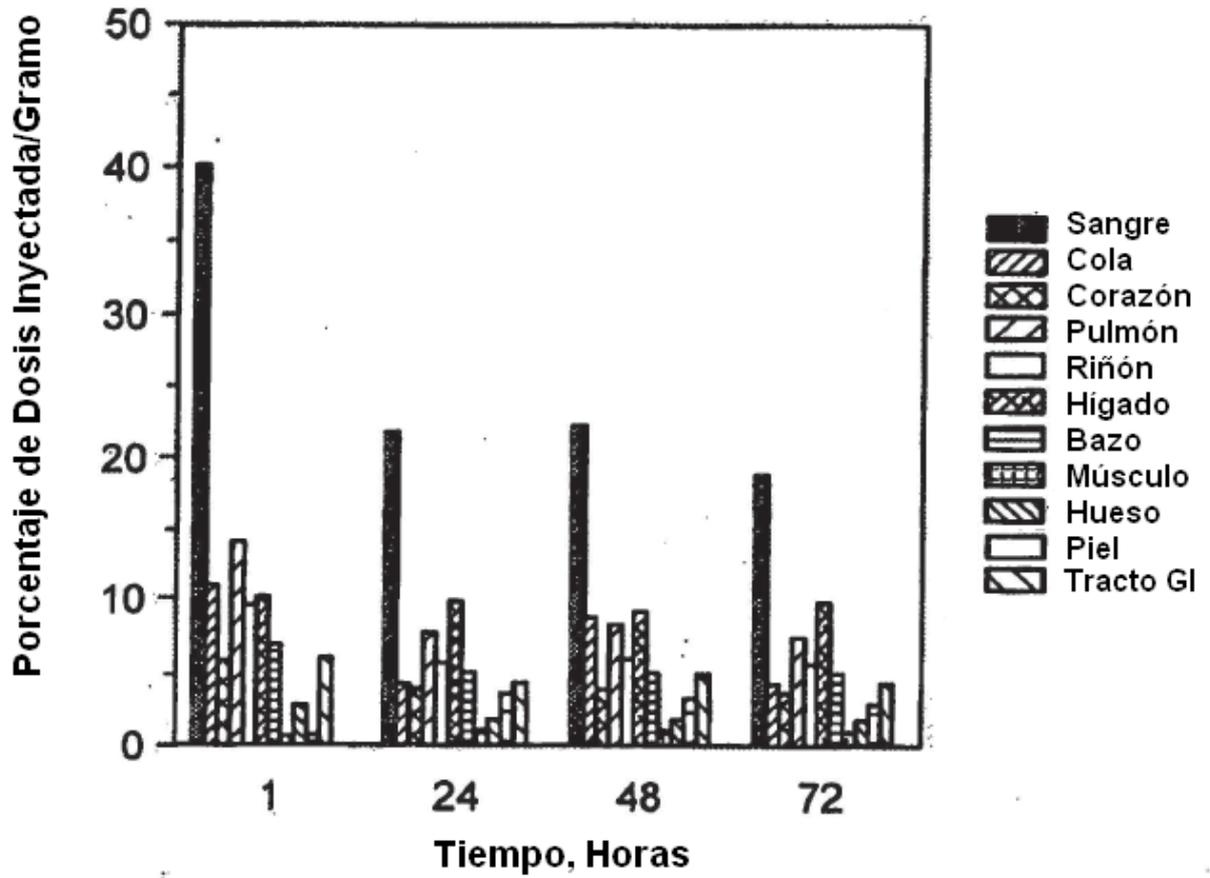


FIG. 24

Biodistribución de $[90\text{-Y-2B8-MX-DTPA}]$

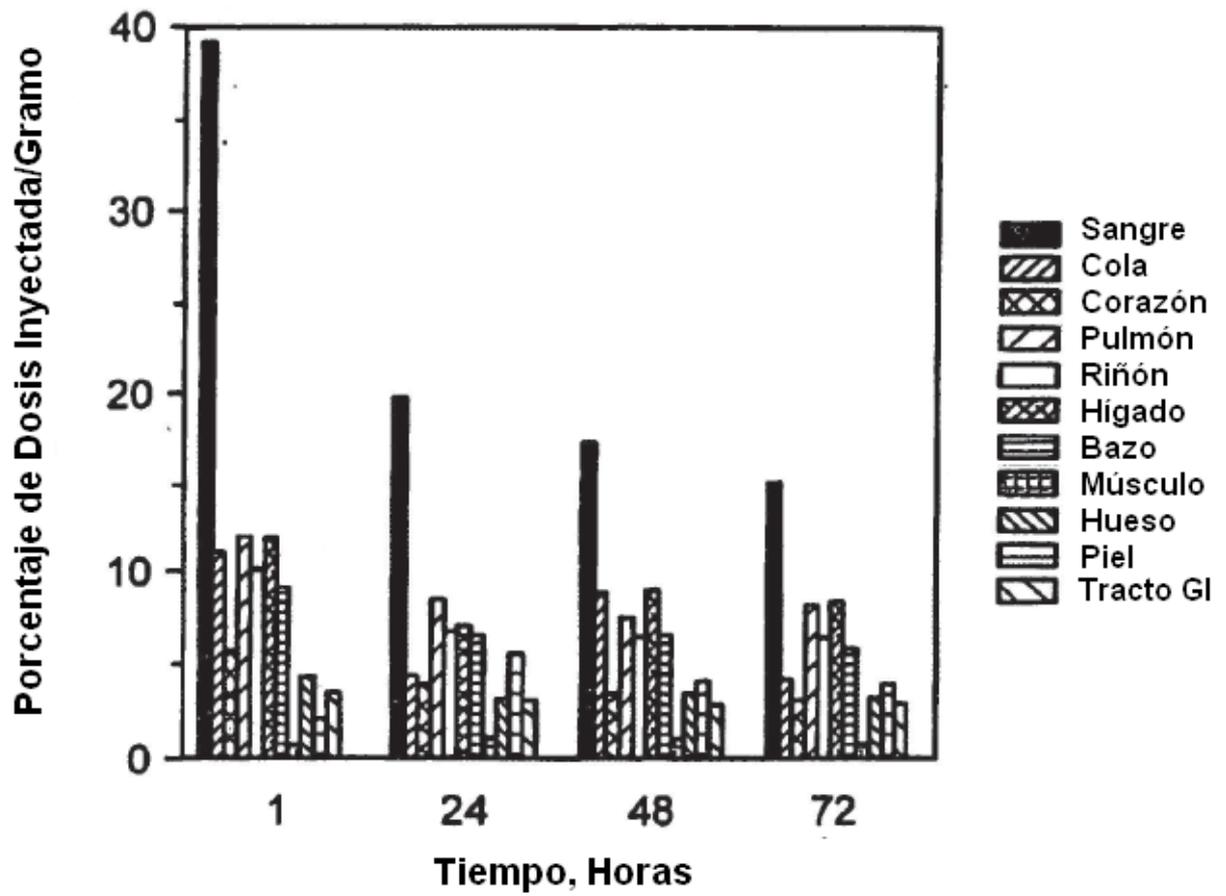


FIG. 25

Localización Tumoral de ^{111}In -2B8-MX-DTPA

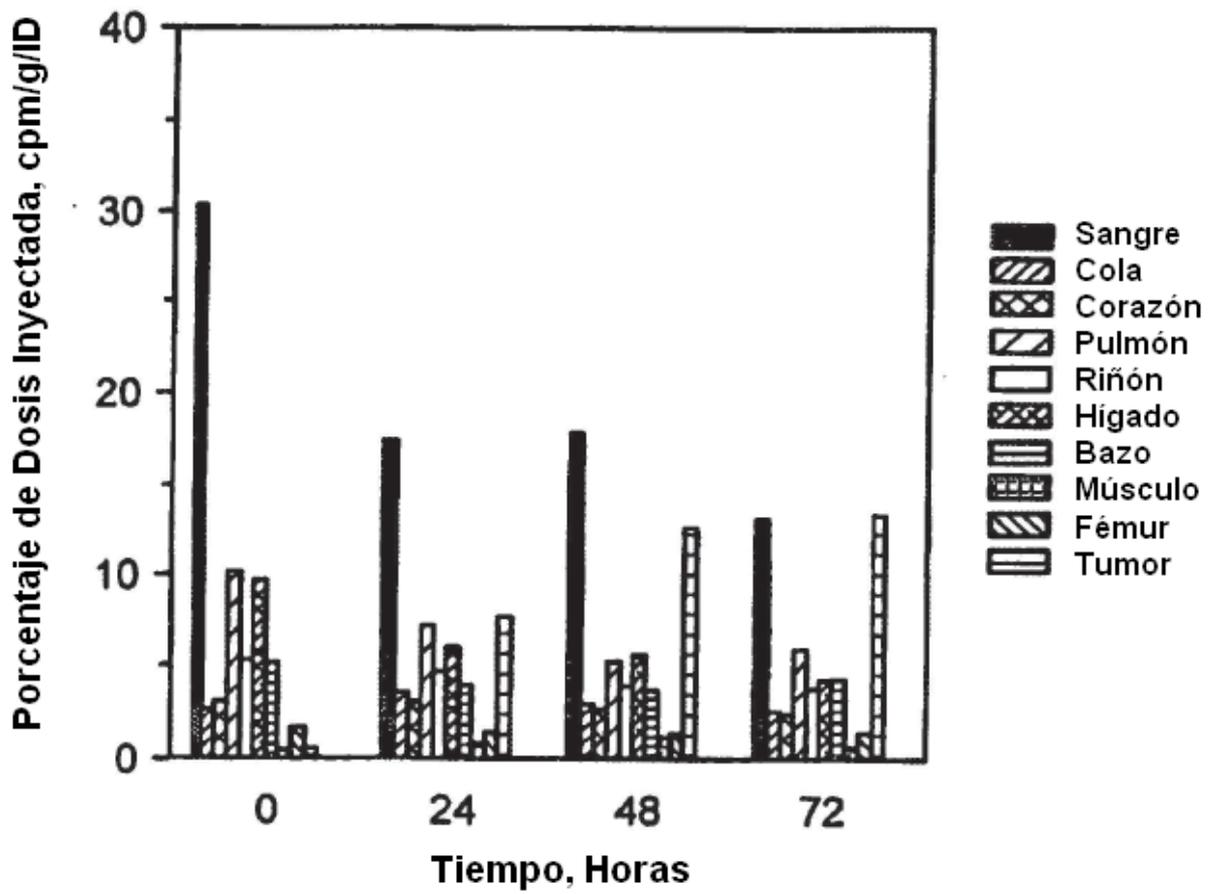


FIG. 26A

Unión de 2B8-MX-DTPA Marcado con ^{90}Y
a Células Humanas Positivas para CD20

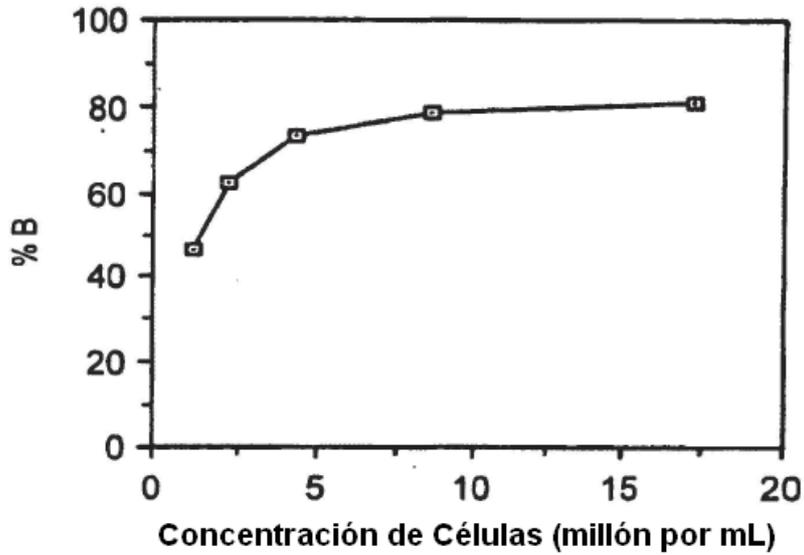


FIG. 26B

Unión de 2B8-MX-DTPA Marcado con ^{90}Y
a Células Humanas Positivas para CD20

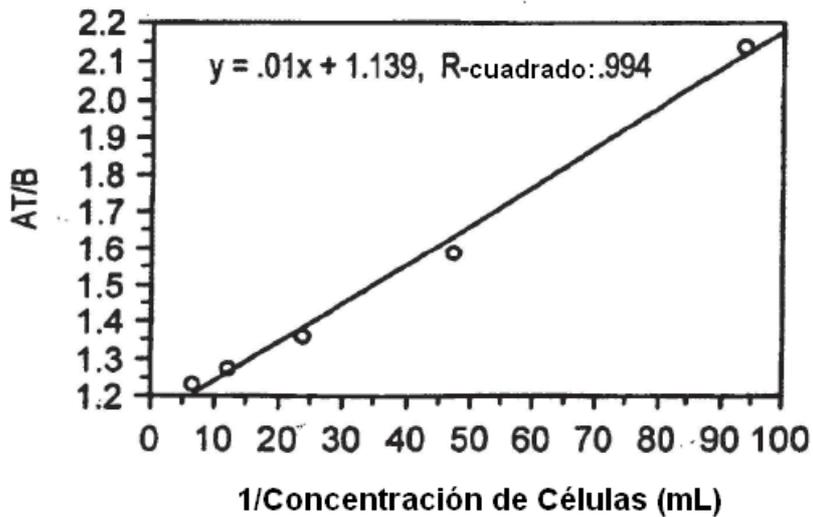


FIG. 27

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y en PBS que Contiene
Albúmina de Suero Humano y DTPA

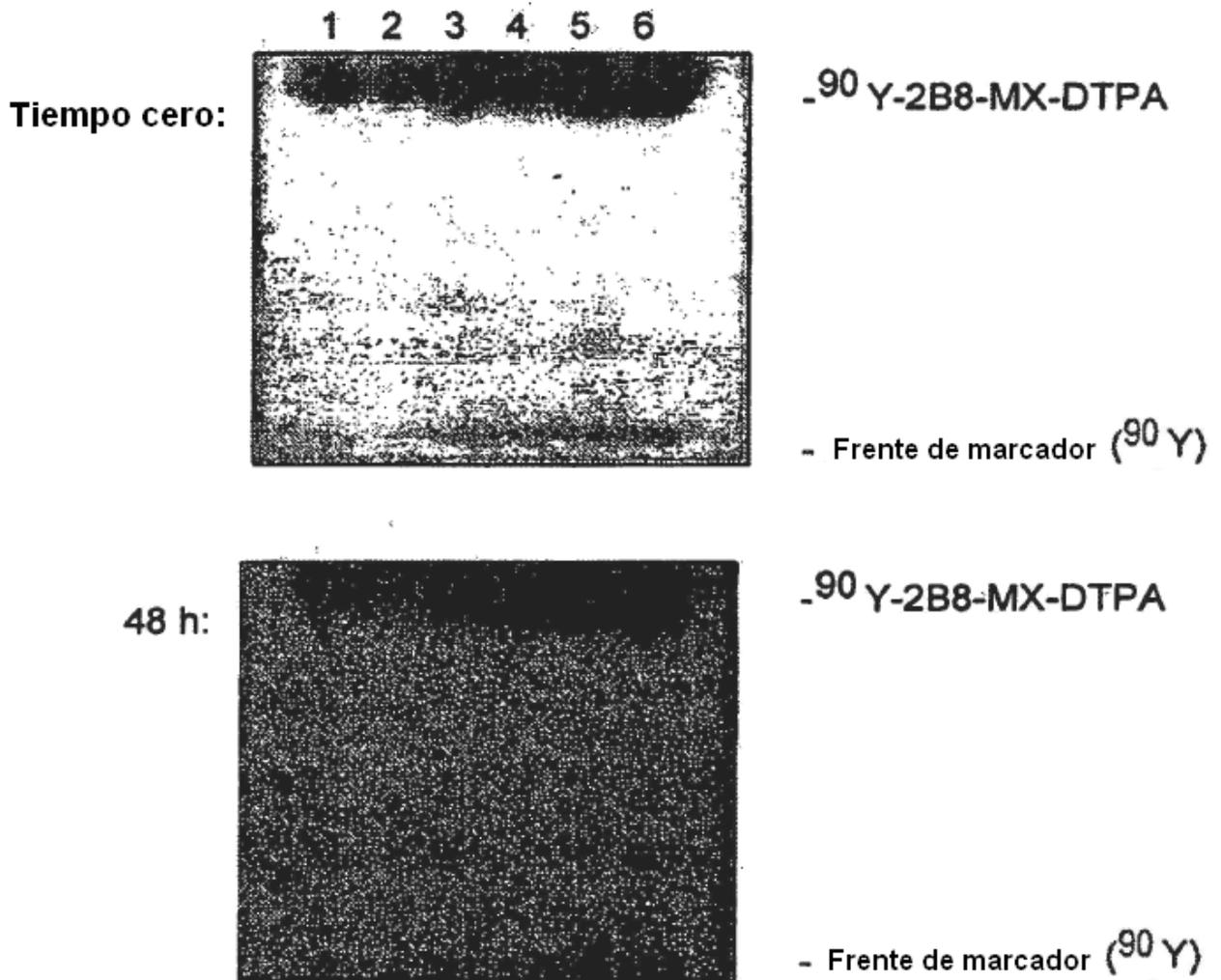


FIG. 28

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y en PBS que Contiene
Albúmina de Suero Humano y DTPA

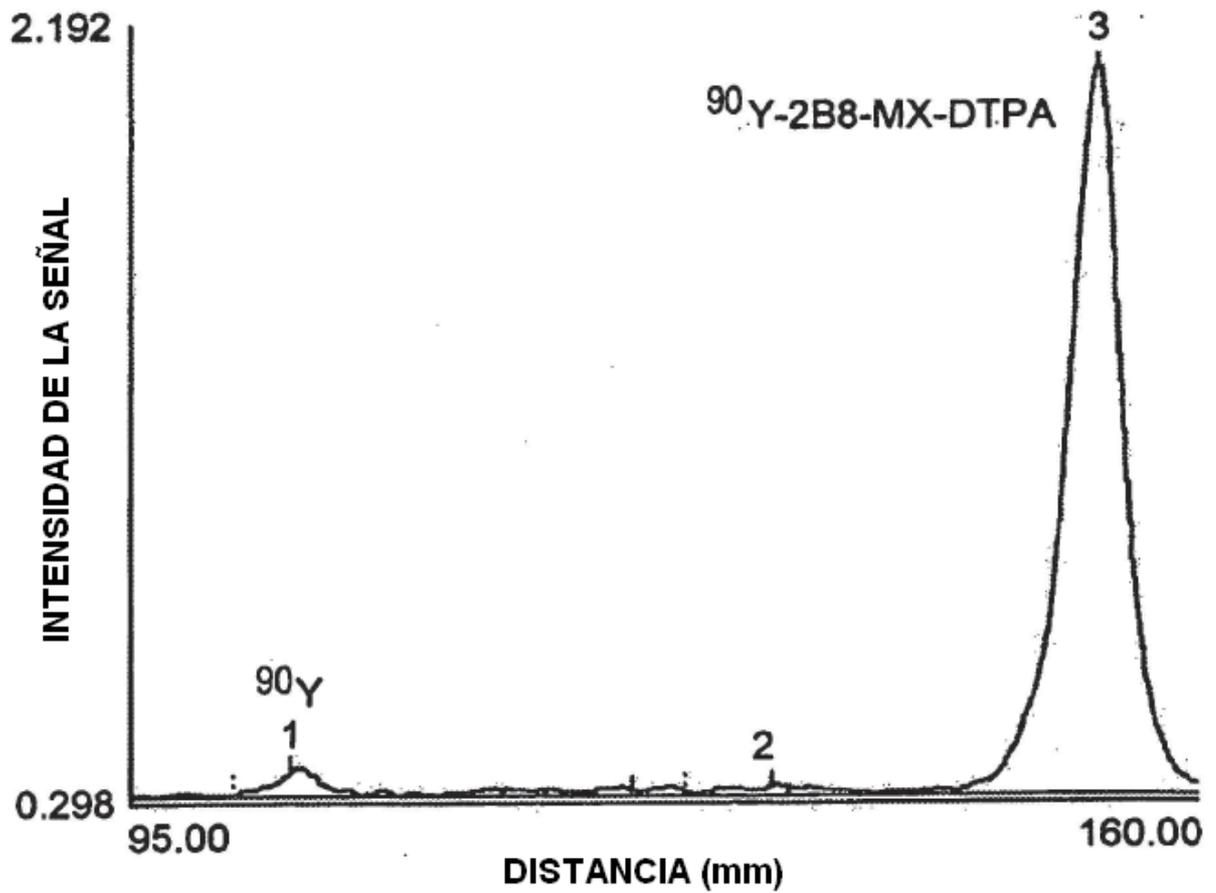


FIG. 29

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y en PBS que Contiene
Albúmina de Suero Humano y DTPA

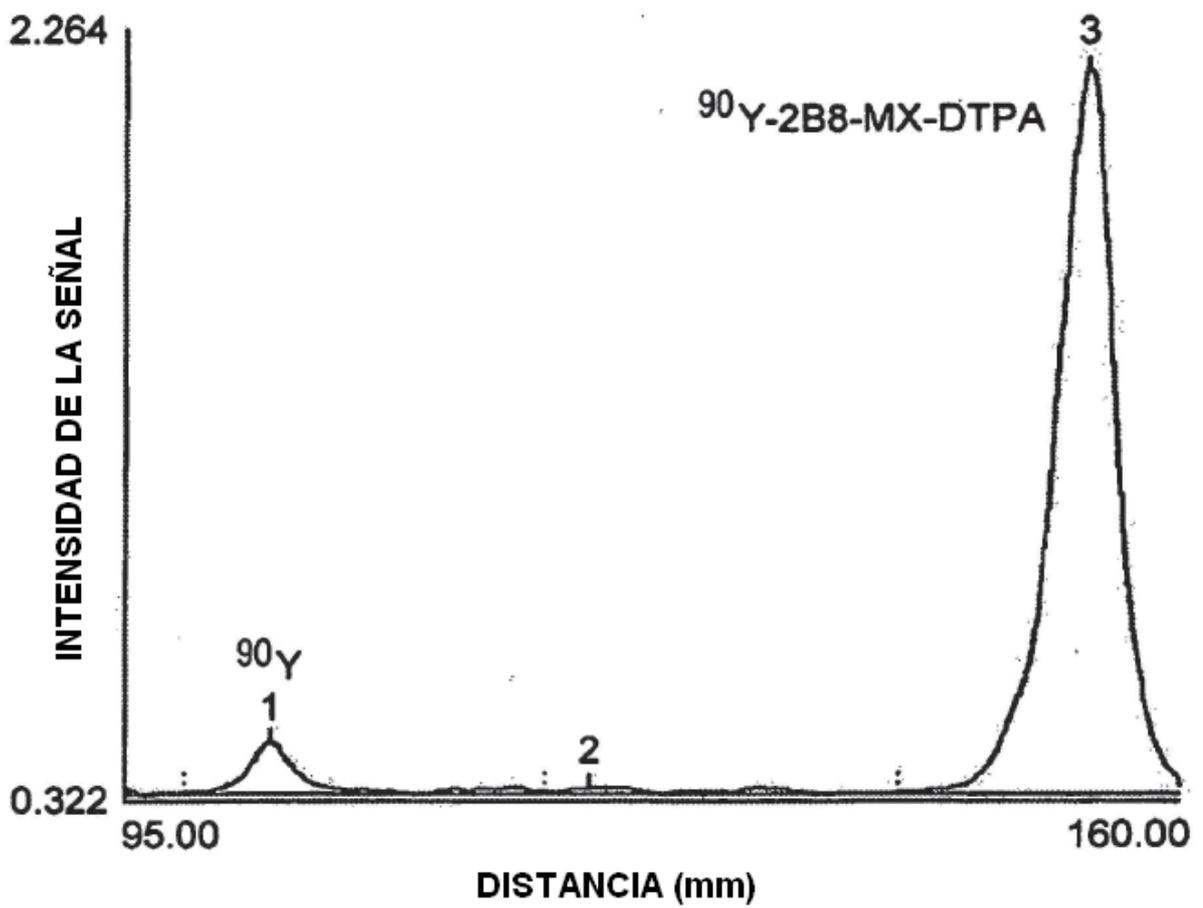


FIG. 30

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y Incubado en
Suero Humano

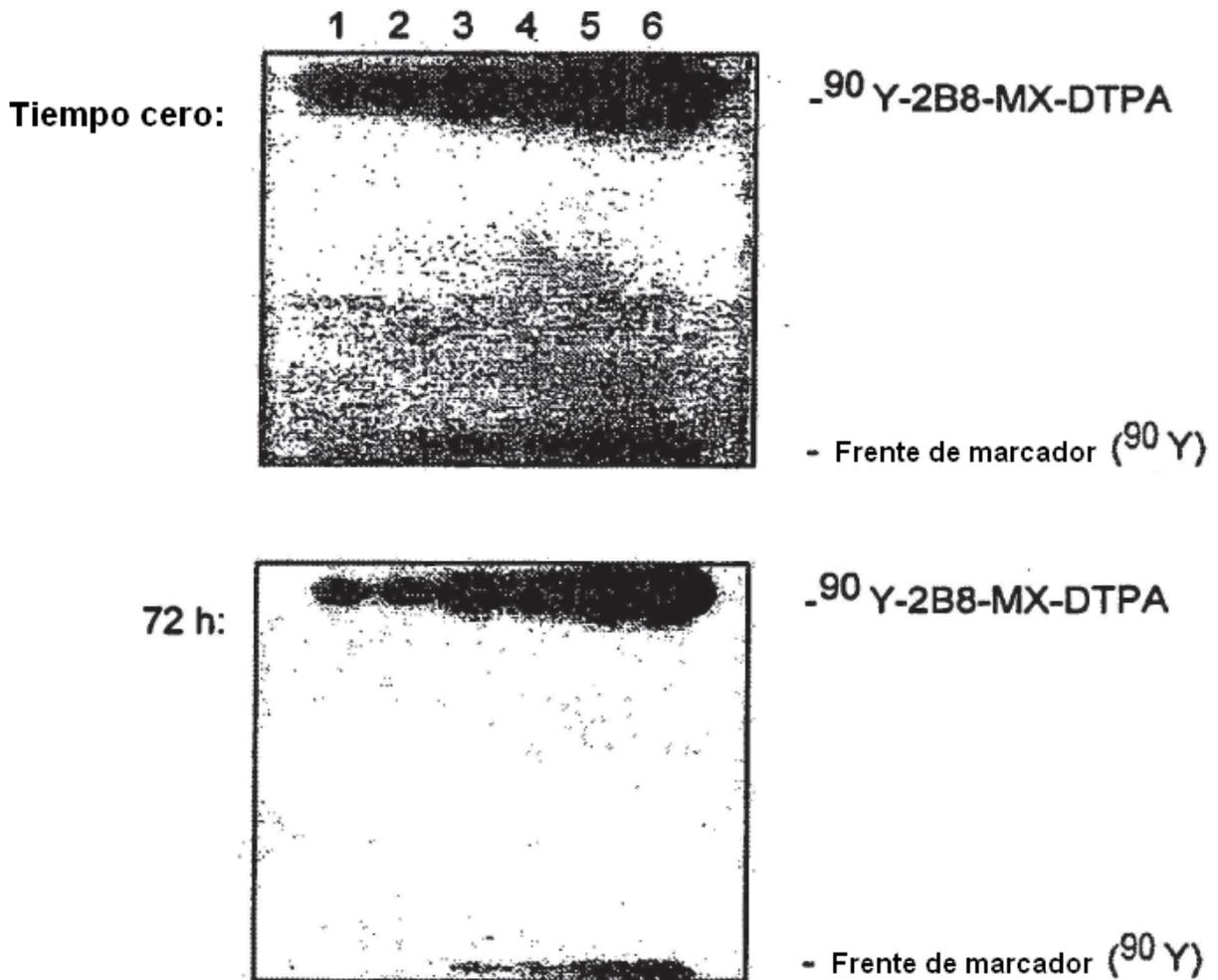


FIG. 31

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y Incubado en Suero Humano

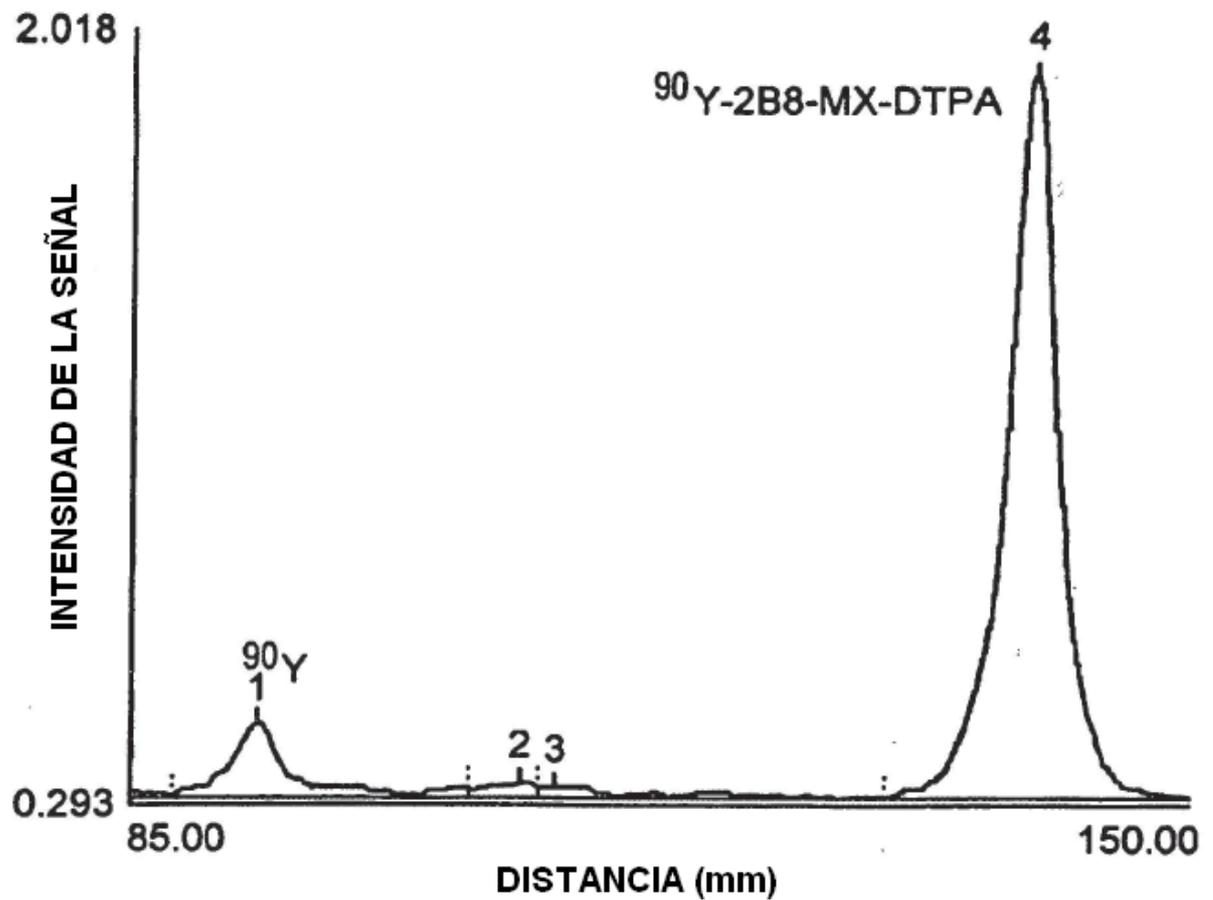


FIG. 32

Estabilidad *In Vitro* de 2B8-MX-DTPA
Marcado con ^{90}Y Incubado en Suero Humano

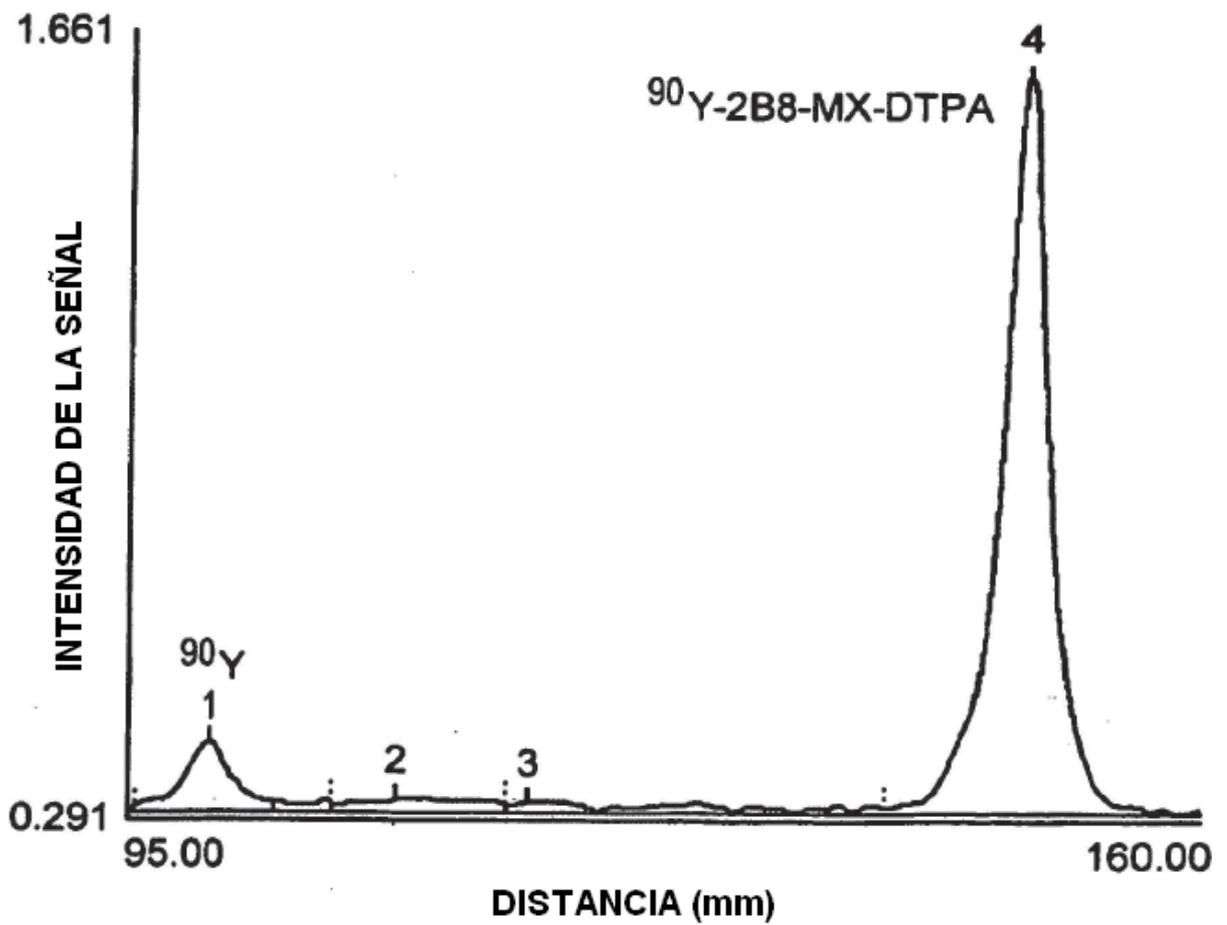


FIG. 33

Biodistribución de 2B8-MX-DTPA
 Marcado con ^{90}Y en Ratones

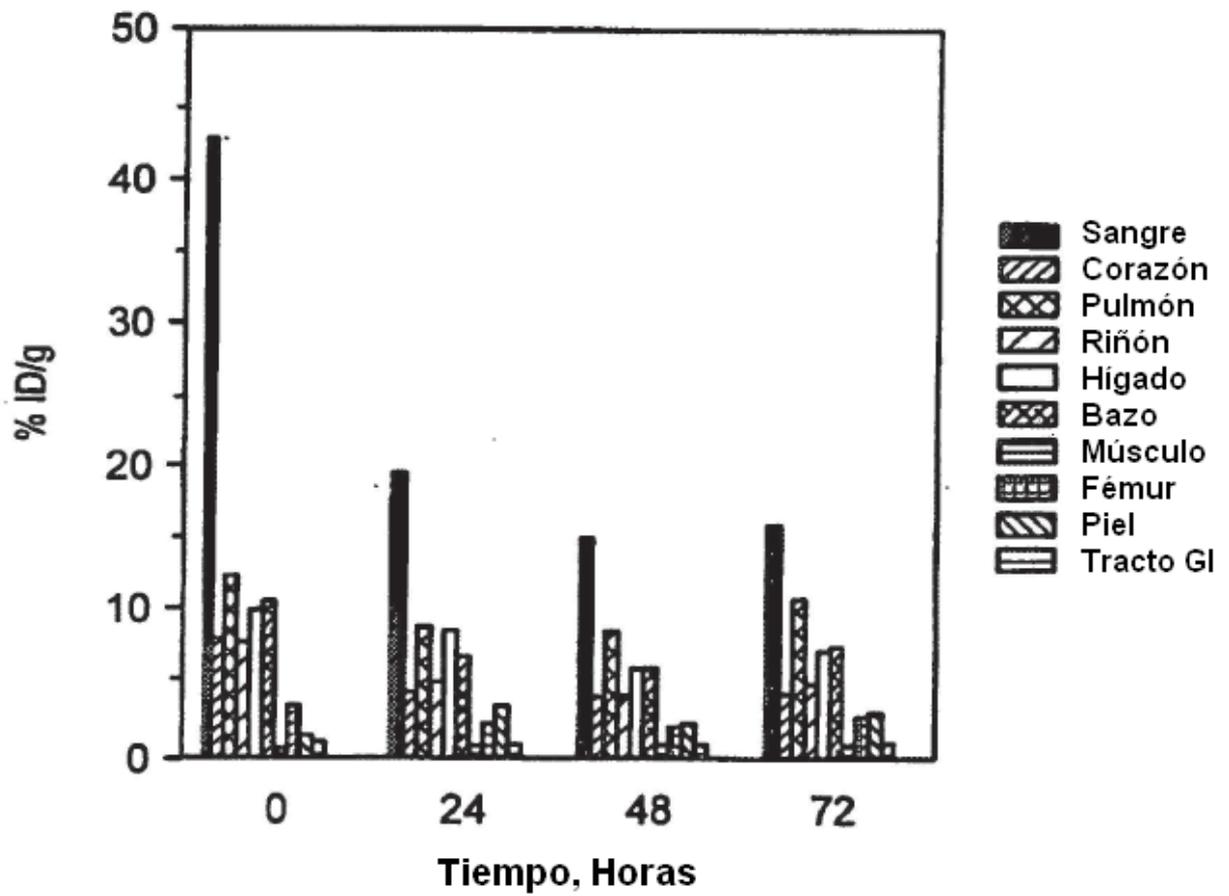


FIG. 34

Unión Directa de 2B8 Derivado de CHO a Células Humanas Positivas para CD20 y Negativas para CD20

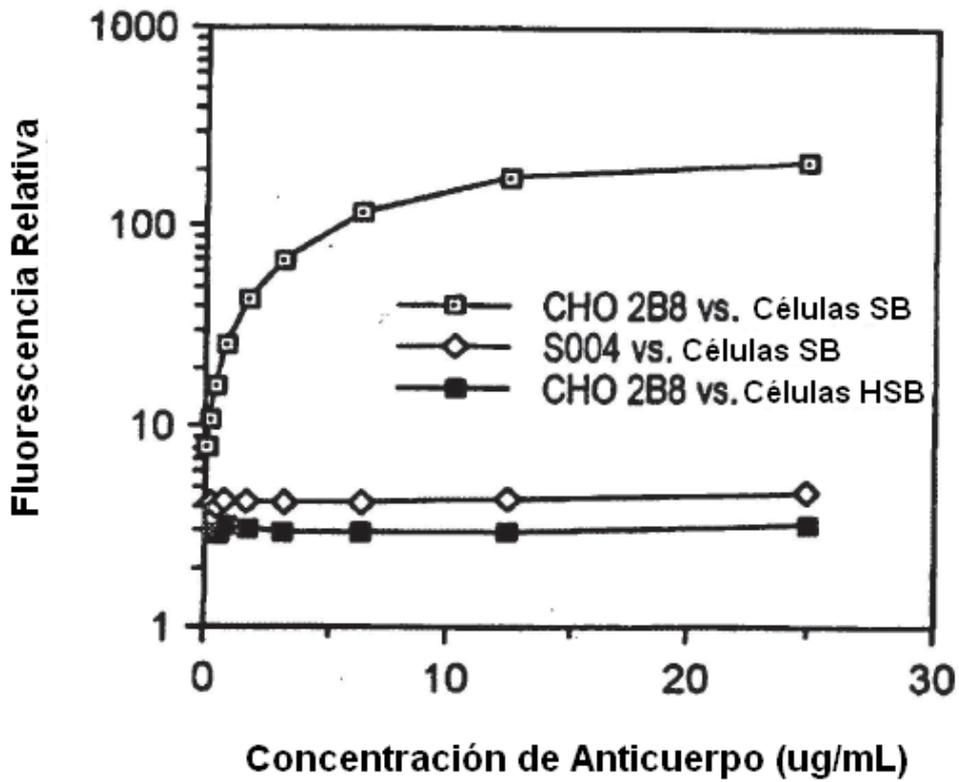


FIG. 35

Unión Competitiva de 2B8 Derivado de CHO a Células Humanas Positivas para CD20

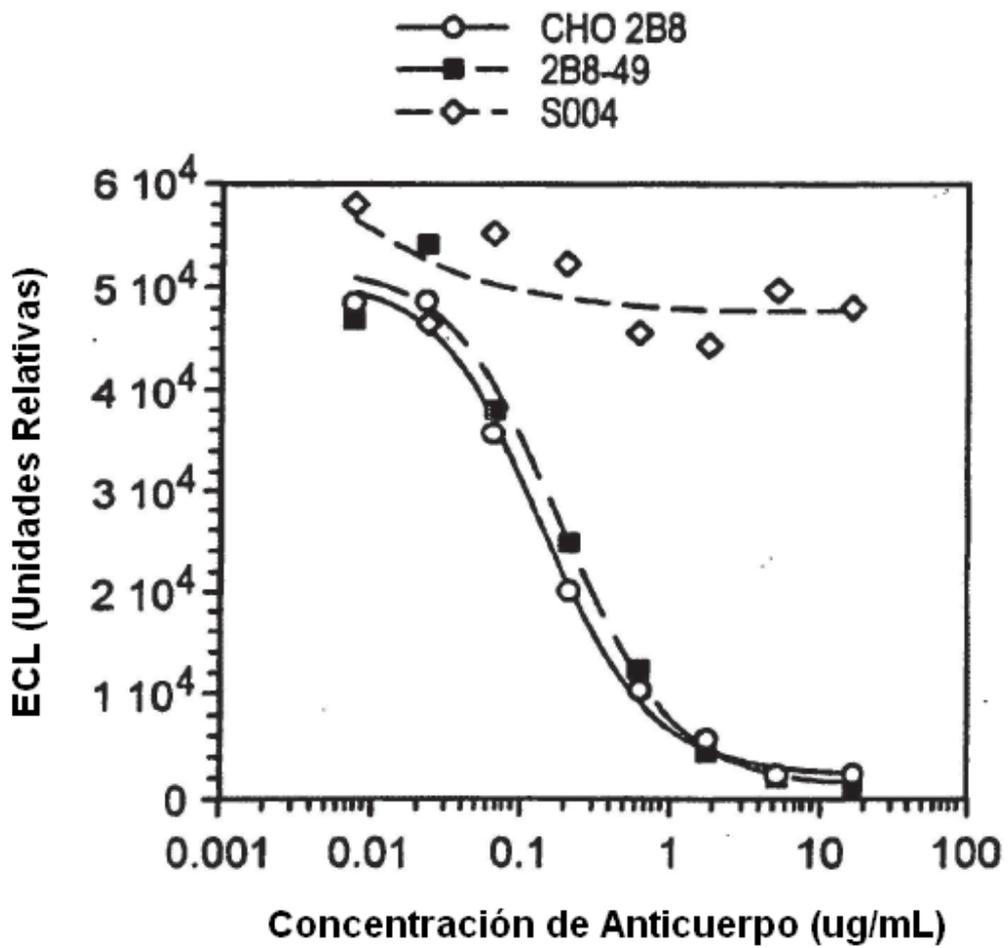


FIG. 36

Unión Competitiva de 2B8 y 2B8-MX-DTPA Derivado de CHO a Células Humanas Positivas para CD20

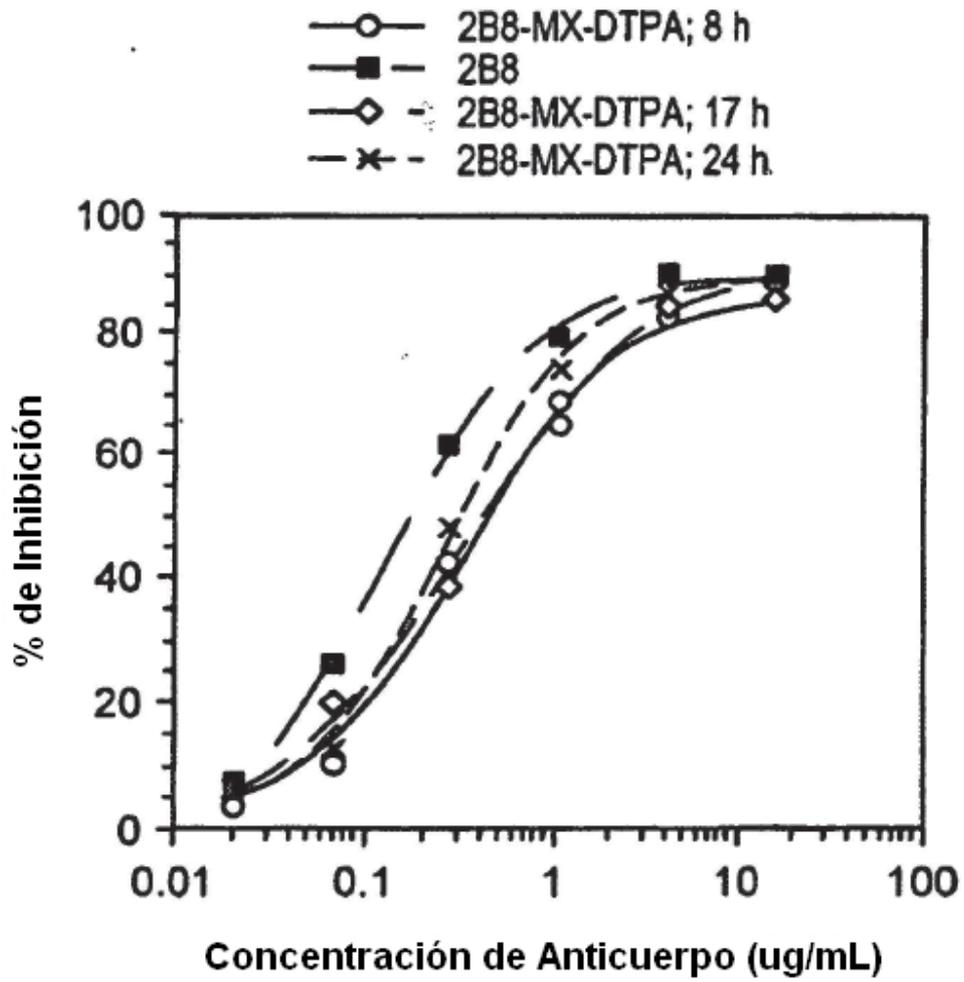


FIG. 37A

Unión de In2B8 Preparado de 2B8-MX-DTPA de CHO a Células Positivas para CD20

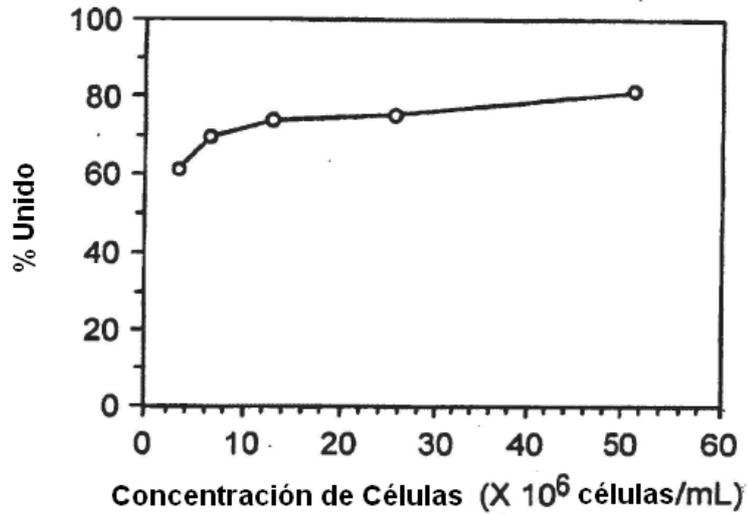


FIG. 37B

Unión de In2B8 Preparado de 2B8-MX-DTPA de CHO a Células Positivas para CD20

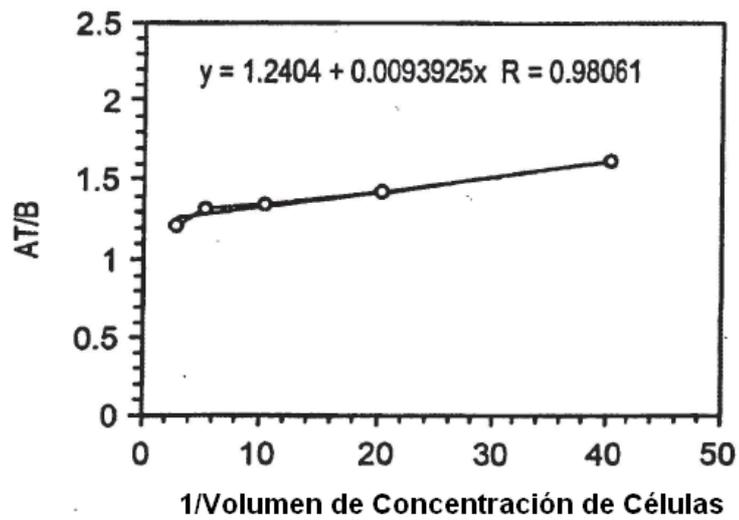


FIG. 38A

Unión de Y2B8 Preparado de 2B8-MX-DTPA de CHO a Células Positivas para CD20

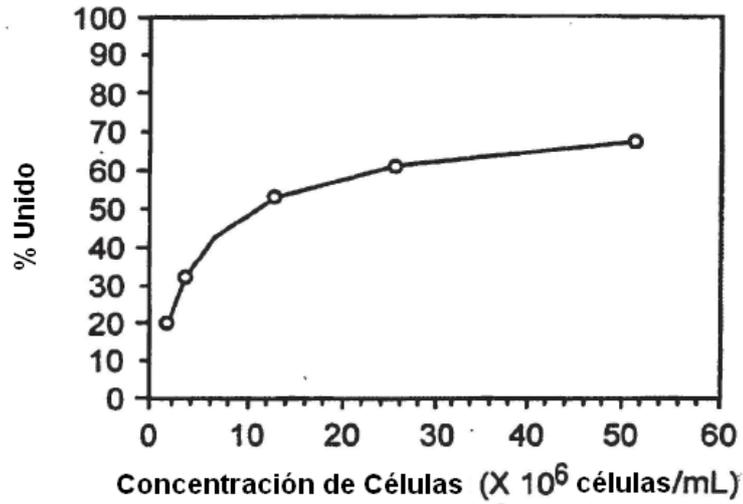


FIG. 38B

Unión de Y2B8 Preparado de 2B8-MX-DTPA de CHO a Células Positivas para CD20

