

# OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-034944-00010-0800

Fecha: 2011-04-11 16:55:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 523 RESPUESTA Folios: 159

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. \_\_\_\_\_ S. \_\_\_\_\_ D. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-034944-00010-0000

Fecha: 2011-04-11 16:55:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 523 RESPUESTA Folios: 160

Re: Expediente No. 06-034.944

Solicitud de patente de invención titulada: "RECONOCIMIENTO DIRIGIDO DE LA VASCULATURA TUMORAL USANDO EL ANTICUERPO L19 CONTRA ED-B DE FIBRONECTINA MARCADO RADIOACTIVAMENTE"

Solicitante: BAYER SCHERING PHARMA AG Y PHILOGEN S.P.A.

Nuestra Ref.: P2006/000064

**RESPUESTA AL OFICIO No. 00643, NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 11**  
**DE FECHA 14 DE ENERO DE 2011**  
**(PRIMER EXAMEN DE FONDO)**

Yo, CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, reasumiendo el poder a mi conferido por las sociedades Bayer Schering Pharma Ag y Philogen S.P.A. (adjunto copia simple para su inmediata referencia) me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal de prórroga previsto en el artículo 45 de la Decisión 486:

1. a- En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la presente solicitud, me permito adjuntar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio radicado al momento de presentar la solicitud.

Así entonces, el Capítulo Reivindicatorio Modificado ha sido limitado para definir específicamente una molécula de anticuerpo, lo anterior encuentra soporte en la página 16 y en el segundo párrafo de la página 17. De la misma forma, se ha limitado la Reivindicación 1 para especificar todos los CDR's de cadena liviana y pesada de dicha molécula de anticuerpo, y se ha eliminado la mención de la molécula IgG1. Se han eliminado las Reivindicaciones 5, 9, 10, 17, 20 y 22-28, así como las reivindicaciones restantes se han modificado de acuerdo con las limitaciones realizadas.

# OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Por último, se adicionado la nueva Reivindicación 17, que define una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos de la invención y un excipiente, de acuerdo con el Capítulo Descriptivo, página 15.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas al Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud inicial, por el contrario, éstas corresponden a una franca limitación de la materia reivindicada.

b- Adicionalmente, se han detectado errores involuntarios en la memoria descriptiva, los cuales han sido corregidos en la página 10 y en el nuevo listado de secuencias

Con respecto a la página 10, la solicitante ha detectado un error en la definición de las secuencias correspondientes a los CDRs de cadena liviana de L19, dado que se repiten las secuencias ID 1, 2 y 3 (que corresponden tal como puede ser visto en el mismo párrafo, a las secuencias de CDRs de cadena pesada de L19). Esto también puede ser corroborado en la Reivindicación 1 original. De esta manera, las secuencias de los CDRs de cadena liviana de L19 han sido corregidas para establecer las secuencias ID 4, 5 y 6. Tal como podrá ser notado, la necesidad de esta corrección sería inmediatamente evidente para una persona versada en la materia, con lo cual no resulta en una modificación de la materia divulgada originalmente.

Respecto al listado de secuencias, la solicitante ha detectado que una de las secuencias comprendía un error involuntario. Específicamente, la secuencia ID 6 que muestra la secuencia del CDR3 de la cadena liviana de L19 incluye un residuo de cisteína adicional en su comienzo. La declaración adjunta del Dr. Alessandro Pini explica por qué sería inmediatamente obvio para una persona versada en la materia que el CDR3 de cadena liviana de L19 no debería incluir este residuo extra de cisteína. De esta manera, en el nuevo listado de secuencias ha sido eliminado el residuo extra de cisteína N-terminal de la secuencia ID 6. Asimismo, el nuevo listado de secuencias ahora incluye las secuencias de aminoácidos ID 14 y 15 que corresponden a los dominios de cadena pesada y liviana de L19 respectivamente.

La incorporación de las secuencias de los dominos de VH y VL de L19 en la presente solicitud no agrega materia adicional, dado que las secuencias de estos dominios son definidos de manera

# OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

precisa y resultan identificables de la divulgación Pini et al., 1998, la cual es citada en la presente solicitud (ver página 9), tal como se expone en la declaración adjunta del Dr. Alessandro Pini, el primer autor de Pini et al. Aunque la declaración del Dr. Pini fue preparada para un caso relacionado, las conclusiones resultan totalmente aplicables en la presente solicitud.

2. a- El Examinador señala que las Reivindicaciones 22-28 no son patentables puesto que reclaman usos y métodos de tratamiento.

b- Considero superada la anterior objeción en tanto las Reivindicaciones 22-28 han sido eliminadas del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto.

3. a- El Examinador argumenta que las reivindicaciones no son claras ni concisas, puesto que no son claros los elementos que componen el “elemento “elemento de unión específico” reivindicado. De la misma forma, el Examinador señala que aparentemente la inclusión de los isótopos no es caracterizante. El Examinador recomienda definir el producto principal como un anticuerpo, junto con sus elementos y estructuras de cada uno (la SEQ de cada región CDR), así como omitir la inclusión de referencias bibliográficas.

Adicionalmente, el Examinador encuentra una inconsistencia entre la materia divulgada en el Capítulo Descriptivo y la materia reclamada en las reivindicaciones, ya que los isótopos utilizados para marcar el elemento de unión de la Reivindicación 1 se encuentran ilustrados en el Capítulo Descriptivo unidos a mini-inmunoglobulina (SIP), mientras que se ilustra que la molécula IgG1 se une solamente con el isótopo <sup>125</sup>I, isótopo que no se encuentra reclamado en la Reivindicación 1.

Por último, el método definido en la Reivindicación 11 no menciona las etapas o fases que comprende la producción del elemento reivindicado.

b- Considero superada las anteriores objeciones en tanto que se han realizado las siguientes modificaciones en el Capítulo Reivindicatorio modificado adjunto:

- En la Reivindicación 1 se reemplaza el término “elemento de unión específico” por “molécula de anticuerpo”;
- En la Reivindicación 1, se requiere que la molécula de anticuerpo reivindicada comprenda las 6 secuencias CDR VH y VL, estando dicho molécula de anticuerpo

radiomarcada con  $^{131}\text{I}$  y comprendiendo una mini-inmunoglobulina que comprende dicho dominio de anticuerpo VH y el dominio de anticuerpo VL fusionados a  $\epsilon\text{S}_2\text{-CH}_4$  y dimerizados. Tales moléculas de anticuerpo radiomarcadas con  $^{131}\text{I}$  se encuentran ejemplificadas en el Capítulo Descriptivo.

- Se han eliminado todas las referencias bibliográficas en el Capítulo Reivindicatorio Modificado;
- Se definen las secuencias de los CDRs de L19 VH y VL;
- Asimismo, la nueva Reivindicación 8 (anterior Reivindicación 11) ha sido enmendada para referir a un método para producir una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7. Los pasos para producir dicha molécula de anticuerpo serían bien conocidas para una persona versada en la materia y se encuentran claramente descritas en el Capítulo Descriptivo (páginas 13 a 15, 23 a 24, 33 a 36, y ejemplos experimentales);
- Se ha eliminado la Reivindicación 17;

4. a- El Examinador argumenta que los documentos Borsil et al “Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin” (D1), De Martis et al “Selective targeting of tumor neovasculature by a radiohalogenated human antibody fragment specific for the ED-B domain of fibronectin” (D2), Santimaria et al, “Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer” (D3) y la patente US01/62800 (D4), afectan la novedad de la presente invención.

b- En primera medida, me permito señalar que ninguno de los documentos del arte previo revelan una molécula de anticuerpo anti ED-B humano radiomarcada con  $^{131}\text{I}$  en forma de mini-inmunoglobulina y comprende todos los 6 CDRs VH y VL. De acuerdo a esto, las reivindicaciones enmendadas resultan ser novedosas por sobre el arte previo citado.

Las reivindicaciones enmendadas también resultan ser inventivas por sobre los documentos citados por las razones que se refieren más abajo.

La presente invención se relaciona con una molécula de anticuerpo anti ED-B humano radiomarcada con  $^{131}\text{I}$  en forma de mini-inmunoglobulina/SIP (“small immunoprotein”) y comprende todos los 6 CDRs VH y VL. Tal molécula de anticuerpo muestra buena

# OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

inmunoreactividad, estabilidad y captación en el tumor para propósitos diagnósticos y terapéuticos (ver página 81 de la presente solicitud).

Sin embargo, al momento de presentar la presente solicitud (fecha de prioridad de la invención), no se hubiera esperado que la aplicación de L19-SIP-<sup>131</sup>I en una molécula de anticuerpo que tuviera estas propiedades, tal como se explica más abajo.

i) Ni D2 ni D3 se relacionan con anticuerpos en el formato SIP. En cambio, estos documentos se relacionan con anticuerpos en el formato scFv. De entre todos los posibles formatos de anticuerpos, no fue obvio que los anticuerpos L19 en el formato SIP tuvieran los efectos técnicos ventajosos que son demostrados experimentalmente para L19-SIP-<sup>131</sup>I. Por ejemplo, L19-εS<sub>2</sub>-CH4 inesperadamente mantuvo inmunoreactividad en plasma, mientras que scFv rápidamente perdió su inmunoreactividad (ver página 59 de la presente solicitud y tabla 1). Adicionalmente, la acumulación de L19-εS<sub>2</sub>-CH4 en tumores fue 2-5 veces mayor que aquellas mostradas por L19 scFv (ver tabla 5 de la presente solicitud).

La obtención de un excelente compromiso de estabilidad, velocidad de depuración y acumulación en el tumor para la molécula L19-εS<sub>2</sub>-CH4 se discute en la página 81 de la presente solicitud. Tal balance de propiedades deseadas no fueron predecibles a partir del arte previo. Existen muchos más posibles formatos en los cuales emplear una molécula de anticuerpo, la presente invención sólo reivindica uno de estos formatos, el cual muestra ser superior al formato descrito en el arte previo. Por lo tanto, los resultados obtenidos con L19-SIP-<sup>131</sup>I y presentados en la presente solicitud proporcionan el soporte para evidenciar el nivel inventivo de la materia reivindicada.

ii) D1 (Borsi et al.) y D4 revelan una molécula de anticuerpo L19-SIP marcada con <sup>125</sup>I.

<sup>125</sup>I es un radionucléotido caracterizado por decaimiento en la captura de electrones, asociada con una emisión gamma de 35 KeV (ver el mapa adjunto de varios radioisótopos de Pfenning G et al., 1995). Contrariamente a esto, <sup>131</sup>I es un isótopo que emite beta con una energía-beta máxima de 606 KeV asociada con una emisión gamma principal de 364 KeV (ver el mapa adjunto de varios radioisótopos de Pfenning G et al., 1995 – copia adjunta).

Depósitos de decaimiento radioactivo energizan la materia circundante excitando átomos en la vecindad. En líquidos, especialmente en soluciones acuosas, este proceso lleva a la generación de radicales, un proceso llamado radiolisis. Estos radicales reaccionan instantáneamente con la materia circundante resultando usualmente en una oxidación de reactantes disueltos. La cantidad de energía liberada a un cierto volumen de materia, la así llamada “transferencia de energía lineal” (valor-LET) depende de la materia circundante, el modo de decaimiento del radionucleótido y de la energía de decaimiento. En general, isótopos de emisión beta, como  $^{131}\text{I}$ , exhiben un valor-LET mayor que los emisores gamma y Auger, como  $^{125}\text{I}$ , es decir:  $^{131}\text{I}$  tiene una energía de transferencia mayor, generando más radicales por volumen comparado con  $^{125}\text{I}$ .

El riesgo de una pérdida de afinidad debido a radiolisis es, por lo tanto, significativamente mayor para anticuerpos o fragmentos de anticuerpo radiomarcados con  $^{131}\text{I}$  que con  $^{125}\text{I}$  (ver, por ejemplo, Wahl RL et al., 1990; DeNardo GL et al., 2000, y Huang W et al., 2000, copias de los cuales se adjuntan).

Específicamente, Wahl et al. informó una inmunoreactividad significativamente aumentada para el anticuerpo monoclonal radiomarcado con  $^{125}\text{I}$  (Mab) 5G6.4 después de 48 horas comparado con el análogo marcado con  $^{131}\text{I}$  (48% versus 6%) (ver tabla 1 en página 86 e Wahl et al.). DeNardo et al. mostró que dentro de 4 horas, la inmunoreactividad de Mab Lym-1 marcada con  $^{131}\text{I}$  decrece a 70% de la inmunoreactividad determinada para Lym-1 marcada con  $^{125}\text{I}$  (ver página 552, sección “resultados”, primer párrafo). Por último, Huang et al. describió que Mab 1H10 marcado con  $^{125}\text{I}$  mantuvo mayor inmunoreactividad por 8 días que 1H10- $^{131}\text{I}$  (78% versus 64%) (ver página 183, sección “resultados”, primer párrafo).

Sin embargo, al contrario de la literatura del estado del arte citada arriba,  $^{131}\text{I}$ -L19-SIP mostró tener un índice terapéutico muy favorable (ver Berndorff et al., 2005, una copia del cual se adjunta), y ser muy estable e inmunoreactivo con alta capacidad de unión *in vivo* (ver ASCO Abstract, Del Conte et al., 2008 – adjuntos).

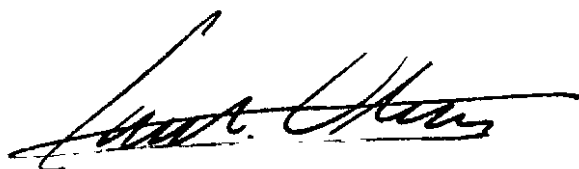
Así,  $^{131}\text{I}$ -L19-SIP mostró tener propiedades beneficiosas sorprendentes, las cuales no pudieron ser predichas a partir del arte previo. Por lo tanto, la provisión de una molécula de anticuerpo L19-SIP marcada con  $^{131}\text{I}$  resulta ser inventiva sobre el arte previo citado, incluyendo D1 a D4.

Tal como se explica más arriba, las reivindicaciones enmendadas han sido limitadas a una molécula de anticuerpo anti ED-B humano radiomarcada con  $^{131}\text{I}$  en forma de mini-inmunoglobulina y comprende todos los 6 CDRs VH y VL. Estas moléculas de anticuerpo han mostrado tener características muy favorables en términos de su estabilidad molecular, velocidad de depuración y acumulación en el tumor (ver página 81 de la presente solicitud).

Evidencia adicional que tales moléculas de anticuerpo (es decir,  $^{131}\text{I}$ -L19-SIP) muestran un perfil de eficacia y toxicidad anti-tumoral superior se provee por Berndorff et al., 2005, una copia del cual se adjunta.

5. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por el Examinador han sido resueltas y de no haber objeciones adicionales en materia de patentabilidad, respetuosamente solicito se proceda con la concesión del privilegio de patente para la presente invención.

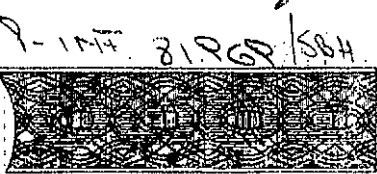
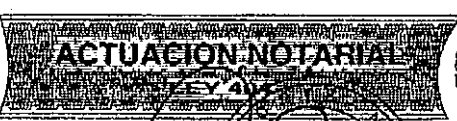
Atentamente,



CARLOS R. OLARTE  
C.C. No. 79.782.747 de Bogotá  
T.P. 74.295

#### Anexos

- Capítulo Reivindicatorio Modificado
- Capítulo Descriptivo corregido
- Declaración firmada por el Dr. Alessandro Pini
- Publicación Berndorff et al
- Abstract Del Conte ASCO
- Publicación DeNardo et al
- Publicación Huang et al
- Publicación Wahl et al
- Manifested Radioisotope Map



N 007422051

1 FOLIO 85.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: VEINTICUATRO.-  
2 SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de  
3 OLARTE, Carlos Reinaldo y otro del Poder otorgado por BAYER SCHERING  
4 PHARMA AG.- En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República  
5 Argentina, el día NUEVE de MARZO del año DOS MIL SIETE, ante mí María  
6 Silvina Lasarte, Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial número 1788,  
7 COMPARECE: Dagmar MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968,  
8 hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Na-  
9 cional de Identidad Número 20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-  
10 20383892-7, con domicilio especial en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º,  
11 de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIE-  
12 NE: por su propio derecho.- Y la compareciente EXPRESA: PRIMERO: Que la  
13 Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse  
14 178, 13353, Berlín, Alemania, le confirió con fecha 22 de enero de 2007 en dicho pa-  
15 ís, un Poder, el cual mediante escritura número 14 de fecha 16 de febrero de 2007,  
16 otorgada ante la Escribana Mariela Vanina Scardaccione, al folio 44, protocolo co-  
17 rriente de este Registro Notarial interinamente a su cargo, fue incorporado y transcrip-  
18 to al mismo, cuya primera copia tengo para este acto a la vista, doy fe y en lo perti-  
19 nente transcribiré en la presente.- SEGUNDO: Manifiesta bajo juramento que el refe-  
20 rido poder se encuentra plenamente vigente en virtud de no haberle sido revocado,  
21 suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.- TERCERO: En consecuencia, DI-  
22 CE: Que en uso de la facultad conferida SUSTITUYE PARCIALMENTE el poder  
23 mencionado a favor de Carlos Reinaldo OLARTE y/o James Ian RAISBECK, al  
24 solo y único objeto de que en nombre y representación de la Sociedad "BAYER  
25 SCHERING PHARMA AG", y actuando en forma individual, indistinta y/o alterna-

CECBA - LEY 404 GCBA  
LEGALIZACION  
070312117346



12/03/2007 \$20.00

CECBA - LEY 404 GCBA  
APOSTILLING  
070312054713



12/03/2007 \$39.00



13000000

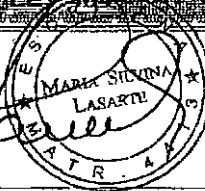
N 007422051

damente, se presente exclusivamente ante las autoridades de COLOMBIA que co-  
rrespondan y realicen los actos enumerados en el citado poder y con las facultades que  
surgen del mismo, el que transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO 44.- PRIMERA  
COPIA:- ESCRITURA NÚMERO: CATORCE.- ....- En la Ciudad Autónoma de  
Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día DIECISEIS de FEBRERO del  
año DOS MIL SIETE, ante mí ..., Escribana Autorizante, ..., COMPARECE: Dagmar  
MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y  
Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número  
20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-20383892-7, domiciliada  
legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos  
Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIENE: por su propio derecho.-  
Y la compareciente EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la  
Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del  
PODER que le fuera conferido en Berlín, Alemania, el 22 de enero de 2007, por la  
Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse 178,  
13353, Berlín, Alemania, sobre cuya plena vigencia responde la requirente bajo jura-  
mento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de poder cuya incor-  
poración y transcripción a este protocolo solicita la compareciente, se encuentra ex-  
tendido en idioma castellano, certificadas las firmas por notario en idioma alemán,  
debidamente legalizado en idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de La  
Haya del 5 de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por la  
Traductora Pública Laura Thieberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo mani-  
festado tiene interés legítimo en su requerimiento.- En consecuencia, me hace entrega  
en este acto del original del instrumento de poder relacionado con su respectiva tra-  
ducción al idioma nacional, el que agrego a la presente y transcripto dice: "MOE-

1 LLE  
2 BA  
3 - A  
4 plic  
5 res  
6 cas  
7 efec  
8 sari  
9 proi  
10 pior  
11 cibi  
12 orde  
13 pue  
14 en e  
15 mar  
16  
17 juici  
18 cont  
19 que  
20 ción  
21 mar  
22 dom  
23 sent  
24 rida  
25 cual

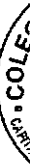


ACTUACION NOTARIAL



N 007422052

1 LLER & CO. (Sigue aclaración en idioma inglés) - PODER Los abajo firmante/s  
2 BAYER SCHERING PHARMA AG domiciliados en Müllerstrasse 178 13353 Berlín  
3 - Alemania declaran por el presente otorgar a Dagmar MESSERER poder general am-  
4 plio y suficiente para recabar de las autoridades ..., sud y centroamericanas ... que co-  
5 rrespondan; la obtención de patentes de invención, el registro y la renovación de mar-  
6 cas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a cuyo  
7 efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas autoridades todas las gestiones nece-  
8 sarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular descripciones, oposiciones,  
9 protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explota-  
10 ciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, per-  
11 cibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier  
12 orden. Por otra parte, les confieren mandato para que en su nombre y representación  
13 puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o  
14 en el futuro tuvieran ..., en Sudamérica, Centroamérica ..., con motivo de su nombre,  
15 marcas de fábrica o de comercio, patentes de invención y modelos y/o de sus derechos  
16 de propiedad intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo; promover  
17 juicios de cualquier jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales;  
18 contra los falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos  
19 que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposi-  
20 ción u otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el nombre, las  
21 marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o nombres de  
22 dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán pre-  
23 sentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier auto-  
24 ridad judicial; presentar testigos, documentos y demás justificativos; rendir pruebas de  
25 cualquier especie; pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver posiciones, asistir



800.20100

N 007422052

a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar, transar,  
someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar cauciones, pedir embar-  
gos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los  
bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar ju-  
ramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar  
todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán  
asimismo substituir el presente poder en todo o en parte.- Dado y firmado en Berlín  
(Sigue fecha en idioma inglés). Bayer Schering Pharma AG (Sigue texto en idioma  
inglés). ppa. Sigue una firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Noeske-Jungblut. ppa. Sigue  
otra firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Klose". ES COPIA FIEL, doy fe.- En hoja adjunta  
consta la certificación notarial de las firmas obrantes en el poder en idioma alemán,  
efectuado el 22 de enero de 2007 por el Escribano Dimitri Rempen, de Berlín, Alema-  
nia, y a continuación consta la respectiva legalización de la firma y sello del nombra-  
do Notario (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de  
1961), en idioma alemán, efectuada por el Presidente del Tribunal Regional de Berlín,  
Alemania.- En hojas adjuntas sigue la referida traducción al idioma nacional la que  
transcripta textualmente, dice: "TRADUCCIÓN PUBLICA - (Sobre papel con mem-  
brete de "MOELLER y CO" - América Latina - Agentes de la Propiedad Intelectual -  
figura un Poder otorgado por la Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con  
sede en Berlín, Alemania, redactado en idioma nacional, luego del que aparecen los  
siguientes textos, que traducidos dicen:) "BAYER SCHERING PHARMA AG" -  
Patentes y licencias - (Firmado y Aclarado:) pp Dr. Noeske-Jungblut - pp (Firmado y  
Aclarado:) Dr. Klose.- La versión en inglés es para su información únicamente.- Re-  
gistro de Actas N° R 17/2007.- Me he referido a la prohibición de intervención según  
el artículo 3, párrafo 1, N° 7, de la Ley de Certificaciones. Mi pregunta de si ha existi-

1 do u  
2 va.-  
3 de l  
4 junio  
5 cial  
6 tiem  
7 Cor  
8 283,  
9 lín,  
10 la ar  
11 están  
12 Soci  
13 de 2  
14 oble  
15 LLA  
16  
17 su c  
18 do e  
19 lín,  
20 gion  
21 Juez  
22 nent  
23 al id  
24 Hay  
25 RES



N 007422053

do una intervención previa en el sentido de la norma me fue contestaba por la negati-  
va.- Las firmas trazadas ante mi por el Dr. Walter Klose, que nació el 26 de diciembre  
de 1952, y de la Dra. Chistiane Noeske-Jungblut de soltera Noeske, que nació el 26 de  
junio de 1957 - Ambos de mi personal conocimiento - Ambos con domicilio comer-  
cial en 13353 Berlín, Müllerstrasse 178 son auténticas, de lo que doy fe.- Al mismo  
tiempo certifico en base a que tuve a la vista en el día de hoy las actas del Registro de  
Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Charlottenburg, N° de Registro HR B  
283, que la Sociedad "Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft", con sede en Ber-  
lín, está inscripta con el número mencionado arriba en el Registro de Comercio y que  
la arriba mencionada Dra. Noeske-Jungblut y el arriba mencionado Dr. Walter Klose  
están facultados en su carácter de mandatarios a representar en forma conjunta a la  
Sociedad "Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft" de Berlín. Berlín, 22 de enero  
de 2007.- El escribano (firma ilegible) y liquidación de derechos. (Hay un sello en  
oblea sobre precinto:) Dimitri Rempen, Escribano de Berlín.- 9101ª E-F.- APOSTI-  
LLA - (Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961) - País: República Federal  
de Alemania - Este instrumento público fue firmado por Dimitri Rempen, actuando en  
su carácter de escribano de Berlín, estando provisto del sello del escribano.- Certifica-  
do en Berlín, el 24 de enero de 2007, por el Presidente del Tribunal Regional de Ber-  
lín, con el N° 9101 a E-F 536/07 - Sello (hay un sello:) el Presidente del Tribunal Re-  
gional de Berlín - Firma el Funcionario autorizado (firmado y aclarado:) Holldorf -  
Juez Principal del Tribunal Regional.- ES TRADUCCIÓN FIEL de las partes perti-  
nentes en los idiomas alemán e inglés del documento que se acompaña, que he vertido  
al idioma nacional, en Buenos Aires, a 6 de febrero de 2007.- Hay una firma ilegible.  
Hay un sello que dice: "LAURA THIEBERGER - MATRÍCULA DE TRADUCTO-  
RES ALEMÁN - FRANCÉS - Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III - 98 - (La Plata) -



820-44100

N 007422053

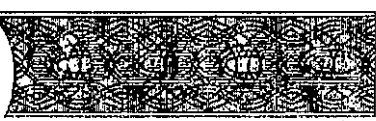
COLE  
GIO

INGLÉS - Tomo III: Folio 14 (Cap.) - Tomo III Folio 329 (La Plata) - COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS N° 173".- ES COPIA FIEL, doy fe.- A continuación hay un sello que dice: "COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Corresponde a la Legalización N° T4-3278/07. Sigue una firma ilegible: Esteban Santiago Allegretti".- ES COPIA FIEL, doy fe.- Al dorso en el margen superior hay un sello timbrador ...".- A continuación sigue la legalización de la firma de la nombrada traductora, ...".- ES COPIA FIEL, doy fe.- En este estado la compareciente DICE: que en la forma expresada deja INCORPORADO y TRANSCRIPTO en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de mí, la Escribana Autorizante, expida primera copia de la presente para la nombrada apoderada Dagmar MESSERER.- Constancias Notariales: Identidad de la compareciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de la Autorizante.- ... LEO esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad, la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIELA VANINA SCARDACCIONE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 44 del Registro Notarial número 1788, interinamente a mi cargo.- PARA LA APODERADA expido la presente PRIMERA COPIA en tres (3) sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el número N 007376153 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.- Sigue una firma ilegible y un sello que dice: Mariela V. Scardaccione - Escribana - Mat. 4527."- ES COPIA FIEL, de las partes pertinentes de la escritura de referencia, doy fe.- CUARTO: Finalmente la compareciente expresa: a) Que el presente otorgamiento no significa renunciar al ejercicio de las facultades sustituidas; y b) Que los nombrados apoderados sustitutos no podrán sustituir el presente poder en ninguna de sus partes.- Constancias Notariales: Identidad de la Compare-

1 cien  
2 la A  
3 teno  
4 404,  
5 te es  
6 com  
7 fe  
8 mi s  
9 gistr  
10 sent  
11 lativ  
12 la fe  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

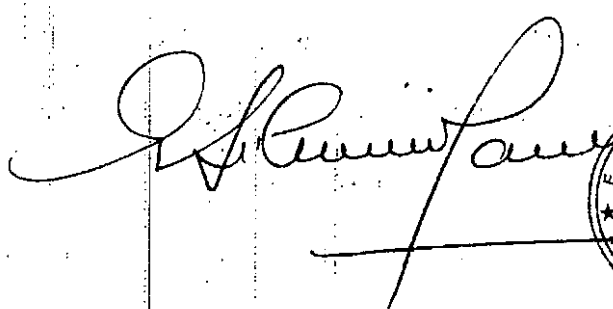


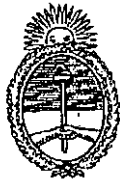
ACTUACION NOTARIAL  
LEY 404



GIO 26  
ua- 27  
LA 28  
gue 29  
orso 30  
iza- 31  
este 32  
O y 33  
de 34  
ada 35  
re- 36  
e la 37  
ue- 38  
IA- 39  
con 40  
88 41  
RA 42  
el 43  
su 44  
ar- 45  
e la 46  
a) 47  
us- 48  
nte 49  
re- 50

1 ciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de  
2 la Autorizante.-Yo, la Escribana Autorizante impongo y advierto a la compareciente, a  
3 tenor de lo dispuesto en el artículo 77 inciso h) de la Ley Orgánica Notarial Número  
4 404, respecto de los alcances y consecuencias de las cláusulas contenidas en la presen-  
5 te escritura y del derecho de leer por sí este instrumento.- LEO esta escritura a la  
6 compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad la firma ante mí, doy  
7 fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIA SILVINA LASARTE. Escribana. Está  
8 mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 85 del Re-  
9 gistro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA PODERDANTE expido la pre-  
10 sente PRIMERA COPIA en cuatro (4) sellos de actuación notarial numerados corre-  
11 lativamente desde el número N 007422051 al presente inclusive; que sello y firmo en  
12 la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-

N 007422054



140523700

- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50



L 007495419

BO DE  
ANOS  
BO de  
SAIRES

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República

Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, **LEGALIZA** la firma

y sello del escribano **MARIA SILVINA LASARTE**

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo

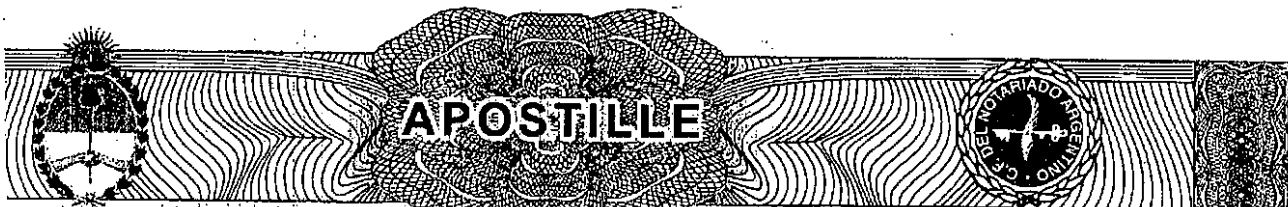
el N° **07031211734670** La presente legalización no juzga sobre

el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, **Lunes 12 de Marzo de 2007**



*[Handwritten signature]*  
ESC. EDDA ENRIQUETA SINELLI  
COLEGIO DE ESCRIBANOS  
CONSEJERA



REPUBLICA  
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00115229

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por EDDA ENRIQUETA SINELLI

3. Quien actúa en calidad de CONSEJERA

4. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 12/03/2007

7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 070312054713

10. Firma

ESC. HECTOR R. NOVARO  
COLEGIO DE ESCRIBANOS  
CONSEJERO



060720293050



060720047148



ACTUACION NOTARIAL



13  
P.CO-79.2006/547

N 006494447

**FOLIO 237.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: SETENTA Y**

**SEIS.- SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de**

**OLARTE, Carlos Reinaldo y otro del poder otorgado por PHILOGEN S.P.A.- -**

En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día

**DIECINUEVE de JULIO del año DOS MIL SEIS, ante mí María Silvina Lasarte,**

Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial Número 1788, **COMPARECE:**

**Dagmar MESSERER**, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter

Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de

Identidad Número 20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria número 27-

20383892-7, domiciliada legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10°,

de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de edad y de mi

conocimiento personal, doy fe.- **INTERVIENE:** por su propio derecho.- Y la

compareciente **EXPRESA: PRIMERO:** Que la Sociedad "**PHILOGEN S.P.A.**", con

domicilio en La Lizza 7, I-53100, Siena, Italia, le confirió en dicho país, el día 4 de

julio de 2.006, un PODER, el cual mediante escritura número 75, de fecha 18 de julio

de 2.006, pasada ante mí, al folio 234, protocolo corriente, de este Registro Notarial

Número 1.788, a mi cargo, fue incorporado y transcrito al mismo, cuya primera

copia, tengo para este acto a la vista, doy fe, y en lo pertinente transcribiré en la

presente.- **SEGUNDO:** La compareciente manifiesta bajo juramento que el poder

invocado, se encuentra plenamente vigente en virtud de no haberle sido revocado,

suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.- **TERCERO:** En consecuencia

**DICE:** Que en uso de la facultad conferida **SUSTITUYE PARCIALMENTE** el

poder mencionado a favor de **Carlos Reinaldo OLARTE y/o James Ian**

**RAISBECK**, al solo y único objeto de que en nombre y representación de la Sociedad

**"PHILOGEN S.P.A."**, y actuando en forma individual, indistinta y/o alternadamente,



N 006494447

se presenten exclusivamente ante las autoridades de COLOMBIA que correspondan, 26  
y realicen los actos enumerados en el citado poder y con las facultades que surgen del 27  
mismo, el que transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO 234.- PRIMERA COPIA.- 28  
ESCRITURA NÚMERO: SETENTA Y CINCO.- ...- En la Ciudad Autónoma de 29  
Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día DIECIOCHO de JULIO del 30  
año DOS MIL SEIS, ante mí ..., Escribana Autorizante, ..., COMPARECE: Dagmar 31  
MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y 32  
Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número 33  
20.383.892, ...- La compareciente es mayor de edad y de mi conocimiento personal, 34  
doy fe.- INTERVIENE: por su propio derecho.- Y la compareciente EXPRESA: Que 35  
a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la Autorizante, LA INCORPORACIÓN 36  
y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del PODER que fuera conferido en Siena, 37  
Italia, el 4 de julio de 2006, por la Sociedad "PHILOGEN S.P.A.", con domicilio en 38  
La Lizza 7, I-53100, Siena, Italia, a favor de Dagmar MESSERER, sobre cuya plena 39  
vigencia responde la requirente bajo juramento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) 40  
Que el instrumento de poder cuya incorporación y transcripción a este protocolo 41  
solicita la compareciente, se encuentra extendido en idioma castellano e inglés, 42  
certificada la firma y la representación por notario en idioma italiano, debidamente 43  
legalizado en idioma italiano (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 44  
de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por las 45  
Traductoras Públicas Esther Carasso y Laura Thieberger.- b) Que la compareciente en 46  
virtud de lo manifestado tiene interés legítimo en su requerimiento.- En consecuencia, 47  
me hace entrega en este acto del original del instrumento de poder relacionado con su 48  
respectiva traducción al idioma nacional, el que agrego a la presente y transcripto 49  
dice: "MOELLER & CO. (Sigue aclaración en idioma inglés) - PODER Los abajo 50



ACTUACION NOTARIAL



N 006494448

1 firmante/s PHILOGEN S.P.A. domiciliados en La Lizza 7, I-53100, Siena, Italia  
2 declaran por el presente otorgar a Dagmar MESSERER poder general amplio y  
3 suficiente para recabar de las autoridades ... sud y centroamericanas ... que  
4 correspondan, la obtención de patentes de invención, el registro y la renovación de  
5 marcas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a  
6 cuyo efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas autoridades todas las gestiones  
7 necesarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular descripciones,  
8 oposiciones, protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos,  
9 justificar explotaciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir  
10 documentos y valores, percibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades  
11 administrativas de cualquier orden. Por otra parte, les confieren mandato para que en  
12 su nombre y representación puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que  
13 actualmente los que suscriben tengan o en el futuro tuvieran ... en Sudamérica,  
14 Centroamérica ..., con motivo de su nombre, marcas de fábrica o de comercio,  
15 patentes de invención y modelos y/o de sus derechos de propiedad intelectual que  
16 actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover juicios de cualquier  
17 jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales, contra los  
18 falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos que  
19 infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposición u  
20 otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el nombre, las  
21 marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o nombres de  
22 dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán  
23 presentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier  
24 autoridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos, rendir  
25 pruebas de cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver



N 006494448

posiciones, asistir a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, 26  
recusar, apelar, transar, someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar 27  
cauciones, pedir embargos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, 28  
pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de 29  
sentencias, prestar juramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en 30  
general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este 31  
mandato. Podrán asimismo substituir el presente poder en todo o en parte.- Dado y 32  
firmado en SIENA (ITALY) (sigue fecha en idioma inglés).- Hay una firma 33  
ilegible.”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- Al dorso consta la certificación notarial de la 34  
firma obrante en el poder y la representación invocada, en idioma italiano, efectuada 35  
por el Escribano de Radda in Chianti, Italia, Strato Cangiano y en hoja adjunta, la 36  
respectiva legalización de la firma y sello del nombrado escribano, en idioma italiano, 37  
efectuado por el Fiscal de la República ante el Tribunal Ordinario de Siena, Italia, 38  
Nicola Marini (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 39  
1961).- En hojas adjuntas sigue la referida traducción al idioma nacional la que 40  
transcripta textualmente, dice: “TRADUCCIÓN PUBLICA – A continuación de un 41  
PODER otorgado por la Sociedad “PHILOGEN S.P.A. en idioma nacional, sobre 42  
papel con membrete MOELLER & CO., América Latina, Asesores de la Propiedad 43  
Intelectual, figuran los siguientes textos, que traducidos dicen: Visto para la 44  
autenticidad de la firma colocada en mi presencia por persona de mi conocimiento, 45  
Dr. Giovanni Neri, nacido en Roma, el 5 de enero de 1969, en calidad de Consejero 46  
delegado y legal representante de la sociedad “PHILOGEN S.P.A.”, con sede en 47  
Siena, Piazza La Lizza Nº 7, capital social de Euro 365.000,00, inscrita en le 48  
Registro de Empresas de Siena, bajo el Número de inscripción y Código Fiscal 49  
00893990523 (REA Nº 98772), domiciliado para el cumplimiento del cargo en la sede 50



15  
N 006494449

1 social, en este acto legitimado en virtud de los poderes a él derivados por el Estatuto  
2 social, de cuya identidad personal y poderes de firma, Yo, Escribano Strato Cangiano  
3 con sede en Radda in Chianti, inscripto en el Colegio notarial de los Distritos  
4 Reunidos de Siena y Montepulciano, DOY FE.- Siena, Piazza La Lizza N° 7.- Cuatro  
5 de junio (1) de dos mil seis (04.07.2006.- (1) de "Junio" VALE Apostilla Aprobada.-  
6 Firmado ilegible. Hay un sello de Cangiano Strato, hijo de Francesco, Escribano de  
7 Radda in Chianti.- FISCALÍA DE LA REPUBLICA ANTE EL TRIBUNAL  
8 ORDINARIO DE SIENA.- APOSTILLA (Convención de La Haya del 5 de Octubre  
9 de 1961).- País: ITALIA.- El presente acto público, ha sido firmado por Cangiano  
10 Strato, en calidad de Escribano, en el cual ha colocado el sello de "Cangiano Strato,  
11 hijo de Francesco, Escribano en Radda in Chianti.- CERTIFICADO: EN Siena, el 4  
12 de julio de 2006, por el Fiscal de la República de Siena, bajo el N° 252. Reg.  
13 Apostilla.- El Fiscal de la República, Firmado ilegible. (Aclaración de firma), Nicola  
14 Marini-Sust.- Hay un sello de la Fiscalía de la República ante el tribunal Ordinario de  
15 Siena.- ES TRADUCCIÓN FIEL de las partes pertinentes que figuran en su original  
16 en inglés e italiano, que hemos traducido al idioma nacional, en Buenos Aires, 12 de  
17 Julio de 2006.- Por el idioma italiano. Hay una firma ilegible y un sello que dice:  
18 "ESTHER CARASSO - TRADUCTORA PUBLICA NACIONAL - PROVINCIAL  
19 - T° II F° 253 ITALIANO T° III N° 103 - T° II F° 207 FRANCÉS T° II N° 377 -  
20 COL. DE TRAD. PUB. DE BS. AS. N° 984".- Por el idioma inglés. Hay otra firma  
21 ilegible y un sello que dice: "LAURA THIEBERGER - MATRICULA DE  
22 TRADUCTORES ALEMÁN - FRANCÉS - Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III - 98  
23 - (La Plata) - INGLÉS - Tomo III: Folio 14 (Cap.) - Tomo III Folio 329 (La Plata) -  
24 COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS N° 173".- ES COPIA FIEL, doy fe.- A  
25 continuación hay un sello que dice: "...".- A continuación siguen las legalizaciones de



N 006494449

las firmas de las nombradas traductoras, ...".- **ES COPIA FIEL**, doy fe.- En este  
estado la compareciente DICE: que en la forma expresada deja **INCORPORADO** y  
**TRANSCRIPTO** en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de  
mí, la Escribana Autorizante, expida primera copia de la presente para la nombrada  
apoderada ...- LEO esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prueba  
de conformidad, la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIA  
SILVINA LASARTE. Escribana. Está mi sello. **CONCUERDA** con su escritura  
matriz que pasó ante mí, al folio 234 del Registro Notarial número 1788, a mi cargo.  
**PARA LA APODERADA** expido la presente **PRIMERA COPIA** en cuatro (4) sellos  
de actuación notarial numerados correlativamente desde el número N 006494443 al  
presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-  
Sigue mi firma y mi sello notarial."- **ES COPIA FIEL**, de las partes pertinentes de la  
escritura de referencia, doy fe.- **CUARTO**: Finalmente la compareciente expresa: a)  
Que el presente otorgamiento no significa renunciar al ejercicio de las facultades  
sustituidas; y b) Que los nombrados apoderados sustitutos **NO** podrán sustituir el  
presente poder en ninguna de sus partes.- Yo, la Escribana Autorizante advierto a la  
compareciente, a tenor de lo dispuesto en el artículo 77 inciso h) de la Ley Orgánica  
Notarial Número 404, respecto de los alcances de las cláusulas contenidas en la  
presente escritura y del derecho de leer por sí este instrumento.- **LEO** esta escritura a  
la compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad la firma ante mí,  
doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIA SILVINA LASARTE. Escribana.  
Está mi sello. **CONCUERDA** con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 237  
del Registro Notarial número 1788, a mi cargo. **PARA LA PODERDANTE** expido la  
presente **PRIMERA COPIA** en cuatro (4) sellos de actuación notarial numerados

ES  
C  
A  
J  
A



16  
N 006494450

1 correlativamente desde el número N 006494447 al presente inclusive, que sello y  
2 firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

*[Handwritten signature]*





N 006494450

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

17



L 007114572

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano MARIA-SILVINA LASARTE obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 060720293050/4 La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Jueves 20 de Julio de 2006

*[Handwritten signature]*

ESC. HECTOR ENRIQUE LANZANI  
COLEGIO DE ESCRIBANOS  
LEGALIZADOR

# APOSTILLE

REPUBLICA  
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00078581

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por ~~HECTOR ENRIQUE LANZANI~~

3. Quien actúa en calidad de ~~LEGALIZADOR~~

4. Lleva el sello / timbre de ~~COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS~~  
~~AIRES~~

5. En ~~LA CIUDAD DE BUENOS AIRES~~ 6. El día ~~20/07/2006~~

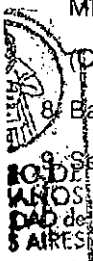
7. Por ~~EL~~ ~~COLEGIO DE ESCRIBANOS~~ ~~DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES~~  
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 060720047148

9. Sello / Timbre

10. Firma



ESC. DIEGO M. MARTI  
COLEGIO DE ESCRIBANOS  
CONSEJERO

**CAPITULO REIVINDICATORIO MODIFICADO**  
**(Primer Examen de Fondo)**

1. Una molécula de anticuerpo que se une al ED-B humano, donde dicha molécula de anticuerpo está marcada con un isótopo y comprende un sitio de unión al antígeno que comprende un dominio de anticuerpo VH y un dominio de anticuerpo VL, donde el isótopo es  $^{131}\text{I}$  y donde el dominio de anticuerpo VH comprende una VH CDR1, una VH CDR2 y una VH CDR3, donde dicha VH CDR3 es la L19 VH CDR3 de la SEQ ID N°: 3, la VH CDR1 es la L19 VH CDR1 de la SEQ ID N°: 1 y la VH CDR2 es la L19 VH CDR2 de la SEQ ID N°: 2; y donde el dominio de anticuerpo VL comprende una VL CDR1, una VL CDR2 y una VL CDR3, donde la VL CDR3 es la L19 VL CDR3 de la SEQ ID N°: 6, la VH CDR1 es la L19 VL CDR1 de la SEQ ID N°: 4 y la VL CDR2 es la L19 VL CDR2 de la SEQ ID N°: 5; donde la molécula de anticuerpo comprende una mini-inmunoglobulina que comprende dicho dominio de anticuerpo VH y el dominio de anticuerpo VL fusionados a  $\epsilon\text{S}_2\text{-CH}_4$  y dimerizados.
2. La molécula de anticuerpo acorde con la Reivindicación 1, donde dicha molécula de anticuerpo compite por la unión a ED-B con un dominio de unión a ED-B de un anticuerpo que comprende el dominio VH de L19 y el dominio VL de L19.
3. La molécula de anticuerpo acorde con la Reivindicación 1 o con la Reivindicación 2 que comprende el dominio VH de L19.
4. La molécula de anticuerpo acorde con la Reivindicación 3 que comprende el dominio VL de L19.
5. La molécula de anticuerpo acorde con una de las reivindicaciones precedentes, donde el dominio de anticuerpo VH y el dominio de anticuerpo VL se encuentran dentro de una molécula de anticuerpo scFv fusionado a  $\epsilon\text{S}_2\text{-CH}_4$ .
6. La molécula de anticuerpo acorde con una de las reivindicaciones precedentes, donde la molécula de anticuerpo scFv está fusionado a  $\epsilon\text{S}_2\text{-CH}_4$  a través de un péptido ligador.
7. La molécula de anticuerpo acorde con la Reivindicación 6 donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido ligador es GGSG (SEQ ID N°: 7).
8. Un método para producir una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de

las Reivindicaciones 1 a 7, donde dicho método comprende marcar una molécula de anticuerpo con el isótopo  $^{131}\text{I}$ .

9. El método acorde con la Reivindicación 8, donde dicha marcación comprende oxidar un halogenuro en presencia de la molécula de anticuerpo, donde el halogenuro es  $^{131}\text{I}^-$ .

10. El método acorde con la Reivindicación 8, donde dicha marcación comprende conjugar un vehículo de halógeno bi-funcional activado, que contiene un radioisótopo con un residuo lisina o cisteína o con el extremo N terminal de la molécula de anticuerpo, donde el radioisótopo es  $^{131}\text{I}^-$ .

11. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde dicho método comprende expresar el ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo antes de la marcación.

12. El método acorde con la Reivindicación 11, que comprende cultivar células huésped bajo condiciones que permitan producir la molécula de anticuerpo.

13. El método acorde con cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 12, que además comprende aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo.

14. El método acorde con cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 13, que además comprende unir la molécula de anticuerpo a ED-B o a un fragmento de ED-B *in vitro*.

15. Un método que comprende unir la molécula de anticuerpo que se une ED-B acorde con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7 a ED-B o a un fragmento de ED-B, donde dicha unión tiene lugar *in vitro*.

16. El método acorde con la Reivindicación 14 o 15, que comprende determinar la cantidad de unión de la molécula de anticuerpo a ED-B o a un fragmento de ED-B.

17. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de anticuerpo acorde con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

\*\*\*\*\*

RECONOCIMIENTO DIRIGIDO DE LA VASCULATURA TUMORAL USANDO EL  
ANTICUERPO L19 CONTRA ED-B DE FIBRONECTINA MARCADO  
RADIOACTIVAMENTE

La presente invención se relaciona con el reconocimiento dirigido [targeting] de la vasculatura tumoral usando moléculas de anticuerpo marcadas radioactivamente. En particular, la invención se relaciona con el uso de moléculas de anticuerpo que se unen a ED-B de fibronectina y que son de utilidad demostrada en el reconocimiento dirigido de tumores. En diferentes realizaciones de la presente invención, se emplean moléculas de anticuerpo en distintos formatos moleculares. En determinadas realizaciones las moléculas de anticuerpo comprenden IgG1 humana. En otras realizaciones, las moléculas de anticuerpo son mini-inmunoglobulinas, tal como las que son generadas por fusión de una molécula de anticuerpo scFv al dominio constante CH4 de una isoforma secretora de la IgE que contiene naturalmente una cisteína en su extremo COOH-terminal que forma un dímero ligado covalentemente. La velocidad de depuración de sangre, la estabilidad *in vivo* y otras propiedades ventajosas se emplean en los diferente aspectos y realizaciones de la invención, por ejemplo en el reconocimiento dirigido de tumores. Se puede aprovechar el comportamiento diferente *in vivo* de las diferentes formas de las moléculas de anticuerpo

para diversos fines de diagnóstico y/o terapéutico, dependiendo de las necesidades clínicas y la enfermedad.

A pesar de su enorme potencial como agentes terapéuticos, los anticuerpos monoclonales (mAbs) de origen no humano no han tenido un buen desempeño en los ensayos clínicos como resultado de su inmunogenicidad (1 Shawlert et al., 1985 2 Miller et al., 1983), sus pobres propiedades farmacocinéticas (3 Hakimi et al., 1991; 4 Stephens et al., 1995) y su ineficacia para reclutar funciones efectoras (5 Riechmann et al., 1988; 6 Junghens et al., 1990). La perspectiva reciente de aislar fragmentos de anticuerpo humano a partir de bibliotecas de expresión en fagos (7 McCafferty et al., 1990; 8 Lowman et al., 1991; para revisiones sobre el tema véase 9 Nilsson et al., 2000 y 10 Winter et al., 1994) trasciende estos problemas, revitalizando los estudios y haciendo resurgir la esperanza de usar estos reactivos para tratar enfermedades importantes. Aún más, estas moléculas deberían servir como bloques de construcción ideales para nuevas herramientas de diagnóstico y terapéuticos (11 Reichert, 2001; 12 Huls et al., 1999). Aún más, estos anticuerpos pueden ser "madurados" para alcanzar afinidades en el rango picomolar (13 Pini et al., 1998), al menos deseable, si no necesario, para el uso clínico.

Las aplicaciones clínicas con los fragmentos de

anticuerpo humano para una administración selectiva para uso diagnóstico o como agentes terapéuticos requieren, no obstante, de blancos altamente específicos. En el caso de tumores, los blancos más populares son los antígenos de la superficie celular, que habitualmente no son abundantes ni estables. Sin embargo, durante el avance del tumor, el microambiente que rodea a las células tumorales sufre una extensa modificación que genera un "entorno tumoral" que representa un blanco para las terapias de tumores basadas en anticuerpos (14 Neri y Zardi, 1998). De hecho, el concepto que el microambiente tumoral alterado es en sí mismo un carcinógeno que puede ser reconocido y buscado como blanco está ganando cada vez más consenso. Las moléculas que pueden suministrar eficazmente agentes terapéuticos al microambiente tumoral representan entonces nuevas herramientas promisorias e importantes para la terapia del cáncer (15 Bissel, 2001 14 Neri y Zardi, 1998).

La fibronectina es un componente de la matriz extracelular (ECM) que se expresa ampliamente en diversos tejidos y fluidos corporales normales. Se pueden generar diferentes isoformas de FN mediante un procesamiento alternativo del pre-ARNm de la FN, un proceso que es modulado por citoquinas y el pH extracelular (16 Balza et al., 1988; 17 Carnemolla et al., 1989 18 Borsi et al., 1990; 19 Borsi et al., 1995). La repetición completa ED-B

tipo III, también conocido como la repetición B tipo extra III (EIIIB), puede estar incluido, u omitirse, por completo en la molécula de FN (20 Zardi et al., 1987). La ED-B está altamente conservada en las diferentes especies, con un 100% de homología en todos los mamíferos estudiados hasta el momento (humano, rata, ratón, perro) y un 96% de homología con un dominio similar en pollos. La isoforma FN que contiene ED-B (B-FN) no es detectable inmunohistoquímicamente en tejidos adultos normales, con la excepción de tejidos que están sufriendo una remodelación fisiológica (por ejemplo, endometrio y ovario) y durante la cicatrización de heridas (17 Carnemolla et al., 1989 21 French-Constant, et al., 1989). Por el contrario, su expresión en tumores y tejidos fetales es alta (17 Carnemolla et al., 1989). Aún más, se ha demostrado que B-FN es un marcador de la angiogénesis (22 Castellani et al., 1994) y que las células endoteliales que invaden los tejidos tumorales migran a lo largo de las fibras de la ECM que contienen B-FN (23 Tarli et al. 1999).

El reconocimiento dirigido selectivo de la vasculatura tumoral se describió usando un anticuerpo recombinante humano, el scFv(L19) (13 Pini et al., 98), específico de la isoforma B-FN (24 Carnemolla et al., 1996; 23 Tarli et al., 99; 25 Viti et al., 99; 26 Neri et al., 97; 27 Demartis et al., 2001). El anticuerpo se puede usar en enfoques de

diagnóstico *in vivo* (inmunocentellografía) y terapéuticos que abarcan el suministro selectivo de terapéutico radionucleidos o agentes tóxicos a la vasculatura tumoral. Además, Birchler et al. (28 1999) mostraron que el scFv(L19), acoplado químicamente a un fotosensibilizador, se acumula selectivamente en los vasos sanguíneos recién formados del modelo angiogénico de córnea de conejo y, después de irradiar con luz infrarroja cercana, interviene en una oclusión completa y selectiva de la neovascularidad ocular.

Más recientemente, Nilsson et al. (29 2001) informaron que el inmunoconjugado de scFv(L19) con el dominio extracelular del factor tisular interviene en el infarto selectivo en diferentes tipos de modelos de tumores en murinos. Aún más, las proteínas de fusión de scFv(L19) con IL-2 o IL-12 han mostrado una mayor eficacia terapéutica para estas dos citoquinas (30 Halin et al., enviada para su publicación; 31 Carnemolla et al., 2002). Véase también WO 01/62298 por el uso de fusiones en el tratamiento de lesiones de angiogénesis patológica, incluyendo tumores. Finalmente, dado que L19 reacciona igualmente bien con ED-B de ratón y humana, se puede usar en estudios tanto preclínicos como clínicos.

Véase también PCT/GB97/01412, PCT/EP99/03210, PCT/EP01/02062 y PCT/IB01/00382.

Las diferentes formas de anticuerpo han mostrado un comportamiento distinto en términos de estabilidad, depuración y rendimiento *in vivo* en el reconocimiento dirigido de tumores (32 Wu et al., 2000). En (33 Li et al., 1997) se describe una mini-inmunoglobulina o pequeña inmunoproteína (SIP).

La presente invención se basa en la preparación, caracterización e investigación de la biodistribución *in vivo* de moléculas de anticuerpo L19 humanas en diferentes formas, a saber, scFv, mini-inmunoglobulina e IgG1 completa, y marcación con radioisótopos.

#### Descripción breve de las figuras

En la figura 1 se muestran modelos que ilustran las estructuras de diferentes proteínas. A: Modelo de la estructura de un dominio de una subunidad de FN. Las secuencias de proteínas que sufren un procesamiento alternativo están indicadas con gris. Tal como se indica, el epítopo del anticuerpo recombinante L19 está localizado dentro de la repetición ED-B. B-D: Esquemas de las construcciones usadas para expresar, respectivamente, L19 (scFv) (B); L19-SIP (C); y L19-IgG1/κ.

En la figura 2 se muestran las curvas de crecimiento del tumor SK-MEL-28 en ratones desnudos (triángulos) y del tumor F9 en la cepa 129 de ratón (círculos). Se grafica el volumen (mm<sup>3</sup>) versus tiempo (días). Cada punto de dato

representa el promedio de seis ratones  $\pm$  DE.

En la figura 3 se muestran los resultados de cromatografía por exclusión de tamaño para las diferentes formas de L19. En los paneles A, B y C se muestran los perfiles de la cromatografía por exclusión del sitio (Superdex 200) de las formas de L19: scFv, mini-inmunoglobulina e IgG1, respectivamente, después de radioiodación. En los paneles D, E y F se muestran los perfiles de la cromatografía por exclusión de tamaño (Superdex 200) de plasma a los tiempos indicados después de inyección i.v. de las formas radioiodadas de L19, scFv, mini-inmunoglobulina e IgG1, respectivamente. No se detectaron cambios en los perfiles de las curvas de L19-SIP o L19-IgG1 cuando se cargaba plasma a diferentes tiempos después de la inyección, en tanto 3h después de inyección de L19(scFv)<sub>2</sub> se observó un segundo pico de mayor masa molecular.

En la figura 4 se muestran los resultados de los experimentos de biodistribución en ratones portadores del tumor SK-MEL-28 usando diferentes formas radioiodadas de la molécula de anticuerpo L19. Se informan las variaciones de % ID/g en tumor (Figura 4A) y en sangre (Figura 4B) a los tiempos indicados después de la inyección i.v.. En la figura 4C se grafican las relaciones del % ID/g en tumor-sangre. Las curvas de L19(scFv) están indicadas con rombos, la mini-

inmunoglobulina L19 con cuadrados y la IgG1 L19 con triángulos.

En la figura 5 se muestran los resultados de los experimentos de biodistribución en ratones portadores del tumor F9 usando L19(scFv) (cuadrados) y L19 mini-inmunoglobulina (rombos) radioiodados. Se informan las variaciones del % ID/g en tumor (A) y en sangre (B), a los diferentes tiempos indicados después de la inyección i.v..

En la figura 6 se muestra el cambio en el área del tumor U251 (milímetros cuadrados) en el tiempo (días) después de una inyección de solución salina fisiológica y de I-131-L19-SIP, respectivamente.

La presente invención se relaciona con elementos de unión específicos que se unen a la ED-B humana de la fibronectina, donde dichos elementos de unión específicos están marcados radioactivamente con uno o más isótopos seleccionados del grupo formado por  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  y  $^{211}\text{At}$ . La invención también provee métodos para producir dichos elementos de unión específicos y su uso en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

Los elementos de unión específicos de la invención mostraron propiedades favorables en experimentos con animales, tal como dosis más altas suministradas al tumor en comparación con la médula roja y una gran acumulación en el tumor.

En un aspecto, la presente invención provee un elemento de unión específico que se une a la ED-B humana de fibronectina y que comprende el dominio VH de L19 y un dominio VL, opcionalmente el dominio de VL de L19, donde el elemento de unión específico comprende una mini-inmunoglobulina que comprende dicho dominio de anticuerpo VH y dicho dominio de anticuerpo VL fusionados a  $\epsilon$ S2-CH4 y dimerizado o comprende una molécula de anticuerpo completa IgG1, y donde el elemento de unión específico está marcado radioactivamente con un isótopo seleccionado del grupo formado por  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  y  $^{211}\text{At}$ . Preferentemente, el radioisótopo es  $^{123}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  y con mayor preferencia es  $^{131}\text{I}$ .

Se puede ligar una marca radioactiva o una molécula marcada radioactivamente al elemento de unión específico por ejemplo, a un residuo tirosina, lisina o cisteína.

Las secuencias del dominio VH de L19 y del VL dominio de L19 se describen en Pini et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776, donde dichas secuencias se incorporan por completo con referencia a Pini et al. como si se describieran por completo en la presente.

En general, el dominio VH está apareado con un dominio VL para proveer un sitio de unión anticuerpo-antígeno. En una realización preferida, el dominio VH de L19 está apareado con el dominio VL de L19, de modo tal que se forma

un sitio de unión anticuerpo-antígeno que comprende ambos Dominios VH y VL de L19. En otras realizaciones, el VH L19 está apareado con un dominio VL distinto del VL L19. La promiscuidad de las cadenas livianas es un hecho bien establecido en el arte.

Se puede tomar una o más CDR del dominio VH o VL de L19 e incorporarla en un marco adecuado. Esto se describe con mayor detalle más adelante. Las CDR 1, 2 y 3 de VH L19 se muestran en las SEQ ID N°: 1, 2, y 3, respectivamente. Las CDR 1, 2 y 3 de VL L19 se muestran en las SEQ ID N°: 4, 5 y 6, respectivamente.

En una realización preferida, el elemento de unión específico es L19-SIP, con mayor preferencia L19-SIP marcado con  $^{123}\text{I}$  (denominado I-123-L19-SIP en la presente) o L19-SIP marcado con  $^{131}\text{I}$  (denominado I-131-L19-SIP en la presente).

Las variantes de los dominios VH y VL y las CDR cuyas secuencias se muestran en la presente y que se pueden emplear en los elementos de unión específico para ED-B, se pueden obtener mediante métodos de alteración o mutación y rastreo de las secuencias.

De acuerdo con la presente invención, se pueden emplear variantes de las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se describen específicamente en la presente, como se detalla más adelante. Las variantes particulares pueden

incluir una o más alteraciones (adicción, supresión, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido) de la secuencia de aminoácidos, menos que 20 alteraciones aproximadamente, menos que 15 alteraciones aproximadamente, menos que 10 alteraciones aproximadamente o menos que aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones se pueden efectuar en una o más regiones de marco de trabajo y/o en una o más CDR.

El elemento de unión específico acorde con la invención puede ser un elemento que compita por la unión al antígeno con un elemento de unión específico que también se una a ED-B y comprende un sitio de unión al antígeno formado por el dominio VH de L19 y el dominio VL de L19. La competencia entre elementos de unión puede evaluarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando un ELISA y/o por marcación con una molécula informante específica de un elemento de unión que pueda ser detectado en presencia de uno o más elementos de unión adicionales no marcados, con el fin de identificar los elementos de unión específicos que se unen al mismo epítopo o un epítopo superpuesto.

Por consiguiente, otros aspectos de la presente invención emplean un elemento de unión específico que comprende un sitio de unión de anticuerpo-antígeno humano que compite con L19 por la unión a ED-B.

El elemento de unión específico de acuerdo con la

presente invención se puede unir a ED-B con al menos la afinidad de L19, donde la afinidad de unión de los diferentes elementos de unión específicos se compara bajo las condiciones apropiadas.

Además de las secuencias de anticuerpo, el elemento de unión específico acorde con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo para formar un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse al antígeno. Los elementos de unión específicos de la invención pueden llevar una marca detectable o se pueden conjugar con una toxina o una enzima (por ejemplo a través de un enlace peptídico o un ligador).

Para el tratamiento de trastornos o lesiones patológicas por angiogénesis, el elemento de unión específico de la invención se puede conjugar con una molécula tóxica, por ejemplo una molécula biocida o citotóxica que se puede seleccionar entre interleuquina-2 (IL-2), doxorubicina, interleuquina-12 (IL-12), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y el factor tisular (preferentemente, un factor tisular truncado, por ejemplo, en los residuos 1-219). Véase, por ejemplo, WO 01/62298.

Los elementos de unión específicos acordes con la invención se pueden usar en un método de tratamiento o de

diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir un tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de un elemento de unión específico de la invención. Preferentemente, el elemento de unión específico acorde con la invención es administrado al paciente por administración parenteral. Las afecciones tratables de acuerdo con la presente invención incluyen tumores, en especial tumores sólidos, y otras lesiones patológicas por angiogénesis, incluyendo, artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad y angiomas.

Los elementos de unión específicos son muy adecuados para marcarlos radioactivamente con isótopos seleccionados del grupo formado por  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  y  $^{211}\text{At}$  y para su posterior uso en radiodiagnóstico y radioterapia.

Aún otro aspecto provee un método para producir un elemento de unión específico de la invención, que comprende marcar dicho elemento de unión específico con un radioisótopo seleccionado del grupo formado por  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  y  $^{211}\text{At}$ .

Para marcar radioactivamente al elemento de unión específico de forma directa, se pueden emplear grupos de tirosina presentes en la molécula como blancos. En este

procedimiento particular, el halogenuro, por ejemplo  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{At}^-$  es oxidado con un oxidante apropiado, por ejemplo Iodogen® (tubos recubiertos), esferas con iodo, cloramina-T (sal sódica de N-cloro-p-toluensulfonamida) etc. en presencia del ingrediente farmacéuticamente activo (API).

La marcación indirecta con, por ejemplo, bromo, yodo o astatina se puede efectuar por premarcación de un vehículo de halógeno bi-funcional, preferentemente derivado de, por ejemplo, derivados de ácido benzoico, derivados de Bolton-Hunter, derivados de benceno, etc. El vehículo se puede transformar en una especie activada que será conjugada al grupo  $\epsilon$ -amino de residuos lisina o al extremo N-terminal de API. Este método indirecto también provee una ruta de síntesis para marcar radioactivamente a compuestos peptídicos de una manera quimioselectiva en el grupo sulfhidrilo de un grupo cisteína. Primero se pueden reducir las moléculas con puente de cisteína con un agente reductor apropiado, por ejemplo, cloruro de estaño(II), Tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP), generando grupos cisteína SH libres que pueden reaccionar con el vehículo de halógeno. Como grupos funcionales para la unión se pueden emplear derivados maleimida y  $\alpha$ -bromo acetamida.

El método para producir un elemento de unión específico de acuerdo con la invención puede comprender la expresión del ácido nucleico que codifica el elemento de unión

específico antes de marcarlo. Por consiguiente, como un paso anterior, el método para producir el elemento de unión específico puede comprender opcionalmente causar o permitir la expresión a partir del ácido nucleico codificador, es decir de un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el elemento de unión específico. Dicho método puede comprender el cultivo de células huésped bajo condiciones que permiten producir dicho elemento de unión específico.

El método de producción puede comprender un paso de aislamiento y/o purificación del producto. El elemento de unión específico se puede aislar y/o purificar después de su expresión a partir del ácido nucleico, y/o se puede recuperar a partir de células huésped. El aislamiento y/o la purificación pueden ser anteriores a la marcación. Como alternativa o además, el elemento de unión específico se puede aislar y/o purificar después de la marcación.

El método de producción puede comprender la formulación del producto en una composición incluyendo al menos un componente adicional, tal como un excipiente aceptable para uso farmacéutico. Por consiguiente, el elemento de unión específico (marcado) puede ser formulado en una composición incluyendo al menos un componente adicional, tal como un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

Estos y otros aspectos de la invención se describirán a continuación con mayor detalle.

## TERMINOLOGÍA

### *Elemento de unión específico*

Esto describe a un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de un par de unión específica pueden ser naturales o total o parcialmente sintéticos. Uno de los miembros del par de moléculas tiene un área sobre su superficie, o una cavidad, que se une específicamente y por ello es complementaria de una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. Por consiguiente, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Los ejemplos de tipos de pares de unión específica son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. Esta solicitud se refiere a las reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

### *Molécula de anticuerpo*

Esta describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida de forma parcial o totalmente sintética. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que comprende un dominio de unión al anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión al antígeno son por ejemplo Fab, scFv, Fv, dAb, Fd y diabodies [fragmentos diméricos]. La presente invención se relaciona con moléculas de anticuerpo IgG1 completas y con mini-inmunoglobulinas que comprenden  $\epsilon_{s2}$ -CH4.

Se pueden emplear técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir, a partir de una molécula de anticuerpo inicial, otras moléculas de anticuerpo que retienen la especificidad de la molécula de anticuerpo original. Dichas técnicas pueden comprender la introducción de un ADN que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo contra las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones de marco de trabajo, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400.

Como los anticuerpos se pueden modificar de numerosas maneras, se considera que el término "molécula de anticuerpo" abarca cualquier elemento de unión específico o sustancia que tiene un dominio de unión anticuerpo-antígeno con la especificidad requerida. Por consiguiente, este término abarca fragmentos de anticuerpo y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión inmunoglobulina-antígeno, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por ello se incluyen las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o un equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

### *Dominio de unión al antígeno*

Este describe la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria de una parte o todo un antígeno. Cuando el antígeno es grande, el anticuerpo se puede unir solamente a una parte particular del antígeno, donde dicha parte se denomina epítope. El dominio de unión al antígeno puede ser provista por uno o más dominios variables del anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo denominado Fd que consiste de un dominio VH). Preferentemente, el dominio de unión al antígeno comprende una región variable de la cadena liviana (VL) del anticuerpo y una región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo.

### *Específico*

Este término se puede usar para hacer referencia a la situación en que un miembro de un par de unión específica no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distinta de sus pares de unión específicos. El término también se aplica cuando, por ejemplo, el dominio de unión del antígeno es específico para un epítope particular contenido en numerosos antígenos, en cuyo caso el elemento de unión específico que contiene el dominio de unión al antígeno podrá unirse a los diversos antígenos que contienen a dicho epítope.

### *Comprende*

Este término se usa en general en el sentido que

incluye, es decir, que permite la presencia de una o más características o componentes.

#### *Aislado*

Se refiere al estado en que los elementos de unión específicos de la invención, o el ácido nucleico que codifica dichos elementos de unión, se encuentran generalmente de acuerdo con la presente invención. Los elementos y el ácido nucleico estarán libres o sustancialmente libres del material con el que están asociados naturalmente, tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los cuales se hallan en su entorno natural, o el entorno en el cual se preparan (por ejemplo, un cultivo celular) cuando dicha preparación se efectúa con tecnología de ADN recombinante ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los elementos y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y aún considerarse aislado a los efectos prácticos: por ejemplo los elementos se mezclan normalmente con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos o se mezclan con vehículos o diluyentes aceptables para uso farmacéutico cuando se usan para diagnóstico o terapia. Los elementos de unión específicos pueden estar glicosilados, ya sea naturalmente o por sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NSO (ECACC 85110503) o no glicosiladas (por ejemplo, si son producidos por

expresión en una célula eucariota).

El término "sustancialmente definido" significa que la CDR o dominio VH o VL relevante de la invención será idéntica o altamente similar a las regiones especificadas cuya secuencia se describe en la presente. El término "altamente similar" significa que se pueden efectuar entre 1 y 5, preferentemente entre 1 y 4, tal como entre 1 y 3 ó 1 ó 2, o 3 ó 4, sustituciones en la CDR y/o el dominio VH o VL.

La estructura que lleva la CDR de la invención en general será de una secuencia de una cadena pesada o liviana de un anticuerpo, o una porción sustancial de la misma, donde la CDR está en una ubicación correspondiente a la CDR de los dominios variables VH y VL del anticuerpo natural codificados por genes reordenados de inmunoglobulina. Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de la inmunoglobulina se pueden determinar por referencia a (Kabat, E.A. et al, Protein Sequences of Immunological Interest. 5ª Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU. [*US Department of Health and Human Services*]. 1991, y actualizaciones de la misma, ahora disponible en Internet (<http://inmuno.bme.nwu.edu> o buscar "Kabat" usando cualquier buscador).

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la CDR sustancialmente definida en la presente es llevada como una CDR en un dominio variable humano o una porción sustancial

de la misma. Las secuencias de L19 VH CDR3 y/o L19 VL CDR3 sustancialmente definidas en la presente, se pueden usar en las realizaciones preferidas de la presente invención y se prefiere que cada una de ellas sea llevada como una CDR3 en un dominio variable de una cadena pesada o liviana humana, según sea el caso, o una porción sustancial del mismo.

La porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con las regiones de marco de trabajo de las mismas. Preferentemente, la porción también incluirá al menos un 50% aproximadamente de cualquiera o ambas primera y cuarta regiones de marco de trabajo, siendo un 50% del extremo C-terminal, un 50% de la primera región de marco de trabajo y el 50% del extremo N-terminal de la cuarta región de marco de trabajo. Puede haber residuos adicionales por el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable que son residuos que no están asociados normalmente con las regiones del dominio variable naturales. Por ejemplo, la construcción de los elementos de unión específicos de la presente invención se puede realizar mediante técnicas de ADN recombinante que dará como resultado la introducción de residuos N- o C-terminales codificados por ligadores introducidos para facilitar la clonación u otros pasos de manipulación. Dichos otros pasos de manipulación incluyen la introducción de ligadores para

unir los dominios variables de la invención a otras secuencias de proteínas, incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables o marcas de proteína, como se describirá con mayor detalle más adelante.

En una molécula de anticuerpo IgG1 de acuerdo con la presente invención, los dominios VL se pueden unir por el extremo C-terminal a los dominios constantes de la cadena liviana del anticuerpo, incluyendo las cadenas C $\kappa$  o C $\lambda$  humanas, preferentemente las cadenas C $\kappa$ .

Además de estar marcados con  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  y/o  $^{211}\text{At}$ , los elementos de unión específicos de la invención se pueden marcar con una segunda marca detectable o funcional. Las marcas detectables se describen a continuación, e incluyen radiomarcas tales como radioisótopos de Tecnecio, Indio, Itrio, Cobre, Lutecio o Renio, en particular  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  y  $^{67}\text{Cu}$ , que se pueden unir a los anticuerpos de la invención usando la química convencional conocida en el arte de detección por imágenes con anticuerpos como se describe en la presente. Otros radioisótopos que se pueden usar incluyen  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{43}\text{Sc}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{110\text{m}}\text{In}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{72}\text{Lu}$  y  $^{18}\text{F}$ .

Las marcas también incluyen marcas de enzimas, tal como peroxidasa de rábano picante. Las marcas incluyen además grupos químicos, tal como biotina, que pueden ser detectadas

a través de la unión a un grupo detectable conocido específico, por ejemplo avidina marcada.

A continuación se describe un ejemplo de un protocolo de marcación:

Para marcar radioactivamente los elementos de unión específicos de una forma directa, se reducen primero las moléculas con puente de cisteína utilizando un agente reductor apropiado, por ejemplo cloruro de estaño(II), Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), con lo que se generan grupos de SH-cisteína libres que pueden reaccionar con los isótopos de, por ejemplo, Tc o Re. En este procedimiento particular, los permetalatos obtenidos con el sistema generador son reducidos por un agente reductor, por ejemplo cloruro de estaño(II), en presencia de un ligando auxiliar, por ejemplo tartrato de sodio, y API (los detalles se describen más adelante en la sección experimental).

La marcación indirecta con por ejemplo indio, itrio, lantánidos o tecnecio y renio se puede realizar preconjugando un ligando quelante, preferentemente un derivado de ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminpentaacético (DTPA), ácido ciclohexil-1,2-diamintetraacético (CDTA), ácido etilenglicol-O,O'-bi(2-aminoetil)-N,N,N',N'-diacético (HBED), ácido trietilentetraaminhexaacético (TTHA), ácido 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecan-N,N',N''-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7--

tri-aza-ciclononan-N,N',N''-triacético (NOTA), ácido 1,4,8,12-tetra-aza-ciclotetradecan-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), mercaptoacetil diglicina (MAG<sub>2</sub>), mercaptoacetil triglicina (MAG<sub>3</sub>), mercaptoacetil glicil-cisteína (MAGC), cisteinil-glicil-cisteína (CGC), a grupos amina o tiol del elemento de unión específico. Los ligandos quelantes poseen un grupo de acoplamiento adecuado, por ejemplo grupos de ésteres activos, maleimidas, tiocarbamatos o acetamida  $\alpha$ -halogenada. Para conjugar los ligandos quelantes a los grupos amina, por ejemplo grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de residuos lisina, no se requiere una reducción previa del compuesto L19-SIP.

Los métodos de marcación de un elemento de unión específico pueden comprender conjugación de un vehículo de halógeno bi-funcional activado que contiene un radioisótopo seleccionado del grupo formado por <sup>76</sup>Br, <sup>77</sup>Br, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>131</sup>I y <sup>211</sup>At a un residuo lisina o al extremo N-terminal y a un residuo cisteína del elemento de unión específico. El método puede comprender la conjugación del vehículo de halógeno a un residuo lisina o cisteína del elemento de unión específico o al extremo N-terminal del elemento de unión específico. Uno o ambos entre (i) un residuo cisteína y (ii) un residuo lisina o el extremo N terminal, se pueden marcar con el mismo radioisótopo o uno diferente de acuerdo con la invención.

Los elementos de unión específicos de la presente invención están diseñados para su uso en métodos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, preferentemente humanos. Los elementos de unión específicos son especialmente adecuados para su uso en métodos de radioterapia y radiodiagnóstico.

Por lo tanto, otros aspectos de la invención proveen métodos de tratamiento que comprenden la administración de un elemento de unión específico provisto, composiciones farmacéuticas que comprenden dicho elemento de unión específico y el uso de dicho elemento de unión específico en la elaboración de un medicamento para su administración, por ejemplo, en un método para elaborar un medicamento o una composición farmacéutica que comprende formular el elemento de unión específico con un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

Las indicaciones clínicas en las cuales se puede usar un elemento de unión específico de la invención para proveer un beneficio terapéutico incluyen tumores tal como cualquier tumor sólido, también otras lesiones de angiogénesis patológica, incluyendo artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad y angiomas.

Los elementos de unión específicos de acuerdo con la invención se pueden usar en un método de tratamiento del

cuerpo human o de un animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir un tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un elemento de unión específico de la invención. Preferentemente, el tratamiento es una radioterapia. Las afecciones que pueden ser tratadas de acuerdo con la presente invención se describen en otra parte en la presente.

Los elementos de unión específicos de acuerdo con la invención se pueden usar en una detección por imágenes SPECT, detección por imágenes PET y en una terapia. Los isótopos preferidos para una detección por imágenes SPECT incluyen  $^{123}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$ . El isótopo preferido para PET es  $^{124}\text{I}$ . El  $^{131}\text{I}$  es el isótopo preferido para su uso en terapias.

Debido al uso de diferentes isótopos de un elemento para la detección por imágenes y terapias, la biodistribución de los respectivos inmunoconjugados es idéntica. Esto constituye una ventaja en comparación con otros enfoques que emplean derivados marcados con  $^{111}\text{In}$  para la detección por imágenes con el fin de predecir la biodistribución de los respectivos derivados terapéuticos marcados con  $^{90}\text{Y}$  porque la biodistribución de los correspondientes derivados marcados con  $^{111}\text{In}$  e  $^{90}\text{Y}$  podría ser diferente; véase Carrasquillo J.A. et al. (1999) J Nucl

Med 40: 268-276.

Por lo tanto, otros aspectos de la invención proveen métodos de tratamiento que comprenden la administración de un elemento de unión específico provisto en la presente, composiciones farmacéuticas que comprenden dicho elemento de unión específico y el uso de dicho elemento de unión específico en la elaboración de un medicamento para su administración, por ejemplo, en un método de elaboración de un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el elemento de unión específico con un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones provistas pueden ser administradas a individuos. La administración es preferentemente de una "cantidad eficaz para uso terapéutico", siendo ésta suficiente como para beneficiar al paciente. Dicho beneficio puede ser al menos el alivio de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la dosis y los tiempos de administración, dependerán de la naturaleza y severidad de lo que está en tratamiento. La prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones acerca de la dosificación, etc, es responsabilidad de los especialistas practicantes en general y otros profesionales médicos. Las dosis apropiadas de anticuerpo son bien conocidas en el arte; véase Ledermann J.A. et al. (1991) Int J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe K.D,

et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915922.

La composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o sucesivamente dependiendo de la afección a tratar.

Los elementos de unión específicos de la presente invención, incluyendo los que comprenden un dominio de unión anticuerpo-antígeno, pueden ser administrados a un paciente que necesita el tratamiento por cualquier ruta adecuada, habitualmente por inyección en el torrente sanguíneo y/o directamente en el sitio a tratar, por ejemplo un tumor. Preferentemente, el elemento de unión específico se administra por vía parenteral. La dosis precisa dependerá de numerosos factores, de la ruta de tratamiento, del sitio y la ubicación del área a tratar (por ejemplo un tumor), de la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, una molécula de anticuerpo IgG1 completa, una molécula de mini-inmunoglobulina) y de la naturaleza de toda marca detectable u otra molécula unida a la molécula de anticuerpo. La dosis típica de anticuerpo se encontrará en el rango de 10-50 mg.

Esta es la dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que puede ser ajustada proporcionalmente para bebés y niños, y también se puede ajustar para otras formas de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos se pueden repetir a intervalos de días, dos

veces por semana, semanalmente o mensualmente, a discreción del profesional a cargo.

Los elementos de unión específicos de la presente invención habitualmente serán administrados en la forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del elemento de unión específico.

Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, vehículo, solución amortiguadora, estabilizante u otros materiales aceptables para uso farmacéutico bien conocidos por los especialistas en el arte. Dichos materiales deberían ser no tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral o por inyección, por ejemplo intravenosa.

Para la inyección intravenosa, o la inyección en el sitio de la enfermedad, el ingrediente activo se encontrará en la forma de una solución acuosa aceptable para uso parenteral que se encuentre libre de pirógenos y tenga valores de pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los especialistas en el arte podrán preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tal como cloruro de sodio para inyectables, solución de Ringer

para inyectables, solución de Ringer lactato para inyectables. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, soluciones amortiguadoras, antioxidantes y/u otros aditivos, según necesidad.

La composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o sucesivamente dependiendo de la afección a tratar. Dichos otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuado de drogas contra el dolor, tal como drogas anti-inflamatorias no esteroides (por ejemplo aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiatos tal como morfina, o anti-eméticos.

La presente invención provee a método que comprende causar o permitir la unión de un elemento de unión específico provista en la presente a ED-B. Tal como se indicara, dicha unión puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo después de la administración de un elemento de unión específico o de un ácido nucleico que codifica un elemento de unión específico, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en un ELISA, transferencia Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad.

Se puede determinar la cantidad de unión del elemento de unión específico a ED-B. La cuantificación puede relacionarse con la cantidad de antígeno en una muestra de

prueba, que puede ser de interés para diagnóstico.

Las reactividades de los anticuerpos para una muestra puede determinarse usando cualquier medio apropiado. El radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. El antígeno marcado radioactivo se mezcla con antígeno sin marcar (la muestra de prueba) y se deja que se una al anticuerpo. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radioactivo unido al anticuerpo. Cuanto más antígeno hay en la muestra de prueba menos antígeno radioactivo se unirá al anticuerpo. También se puede usar un ensayo de unión competitiva con antígeno no radioactivo, usando un antígeno o un análogo ligado a la molécula informante. La molécula informante puede ser un fluoróforo, fósforo o un colorante láser con características de absorción o emisión separadas en el espectro. Los fluoróforos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y rojo Texas. Los colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

Otros informantes incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado tal como esferas de látex coloreadas, magnéticas o paramagnéticas y agentes biológica o químicamente activos que pueden generar, directa o indirectamente, señales detectables que pueden ser observadas visualmente, detectadas electrónicamente o registradas de otra manera. Estas moléculas pueden ser

enzimas que catalizan reacciones que desarrollan o cambian de color o, por ejemplo, que causan cambios en las propiedades eléctricas. Pueden ser molecularmente excitables, de modo tal que las transiciones electrónicas entre los estados de energía dan como resultado espectros de absorción o emisión característicos. Pueden incluir las entidades químicas usadas junto con biosensores. Se puede emplear asimismo los sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

Las señales generadas por los conjugados individuales de anticuerpo-informante se pueden usar para derivar datos absolutos o relativos cuantificables de la unión del anticuerpo relevante en las muestras (normal y de prueba).

La presente invención se extiende además a un elemento de unión específico que compite por la unión a ED-B con cualquier elemento de unión específico que se una al antígeno y comprenda un dominio V incluyendo una CDR con la secuencia de aminoácidos sustancialmente como la que se define en la presente, preferentemente un dominio VH que comprenda la VH CDR3 de la SEQ ID N°: 3. La competencia entre los elementos de unión puede ser evaluada fácilmente *in vitro*, por ejemplo marcando una molécula informante específica para un elemento de unión que puede ser detectado en presencia de otro u otros elementos de unión no marcados,

para facilitar la identificación de los elementos de unión específicos que se unen al mismo epítopo o a un epítopo superpuesto. La competencia se puede determinar, por ejemplo, usando un ELISA como se describe en Carnemolla et al. (24 1996).

Como se estableciera precedentemente, los métodos para producir elementos de unión específicos acordes con la invención pueden comprender expresar un ácido nucleico codificante, y puede comprender opcionalmente el cultivo de células huésped bajo condiciones que permitan producir el elemento de unión específico. Los elementos de unión específicos y las moléculas de ácido nucleico codificante y de vectores de acuerdo con o para su uso en la presente invención se pueden proveer aisladas y/o purificadas, por ejemplo a partir de su entorno natural, en una forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácidos nucleicos o genes de un origen distinto al de la secuencia que codifica el polipéptido con la función requerida.

El ácido nucleico usado de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a la secuencia de nucleótidos definida en la presente abarca una molécula ADN de la secuencia específica y abarca una molécula de ARN de la secuencia específica en la cual U sustituye a T, a menos

que el contexto indique lo contrario.

Los sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en diversas células huésped diferente son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas de células de mamífero disponibles en el arte para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido, células de melanoma NSO de ratón y muchas otras. El huésped bacteriano más común y preferido es *E. coli*.

La expresión de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas, tal como *E. Coli*, está bien establecida en el arte. Por una revisión, véase, por ejemplo, Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los especialistas en el arte como una opción para producir un elemento de unión específico, véase las revisiones recientes de, por ejemplo, Ref, M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560.

Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, para que contengan las secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras,

genes marcadores y otras secuencias según corresponda. Los vectores pueden ser plásmidos, virales por ejemplo fagos, o fagémidos, según corresponda. Por detalles adicionales véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3ª Edición, Sambrook et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Hay muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo para la preparación de construcciones de ácido nucleico, de mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión genética, y análisis de proteínas, que se describen con detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. Las explicaciones de Sambrook et al. y Ausubel et al. se incorporan en la presente a modo de referencia.

El método para producir un elemento de unión específico de acuerdo con la invención puede comprender además la introducción de un ácido nucleico codificante en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección por fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación por cloruro de

calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos.

Después de la introducción se puede causar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo por cultivo de células huésped bajo condiciones que permitan la expresión del gen.

En una realización, el ácido nucleico de la invención está integrado en el genoma (por ejemplo, el cromosoma) de la célula huésped. La integración puede promoverse por inclusión de las secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

Otros aspectos y realizaciones de la presente invención serán evidentes para los especialistas en el arte a la luz de la presente explicación incluyendo los siguientes ejemplos experimentales. Los métodos de síntesis y marcación de los elementos de unión específicos de la presente invención se ilustran de manera más acabada en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se ofrecen a modo ilustrativo y no en un sentido limitativo. Todos los documentos mencionados en cualquier parte de esta memoria descriptiva se incorporan a modo de referencia.

#### **EJEMPLOS EXPERIMENTALES DE ASPECTOS Y REALIZACIONES DE LA PRESENTE INVENCION**

##### 1. Preparación y caracterización de los elementos de unión específicos de acuerdo con la presente invención

Los siguientes ejemplos emplean compuestos peptídicos

L19-SIP marcados radioactivamente.

#### 1.1 Síntesis de I-131-L19-SIP (Método de cloramina-T)

Se colocaron 200 µg de L19-SIP en 230 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) en un vial de reacción, se mezclaron con 185 MBq de [ $^{131}\text{I}$ ]NaI y se hicieron reaccionar con 30 µl de una solución recién preparada de cloramina-T (2 mg/ml) en PBS 0,2 M (pH 7,4). Después de 1 min, se agregaron 50 µl de una solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (10 mg/ml en PBS 0,2 M, pH 7,4). El L19-SIP marcado con  $^{131}\text{I}$  se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino 0,5% en PBS.

|                           |                    |
|---------------------------|--------------------|
| Rendimiento radioquímico: | 45,7 %.            |
| Pureza radioquímica:      | 88,3 % (SDS-PAGE). |
| Actividad específica:     | 31,7 MBq/nmol.     |
| Inmunorreactividad:       | 76 %               |

#### 1.2 Síntesis de I-131-L19-SIP (Método con Iodogen)

Se mezclaron 800 µg de L19-SIP en 800 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) y 500 MBq de [ $^{131}\text{I}$ ]NaI y se colocaron en un vial de reacción (tubo Iodogen, Pierce Inc.). La mezcla se agitó suavemente, sobre un período de 30 min a temperatura ambiente. El L19-SIP marcado con  $^{131}\text{I}$  se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino 0,5 % en PBS.

|                           |                    |
|---------------------------|--------------------|
| Rendimiento radioquímico: | 93,2 %.            |
| Pureza radioquímica:      | 91,1 % (SDS-PAGE). |
| Actividad específica:     | 46,6 MBq/nmol.     |
| Inmunorreactividad:       | 78 %               |

### 1.3 Síntesis de 1-123-L19-SIP (método con Iodogen)

Se mezclaron 200 µg de L19-SIP en 230 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) y 200 MBq de [<sup>123</sup>I]NaI y se colocaron en un vial de reacción (tubo Iodogen, Pierce Inc.). La mezcla se agitó suavemente sobre un período de 30. min a temperatura ambiente. El L19-SIP marcado con <sup>123</sup>I se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino 0,5 % en PBS.

|                           |                    |
|---------------------------|--------------------|
| Rendimiento radioquímico: | 81,6 %.            |
| Pureza radioquímica:      | 89,6 % (SDS-PAGE). |
| Actividad específica:     | 61,2 MBq/nmol.     |
| Inmunorreactividad:       | 84 %               |

### 1.4 Síntesis de I-124-L19-SIP (método con Iodogen)

Se mezclaron 200 µg de L19-SIP en 230 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) y 50 MBq de [<sup>124</sup>I]NaI y se colocaron en un vial de reacción (tubo Iodogen, Pierce Inc.). La mezcla se agitó suavemente, sobre un período de 30 min a temperatura ambiente. El L19-SIP marcado con <sup>124</sup>I se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero

bovino 0,5 % en PBS.

Rendimiento radioquímico: 84,5 %.

Pureza radioquímica: 89,6 % (SDS-PAGE).

Actividad específica: 22.8 MBq/nmol.

Inmunorreactividad: 86 %

#### 1.5 Síntesis de (3-(4-hidroxi-3-<sup>131</sup>I)iodo-fenil) - propionato)-L19-SIP

Se disolvieron 500 µg de (3-(4-hidroxi-fenil)-N-(sulfonato-succinimidil)propionato) en 1 ml de DMSO. Se mezclaron diez microlitros de cloramina-T (5 mg/ml en PBS) con 74 MBq de [<sup>131</sup>I]NaI, neutralizado con 15 µl de PBS (0,2 M, pH 7,4). Se agregó un microlitro de la solución de (3-(4-hidroxi-fenil)-N-(sulfonato-succinimidil)propionato) a la solución de cloramina-T/[<sup>131</sup>I]NaI y se dejó que la mezcla reaccionara durante 1 min. La reacción se detuvo por adición de 40 µl de una solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (10 mg/ml en PBS 0,2 M, pH 7,4), seguido de la adición inmediata de 200 µg de L19-SIP en 230 µl de solución amortiguadora de borato (PBS 0,2 M, pH 8,5).

El compuesto (3-(4-hidroxi-3-[<sup>131</sup>I]iodo-fenil)-propionato)-L19-SIP se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino 0,5 % en PBS.

Rendimiento radioquímico: 37,2 %.

Pureza radioquímica: 94,6 % (SDS-PAGE).  
 Actividad específica: 10,3 MBq/nmol.  
 Inmunorreactividad: 69 %

#### 1.6 Cálculos MIRD para I-131-L19-SIP

Basado en los datos de biodistribución en ratones portadores del tumor, se pudo calcular la dosis absorbida de L19-SIP marcado con I-131 utilizando la fórmula MIRD. El modelo biocinético se obtuvo con los datos ID para I-131-L19-SIP en ratones portadores del glioblastoma humano (U251). Los tiempos de residencia se calcularon como las áreas bajo la curva de funciones bi- y monoexponenciales integradas de cero a infinito incluyendo la vida media biológica y física del compuesto.

Considerando los órganos de ratón como fuente de radiación y como blanco de radiación, se pudo estimar la dosis absorbida por órgano como una autodosis (sin radiación cruzada) para I-131-L19-SIP usando los valores S del software MIRDOSE 3.1.

Dosis por órgano de ratón (mGy/ MBq):

|         |                                                                                 |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Hígado  | 50                                                                              |
| Riñones | 160                                                                             |
| Bazo    | 50                                                                              |
| Pulmón  | 220                                                                             |
| Ovarios | 180-410 (dependiendo del estado del ciclo ovulatorio y de la expresión de ED-B) |

|             |     |                                                                         |
|-------------|-----|-------------------------------------------------------------------------|
| Útero       | 600 | (dependiendo del estado del ciclo ovulatorio y de la expresión de ED-B) |
| Testículos  | 55  |                                                                         |
| Sangre      | 130 |                                                                         |
| Médula roja | 50  | (cálculo basado en la dosis para sangre)                                |
| Tumor       | 940 | (calculado para un tumor de 100 mg)                                     |

Usando los tiempos de residencia calculados en el programa MIRDOSE 3.1, se puede calcular la dosis absorbida para humanos para I-131-L19-SIP.

Dosis por órgano en humanos (mGy/ MBq):

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Adrenales         | 9,46E-02 |
| Cerebro           | 1,64E-02 |
| Mamas             | 7,33E-02 |
| Vesícula biliar   | 1,00E-01 |
| Pared LLI         | 4,47E-01 |
| Intestino delgado | 1,10E-01 |
| Estómago          | 9,45E-02 |
| Pared ULI         | 2,11E-01 |
| Pared del corazón | 6,22E-02 |
| Riñones           | 1,86E-01 |
| Hígado            | 7,46E-02 |
| Pulmones          | 7,04E-02 |
| Músculo           | 8,71E-02 |
| Ovarios           | 8,07E-01 |
| Páncreas          | 1,15E-01 |

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Médula roja              | 9,11E-02 |
| Superficie ósea          | 9,74E-02 |
| Piel                     | 7,20E-02 |
| Bazo                     | 7,11E-02 |
| Testículos               | 2,38E-01 |
| Tiroides                 | 8,55E-02 |
| Tiroide                  | 8,54E-02 |
| Pared de vejiga urinaria | 7,19E-01 |
| Útero                    | 4,72E-01 |
| Cuerpo completo          | 8,78E-02 |
| EQUIV DOSIS EFICAZ       | 3,60E-01 |
| DOSIS EFICAZ             | 3,21E-01 |

Se concluyó que la médula roja y los órganos reproductores (ovarios/útero y testículos) serían los órganos limitantes de la dosis. Sin embargo, la ventana terapéutica según los cálculos dosimétricos parecía favorable y promisorio. Se encontró una relación de dosis de tumor a dosis de médula roja de 18. Por consiguiente, I-131-L19-STP presentó una dosis notable 18 veces más alta administrada al tumor que a la médula roja.

*1.7 Estudio de tratamiento de tumores después de una sola inyección i.v. de I-131-L19-SIP en ratones desnudos portadores de tumores*

Se inyectó I-131-L19-SIP una vez por vía intravenosa en ratones desnudos portadores de U251 (glioblastoma) (peso

corporal de 27 g aproximadamente). Las dosis investigadas fueron de 37 MBq y 74 MBq, respectivamente. Además, se investigó un grupo de animales control (inyectados una vez con solución salina fisiológica). Durante los días después de la inyección, se determinó el tamaño del tumor (en mm<sup>2</sup>) usando un calibre.

El crecimiento de tumores U251 en ratones desnudos monitoreado después de una sola inyección intravenosa de solución salina fisiológica y de I-131-L19-SIP, respectivamente, se muestra en la figura 6.

Una sola inyección de I-131-L19-SIP a razón de 74 MBq por animal mostró un efecto pronunciado sobre el crecimiento de tumores U251 dando como resultado una estasis durante 18 días. Lo mismo se cumplió para el grupo de dosis baja (37 MBq) excepto por un ligero crecimiento del tumor que comenzó durante los últimos 5 días para el grupo de dosis baja. Por el contrario, los tumores del grupo control crecieron de forma continua durante todo el período de observación.

Los resultados de esta investigación muestran el excelente potencial de I-131-L19-SIP para el tratamiento de tumores sólidos.

*1.8 Detección por imágenes de I-123-L19-SIP después de una sola inyección i.v. en ratones desnudos portadores de tumores*

La sustancia de la invención se inyectó por vía

intravenosa a una dosis de 9,25 MBq aproximadamente en ratones desnudos portadores de F9 (teratocarcinoma) (peso corporal 25 g aproximadamente). La detección por imágenes con cámara gamma se realizó a distintos tiempos después de administrar la sustancia.

La centellografía lineal de I-123-L19-SIP en Ratones desnudos portadores de F9 (teratocarcinoma) 4 horas después de la inyección y 24 horas después de la inyección, permitió observar claramente el tumor. A las 4 horas después de la inyección, además de la fuerte captación en el tumor solamente se pudo detectar un ligero nivel basal en el resto del cuerpo (no unido a un órgano particular sino derivado de la sangre). En tanto se mantuvo la señal en el tumor, la señal basal en el resto del cuerpo desapareció en el tiempo. Por consiguiente, a las 24 horas de post-inyección solamente se pudo detectar al tumor.

Los resultados de esta investigación muestran el excelente potencial de I-123-L19-SIP para la detección por imágenes de tumores sólidos.

## 2. Ejemplos y experimentos adicionales

### MATERIALES Y MÉTODOS.

*Preparación y expresión de scFv, inmunoproteína pequeña (SIP) y construcciones de scFv IgG1*

El scFv(L19) (Figura 1A) es un fragmento de anticuerpo madurado por afinidad ( $K_d = 5,4 \times 10^{11}$  M) dirigido

específicamente contra el dominio ED-B de la fibronectina (13 Pini et al., 1998). Se usó scFv(D1.3) (7 McCafferty et al.; 26 Neri et al., 1997), una scFv lisozima anti-clara de huevo de ratón como control. Estos scFv fueron expresados en la Cepa HB2151 de E. coli (Maxim Biotech, San Francisco CA) de acuerdo con Pini et al. (34 1997).

#### *Mini-inmunoglobulina*

Para construir el gen de la inmunoproteína pequeña L19 (L19-SIP) (Figura 1C) se amplificó la secuencia de ADN que codifica scFv(L19) con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando la ADN polimerasa Pwo (Roche), de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, usando los cebadores BC-618 (gtgtgcactcggaggtgcagctgttggagtctggg: SEQ ID N°: 8) y BC619 (gcctccggatttgatttccaccttggtcccttgccc: SEQ ID N°: 9), que contiene los sitios de restricción ApaLI y BspEI, respectivamente. El producto de la amplificación insertó en ApaLI/BspEI en el vector pUT- $\epsilon$ SIP, que permite obtener al gen scFv con una señal de secreción, necesaria para la secreción de proteínas hacia el medio extracelular. El vector pUT- $\epsilon$ SIP se obtuvo del vector pUT-SIP-long descrito previamente (33 Li et al., 1997) después de sustituir el dominio  $\gamma$ 1-CH3 constante humano por el dominio CH4 de la isoforma secretora humana IgE IgE-S2 ( $\epsilon_{s2}$ -CH4; 35 Batista et al., 1996). CH4 es el dominio que permite la dimerización en la molécula de IgE y la isoforma  $\epsilon_{s2}$  contiene

una cisteína por el extremo carboxilo terminal, que estabiliza al dímero IgE a través de un enlace disulfuro entre cadenas. En la molécula SIP final el ScFv(L19) se ligó con el dominio  $\epsilon_{S2}$ -CH4 por medio de un ligador corto GGSG. El gen SIP se recortó luego del plásmido pUT- $\epsilon$ SIP-L19 con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI y se clonó en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, Los Países Bajos), que contiene al promotor del citomegalovirus (CMV), con el fin de obtener la construcción pcDNA3-L19-SIP.

La secuencia de ADN que codifica scFv(D1.3) se amplificó usando los cebadores BC-721 (ctcgtgcactcgcaggtgcagctgcaggagtca: SEQ ID N°: 10) y BC-732 (ctctccggaccggtttgatctcgcgcttggt: SEQ ID N°: 11) y se insertó en ApaLI/BspEI en el vector pUT- $\epsilon$ SIP. El gen D1.3-SIP se recortó luego del vector pUT- $\epsilon$ SIP-D1.3 con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI y se clonó en el pcDNA3, con el fin de obtener la construcción pcDNA3-D1.3-SIP.

Estas construcciones se usaron para transfectar células de mieloma murino SP2/0 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.) usando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche) según el protocolo para células adherentes, optimizado por el proveedor. Los transfectomas se cultivaron en DMEM suplementado con FCS 10% y se seleccionaron usando geneticina 750  $\mu$ g/ml (G418,

Calbiochem, San Diego, CA).

#### *IgG1*

Para preparar IgG1 completa, se recortó la región variable de la cadena pesada de L19 (L19-VH), junto con su secuencia del péptido de secreción, con HindIII y XhoI del L19-pUT- $\kappa$ SIP descrito previamente y se insertó en el vector pUC-IgG1, que contiene al gen de la cadena pesada constante humana  $\gamma 1$  completa. El gen IgG1 recombinante se recortó luego del pUC-IgG1-L19-VH con HindIII y EcoRI y se clonó en el pcDNA3, para obtener la construcción pcDNA3-L19-IgG1.

Para preparar la cadena liviana L19 completa, se amplificó L19-VL a partir de L19-pUT- $\kappa$ SIP (descrito precedentemente) por PCR usando los cebadores BC-696 (tggtgtgcactcggaaattgtgttgacgcagtc: SEQ ID N°: 12) y BC-697 (ctctcgtacgtttgatttccaccttggtcc: SEQ ID N°: 13), que contienen a los sitios de restricción ApaLI y BsiWI, respectivamente. Después de una digestión con ApaLI y BsiWI, el producto de la amplificación se insertó en el vector pUT-SEC-hCk que contiene la secuencia de la señal de secreción y la secuencia de la cadena liviana constante  $\kappa$  humana. El gen recombinante de la cadena liviana se recortó luego del pUT-SEC-hCk-L19-VL con HindIII y XhoI y se insertó en el pCMV2 $\Delta$ , un vector de expresión de mamíferos, derivado del vector pcDNA3 por eliminación del gen de resistencia a G418, para obtener la construcción pCMV2 $\Delta$ -L19- $\kappa$ .

Se usaron cantidades equimolares de estas construcciones para cotransfectar células de mieloma murino SP210 según se describió precedentemente. Los clones seleccionados con geneticina fueron examinados en un ELISA por su capacidad para secretar la inmunoglobulina quimérica, completa con las cadenas pesada y liviana.

Todas las construcciones de ADN fueron purificadas usando el sistema Maxiprep de Qiagen (Hilden, Alemania) y se confirmaron las secuencias de ADN de ambas cadenas de las construcciones usando el conjunto de elementos dRhodamina Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction ABI PRISM (Perkin Elmer, Foster City, CA). Todas las enzimas de restricción (RE) eran de Roche Diagnostics (Milano, Italia), con la excepción de BsiWI (New England Biolabs, Beverly, MA). Después de la digestión con RE, los insertos y los vectores se recuperaron de geles de agarosa usando el método Qiaquick (Qiagen).

#### *Purificación y control de calidad de los anticuerpos*

Se realizó una cromatografía por inmunoafinidad para purificar los diferentes anticuerpos de acuerdo con el procedimiento descrito por Carnemolla et al. (24 1996).

Se usó ED-B conjugado con Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia) según las instrucciones del proveedor (24 Carnemolla et al., 96) inmunopurificar todas las diferentes formas del anticuerpo L19, en tanto se

usó una columna de lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma, St. Louis, EE.UU.) conjugado con Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) para los anticuerpos D1.3.

Las formas inmunopurificadas de los anticuerpos L19-SIP y L19-IgG1 no requirieron purificación adicional y fueron dializadas contra PBS, pH 7,4, a +4°C. Dado que los scFv obtenidos de la cromatografía por inmunoafinidad están constituidos por dos formas, monomérica y dimérica, se necesitó un segundo paso de purificación, como describieron Demartis et al. (27 2001), para aislar esta última forma. Se prepararon lotes de las diferentes formas de anticuerpo y se analizaron usando SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras, inmunohistoquímica, cromatografía por exclusión del sitio (Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech) y experimentos de ELISA.

Los experimentos de electroforesis sobre gel dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), cromatografía por exclusión de tamaño y ELISA con examen inmunohistoquímico del medio de cultivo condicionado se efectuó de acuerdo con Carnemolla et al. (24 1996). Para revelar la expresión de las diferentes formas del anticuerpo L19, se inmovilizó el fragmento recombinante 7B89 (24 Carnemolla et al., 1996), que contiene el dominio ED-B de FN, que incluye al epítopo reconocido por el L19, sobre inmunoplasmas Maxisorp (Nunc,

Roskilde, Dinamarca). Para detectar los anticuerpos D1.3 en los experimentos de ELISA, se inmovilizó la lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma) sobre una superficie NH<sub>2</sub> de placas EIA (Costar, Cambridge, MA). Se usó una IgE anti-humana de conejo conjugada con peroxidasa (Pierre, Rockford, IL), diluida de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, como anticuerpo secundario para detectar los SIP. Se usó una IgG anti-humana de conejo conjugada con peroxidasa (Pierre) en el caso de la IgG1. Para los scFv que contienen la secuencia de marca FLAG, se usó un anticuerpo monoclonal anti FLAG humano de ratón (M2, Kodak) y un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Pierre) como anticuerpos secundarios y terciarios, respectivamente. En todos los casos, se detectó la inmunorreactividad con el antígeno inmovilizado usando el sustrato ABTS para peroxidasa (Roche) y se midió la absorbancia fotométrica a 405 nm.

Se usó una columna para cromatografía Superdex 200 (Amersham Pharmacia) para analizar los perfiles de filtración por gel de los anticuerpos purificados bajo condiciones nativas usando cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC; Amersham Pharmacia). La inmunohistoquímica para diferentes secciones de tejido congelado se efectuó según describieron Castellani et al. (22 1994) y se aplicó un gradiente de SDS-PAGE 4-18% de acuerdo con Carnemolla et

al. (17 1989) bajo condiciones reductoras y no reductoras.

#### *Animales y líneas celulares*

Se obtuvieron ratones atímicos desnudos (hembras CD1 de 8 semanas de vida nude/nude) de Harlan Italia (Correzzana, Milano. Italia), ratones de la cepa 129 (clon SvHsd) (8-10 semanas de vida, hembras) de Harlan UK (Oxon, Inglaterra). Se adquirieron células de teratocarcinoma embrionarias de ratón (F9), células derivadas de melanoma humano (SK-MEL-28) y células de mieloma de ratón (SP2/0) de American Type Culture Collection (Rockville, MD). Para inducir la formación de tumores, los ratones desnudos recibieron inyecciones por vía subcutánea de  $16 \times 10^6$  células SK-MEL-28 y los ratones de la cepa 129  $3 \times 10^6$  células F9. El volumen tumoral se determinó con la siguiente fórmula:  $(d)^2 \times D \times 0,52$ , donde d y D son, respectivamente, las dimensiones corta y larga (cm) del tumor, medidas con un calibre. El albergue, los tratamientos y el sacrificio de los animales se efectuaron de acuerdo con la legislación nacional vigente (Ley de Italia N° 116 del 27 de enero, 1992) con respecto a la protección de animales usados con fines científicos.

#### *Radioiodación de los anticuerpos recombinantes*

La radioiodación de las proteínas se realizó según el método indirecto de Chizzonite (36 Riske et al., 1991) usando tubos de iodación pre-recubiertas IODOGEN (Pierce) para activar  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (NEN Life Science Products, Boston, MA) de

acuerdo con las recomendaciones del proveedor. En los experimentos informados, se usó 1,0 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  para 0,5 mg de proteína. Las moléculas marcadas radioactivamente se separaron del  $^{125}\text{I}$  libre usando columnas PD10 (Amersham Pharmacia) pre-tratadas con BSA 0,25% y equilibradas en PBS. La radioactividad de las muestras se estableció usando un contador  $\gamma$  Crystal (Packard Instruments, Milano, Italia). El ensayo de inmunorreactividad de la proteína marcada radioactivamente se efectuó con una columna de ED-B Sepharose de 200  $\mu\text{l}$  saturada con BSA 0,25% en PBS. Se aplicó una cantidad conocida de anticuerpo radioiodado, en 200  $\mu\text{l}$  de BSA 0,25% en PBS, por arriba y se dejó que ingresara en la columna. A continuación, se lavó la columna con 1,5 ml de BSA 0,25% en PBS para eliminar los anticuerpos que no se unieron específicamente. Finalmente, se eluyó el material inmunorreactivo unido usando 1,5 ml de TEA 0,1 M, pH 11. Se efectuó un recuento de la radioactividad de material no unido y unido y se calculó el porcentaje de anticuerpos inmunorreactivos. La inmunorreactividad era siempre mayor que un 90%.

Para analizar aún más los anticuerpos radioiodados se cargó una cantidad conocida de proteína marcada radioactivamente en 200  $\mu\text{l}$  a la columna Superdex 200. El volumen de retención de las diferentes proteínas no varió después de la radioiodación. Para las tres formas de

anticuerpo L19 radioiodadas y sus controles negativos, la recuperación de la radioactividad de la columna Superdex 200 era del 100% (Figura 3A, 3B y 3C).

#### Experimentos de biodistribución

Para bloquear la acumulación no específica del  $^{125}\text{I}$ odo en el estómago y la concentración en tiroides, 30 minutos antes de inyectar los anticuerpos marcados radioactivamente, los ratones recibieron por vía oral 20 mg de perclorato de sodio (Carlo Erba, Italia) en agua. Este procedimiento se repitió a intervalos de 24h por toda la duración de los experimentos de biodistribución. Los ratones portadores del tumor recibieron inyecciones en la vena de la cola de 0,1 nmoles de los diferentes anticuerpos marcados radioactivamente (correspondiente a 6  $\mu\text{g}$  de scFv, 8  $\mu\text{g}$  de SIP y 18  $\mu\text{g}$  de IgG) en 100  $\mu\text{l}$  de salina. Se sacrificaron tres animales por tiempo, se recortaron los diferentes órganos incluyendo el tumor, se pesaron, se efectuó un recuento en un contador  $\gamma$  y luego se fijaron con formaldehído 5% en PBS, pH 7,4, para obtener las microautorradiografías, de acuerdo con Tarli et al. (23 1999).

También se tomaron muestras de sangre para obtener plasma para determinar la estabilidad de la molécula marcada radioactivamente en el torrente sanguíneo usando la prueba de inmunorreactividad ya descrita y el análisis de

filtración por gel. En ambos casos se usaron 200 µl de plasma. El contenido radioactivo de los diferentes órganos se expresó como el porcentaje de dosis inyectada por gramo (% ID/g). Los parámetros de depuración (*clearance*) de sangre de los anticuerpos radioiodados fueron ajustados con el procedimiento de cuadrados mínimos, usando el Programa Kaleidagraph para MacIntosh (Synergy Software, Reading PA, EE.UU.) y la siguiente ecuación:

$$X(t) = A \exp(-(\alpha t)) + B \exp(-(\beta t))$$

donde  $X(t)$  es el % ID/g de anticuerpo marcado radioactivamente en el tiempo  $t$ . Esta ecuación describe un perfil de depuración de sangre bi-exponencial, en el cual la amplitud de la fase alfa se define como  $A \times 100 / (A + B)$  y la amplitud de la fase de eliminación beta se define como  $B \times 100 / (A + B)$ . Alfa y beta son parámetros de velocidad relacionados con la vida media de las fases correspondientes de depuración de sangre.  $T_{1/2}$  (fase alfa) =  $\ln 2 / \alpha = 0,692... / \alpha$   $T_{1/2}$  (fase beta) =  $\ln 2 / \beta = 0,692... / \beta$ .  $X(0)$  era igual al 40%, correspondiente a un volumen de sangre de 2,5 ml en cada ratón.

## RESULTADOS

### *Preparación de los anticuerpos*

Se usaron las regiones variables de L19 (13 Pini et al., 1998), las diferentes formas del anticuerpo (scFv, mini-inmunoglobulina e IgG1 completa humana) y sus

rendimientos *in vivo* para el reconocimiento dirigido de la vasculatura tumoral.

En la figura 1 se muestran las construcciones utilizadas para expresar las diferentes formas del anticuerpo L19. Se prepararon construcciones similares usando las regiones variables de los scFv específicos para un antígeno no relevante (D1.3: 7 McCafferty: 26 Neri et al., 1997).

Para obtener los SIP e IgG1, se transfectaron células de mieloma SP2/0 de murinos con las construcciones que se muestran en la figura 1 y se seleccionaron los transfectomas estables usando G418. Los mejores productores fueron determinados por ELISA y estos clones fueron expandidos para la purificación del anticuerpo. La purificación de las tres formas del anticuerpo L19 se basó en la cromatografía por inmunoadfinidad usando ED-B recombinante conjugado con Sepharose. Los rendimientos fueron de aproximadamente 8 mg/l para scFv(L19), 10 mg/l para L19-SIP, 3 mg/l para L19-IgG1. Como proteínas control, se usó scFv(D1.3) específico para la lisozima de huevo de gallina y, usando las regiones variables de scFv D1.3, se construyó D1.3-SIP. Estos dos anticuerpos fueron purificados con lisozima de huevo de gallina conjugada con Sepharose. Los rendimientos fueron de 8 y 5 mg/l, respectivamente. Como control para L19-IgG1 se usó la IgG1/ $\kappa$  humana disponible comercialmente (Sigma).

El análisis SDS-PAGE de las tres formas purificadas de L19 se efectuó bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras. Para scFv(L19), la masa aparente era, según lo esperado, de 28 kDa aproximadamente bajo ambas condiciones reductoras y no reductoras (no se muestra). El L19-SIP mostró una masa molecular cercana a 80 kDa bajo, y tenía una masa de 40 kDa aproximadamente bajo condiciones reductoras. Los resultados demostraron que más del 95% de la molécula nativa existe como un dímero ligado covalentemente. El L19-IgG1 mostró, según lo esperado, una banda principal de 180 kDa aproximadamente bajo condiciones no reductoras, en tanto, bajo condiciones reductoras, mostró dos bandas correspondientes a la cadena pesada de 55 kDa aproximadamente y a la cadena liviana de 28 kDa aproximadamente. Se obtuvieron los perfiles de elución de las tres formas del anticuerpo L19 analizadas por cromatografía por exclusión de tamaño (Superdex 200). En los tres casos se detectó un solo pico con una distribución normal y que representaba más del 98%. Con una curva de calibración estándar, las masas moleculares aparentes eran de 60 kDa para scFv(L19)<sup>2</sup>, 80 kDa para L19-SIP y 280 kDa para L19-IgG1. Además, se demostró la ausencia de los agregados moleculares que a menudo están presentes en las preparaciones de proteínas recombinantes y que pueden invalidar los resultados obtenidos en los estudios *in vivo*.

Se obtuvieron resultados similares con los análisis por SDS-PAGE y cromatografía por exclusión del sitio (Superdex 200) realizados con las proteínas control purificadas.

Con estas tres formas diferentes de anticuerpo L19, se efectuaron análisis inmunohistoquímicos utilizando secciones congeladas de melanoma SK-MEL-28 humano inducido en ratones desnudos y de teratocarcinoma murina F9 inducida en ratones de la cepa 129. Se obtuvieron resultados óptimos a concentraciones tan bajas como 0,25-0,5 nM. Los tres anticuerpos L19 purificados reconocieron estructuras idénticas.

Estabilidad *in vivo* de las formas del anticuerpo L19 marcado radioactivamente

Para los estudios de biodistribución *in vivo*, se utilizó melanoma SK-MEL-28 humano y teratocarcinoma F9 de murinos. El tumor SK-MEL-28 presentaba un índice de crecimiento relativamente lento en tanto el tumor F9 crece rápidamente (Figura 2). Por ello, el uso del tumor SK-MEL-28 permitió realizar experimentos de larga duración (hasta 144h), en tanto el tumor F9 era inducido para estudios de biodistribución cortos (hasta 48 h). Todos los experimentos de biodistribución se realizaron cuando los tumores medían aproximadamente 0,1-0,3 cm<sup>3</sup>. Para comparar las diversas formas de anticuerpo, se inyectaron cantidades equimolares (0,1 nmol) en 100 µl de salina estéril. Antes de la

inyección, los compuestos radioiodados pasaron por filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y se verificó la inmunorreactividad y el perfil de filtración por gel (véase Materiales y métodos). La inmunorreactividad de las proteínas marcadas radioactivamente siempre era de más del 90%.

En la figura 3 A-C se muestran los perfiles del análisis de la filtración por gel (Superdex 200) de las formas del anticuerpo L19 radioiodadas.

Se tomaron muestras de sangre de los animales tratados a los diferentes intervalos de tiempo desde la inyección y se analizó la radioactividad presente en el plasma por inmunorreactividad y mediante cromatografía de filtración por gel. Los perfiles de filtración por gel mostraron un solo pico principal, que tiene la masa molecular de la proteína inyectada, para las tres formas del anticuerpo L19. Solamente el perfil de scFv reveló un segundo pico con una masa molecular más alta, lo que sugiere formación de agregados (Figura 3 D-F). Aún más, se observó formación de grandes agregados de masa molecular que no eluían de la columna Superdex 200 para scFv(L19)2. De hecho, en tanto la recuperación de la columna Superdex 200 era del 90-100% de la radioactividad aplicada para ambas formas L19-SIP y L19-IgG, el rendimiento de la radioactividad cargada de scFv(L19)2 era del 55% aproximadamente. La radioactividad retenida solamente se recuperó después de lavar la columna

para cromatografía con NaOH 0,5 M, lo que demuestra que los agregados grandes eran bloqueados en el filtro de columna (Tabla 1).

En la tabla 1 también se informan los resultados de la prueba de inmunorreactividad realizada con plasma (véase Materiales y métodos). Durante el transcurso de los experimentos, L19-SIP y L19-IgG1 mantuvieron la misma inmunorreactividad en plasma que los reactivos iniciales. Por el contrario, ya a las 3 horas después de la inyección la inmunorreactividad de scFv(L19)<sub>2</sub> en plasma se había reducido a menos de un 40%.

#### Experimentos de biodistribución comparativos

En las tablas 2 a, b, c y en la figura 4 se informan los resultados obtenidos en los experimentos de biodistribución con los L19 marcados radioactivamente anticuerpos en ratones portadores del tumor SK-MEL-28.

En las tablas 2 a, b, c se muestra, en diferentes tiempos desde la inyección i.v. de los anticuerpos marcados radioactivamente, el promedio ( $\pm$  DE) del % ID/g de tejidos y órganos, incluyendo tumores.

En la figura 4 se representan las variaciones del % ID/g de las diferentes formas del anticuerpo en tumor (A) y sangre (B) en los diferentes tiempos de los experimentos, así como las relaciones (C) entre el % ID/g en tumor y sangre. Las tres formas del anticuerpo L19 se acumularon

selectivamente en el tumor y la relación del % ID/g de tumor y otros órganos se informan en la tabla 3.

Tal como lo demuestran las microautorradiografías, los anticuerpos solamente se acumulan sobre la vasculatura tumoral, en tanto no se observa una acumulación específica sobre la vasculatura de los órganos normales. Por el contrario, no se encontró una acumulación específica de las moléculas control radioiodadas ni en tumores o en tejidos normales (Tablas 2 a, b, c).

Las tres formas del anticuerpo L19 mostraron una depuración mediada principalmente por el riñón, determinada por recuento de muestras de orina. Según lo esperado, la velocidad de depuración era mayor para scFv(L19)<sub>2</sub> y menor para la L19-IgG1 completa. El ajuste de la curva con una función biexponencial permitió obtener los valores de vida media indicados en la tabla 4.

En la figura 5 se muestran las variaciones en el % ID/g ( $\pm$  DE) de tumor y sangre obtenidas con scFv(L19)<sub>2</sub> y L19-SIP radioiodados usando el modelo de tumor de teratocarcinoma F9. Debido a la gran actividad angiogénica del teratocarcinoma F9, la acumulación de las moléculas radioactiva en este tumor era 3 a 4 veces mayor, 3 y 6 h después de la inyección i.v. que en el tumor SK-MEL-28 y era persistentemente mayor durante las 48h de duración del experimento. Con respecto al tumor SK-MEL-28, se confirmó la

acumulación específica en la vasculatura tumoral por microautorradiografía, en tanto no se observó una acumulación específica en el tumor después de la inyección de las moléculas control. En la tabla 5 se informa el % ID/g de L19(scFv) y L19SIP, en diferentes tiempos después de la inyección i.v., en tumores F9 y otros órganos.

#### *Síntesis de L19-SIP reducido*

A una solución de 375 µg (5 nmol) de L19-SIP en 422 µl de PBS se agregaron 50 µl de solución TCEP (14,34 mg de TCEP x HCl/5 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> acuoso, 0,1 M, pH = 7,4). La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 1h a 37 °C. Se purificó L19-SIP reducido por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS). El análisis por SDS-PAGE del producto aislado demostró la transformación cuantitativa de L19-SIP en L19-SIP reducido.

Rendimiento: 100,3 µg/200 µl de PBS (26,7%).

#### *Síntesis de Tc-99m-L19-SIP*

Se colocaron 3,0 mg L-tartrato disódico en un vial seguido de adición de 100,3 µg de L19-SIP reducido en 200 µl de PBS y la solución se diluyó con 100 µl de solución amortiguadora acuosa de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 M, pH = 10,5). Se agregaron 85 µl de eluato generador de Tc-99m (24h) y 10 µl de solución de SnCl<sub>2</sub> (5 mg de SnCl<sub>2</sub>/1 ml HCl 0,1 M). La mezcla de reacción se agitó durante 0,5 h a 37 °C. El L19-SIP marcado con Tc-99m se purificó por cromatografía sobre

gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 35,6%.

Pureza radioquímica: 90,2% (SDS-PAGE).

Actividad específica: 26,4 MBq/nmol.

Inmunorreactividad: 91,4 %

*Síntesis de carboximetil-t-butil disulfuro de Tc-99m-MAG2-L19-SIP*

Se calentó una solución de 21,75 ml (0,312 mol) de ácido 1-mercaptoacético, 43,5 ml (0,312 mol) de trietilamina y 100 g (0,312 mol) de N-(ter-butiltio)-N,N'-di-BOC-hidrazina en 1 l de EtOH (abs.) bajo reflujo (atmósfera de N<sub>2</sub>) durante 60 h. El EtOH se evaporó bajo presión reducida hasta un volumen final de 200 ml aproximadamente. El residuo se vertió en 1,8 l de H<sub>2</sub>O y el pH de la suspensión resultante se ajustó en 7,14 usando NaOH 5 molar. La di-BOC-hidrazina se separó por filtración y el pH de la solución resultante se ajustó en 2,2 usando HCl concentrado al 50%. El material crudo se extrajo con agua 3x y 600 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y el solvente se evaporó bajo presión reducida obteniéndose 41,1 g (80%) como un aceite amarillo. El material era suficientemente puro para una síntesis adicional.

*N-(benciloxicarbonil-Gly)Gly t-butiléster (Z-N-Gly) Gly t-butiléster*

Se agitó una solución de 35,02 g (114 mmol) de Z-Gly-O-

succinimida y 15 g (114 mmol) de Gly-O-t-Bu en 1,4 l de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bajo atmósfera  $\text{N}_2$  a temperatura ambiente durante 20 h. La capa orgánica se lavó 3x con 250 ml de ácido cítrico acuoso 1%, 2x con 200 ml de  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado al 50% y 1x con 200 ml de agua. La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. La evaporación de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bajo presión reducida permitió obtener 36,5 g (99%) de Z-Gly-Gly-O-t-Bu como un aceite amarillo. El material crudo era suficientemente puro para una síntesis adicional.

*Gly-Gly t-butiléster*

Se disolvieron 36,5 g (113 mmol) de Z-Gly-Gly-O-t-Bu en 1 l de THF seguido de la adición de 3,65 g de paladio sobre carbón (10%). La mezcla se agitó bajo atmósfera de  $\text{H}_2$  (1 atm) durante 3 h a temperatura ambiente. La suspensión se purgó con  $\text{N}_2$ , se filtró (filtro PTFE: 0,45  $\mu\text{m}$ ) y el filtrado se concentró bajo presión reducida obteniéndose 20,3 g (95%) de Gly-Gly-O-tBu como un aceite amarillo. El material crudo era suficientemente puro para una síntesis adicional.

*Glicil-glicina-t-butiléster, carboximetil-t-butil  
disulfuro*

Se agregó por gotas una solución de 23,85 g (115,6 mmol) de DCC en 430 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a una solución de 21,76 g (115,6 mmol) de Gly-Gly-O-t-Bu, 20,84 g (115,6 mmol) de carboximetil-t-butil disulfuro y 13,3 g (115,6 mmol) de NHS en 1 l de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La suspensión resultante se agitó durante

la noche bajo atmósfera de  $N_2$  a temperatura ambiente. después de la filtración la solución resultante se lavó 3x con 400 ml de  $NaHCO_3$  acuoso saturado al 50% y 1x con 400 ml de agua. La capa orgánica seca ( $MgSO_4$ ) se evaporó bajo presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de solventes que variaba de  $CH_2Cl_2/MeOH$  99:1 a  $CH_2Cl_2/MeOH$  98,5:1,5. Se aislaron 26,1 g (64%) como un aceite amarillo.

*Mercaptoacetil-glicil-glicina*

Se disolvieron 26,32 g (75,09 mmol) de glicil-glicina-t-butiléster carboximetil-t-butil disulfuro en 233 ml de TFA bajo atmósfera de  $N_2$ . La solución resultante se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. El TFA se evaporó bajo presión reducida ( $5-10 \times 10^{-2}$  mbar) y el aceite resultante se secó bajo agitación durante otras 2 h ( $5-10 \times 10^{-2}$  mbar). Después de la adición de 250 ml de  $Et_2O$  precipitó un polvo blanco y la suspensión se agitó durante 3 h. El material se separó por filtración y se resuspendió en 100 ml de  $Et_2O$ . La suspensión resultante se agitó durante la noche, el producto se separó por filtración y el material se secó a temperatura ambiente bajo presión reducida obteniéndose 20,46 g (92,5%) como un polvo blanco.

*NHS éster de mercaptoacetil-glicil-glicina*

Se combinó mercaptoacetil-glicil-glicina (1 g, 3,4 mmol) con N-hidroxisuccinimida (391 mg, 3,4 mmol) en un

balón seco y se disolvieron en DMF anhidro (4 ml). Se agregó DCC (700 mg, 3,4 mmol) en dioxano anhidro (2 ml) con la mezcla de reacción bajo agitación. Dentro de los 15 min comienza a formarse un precipitado (DCU). Después de 1 h el precipitado se separa por filtración bajo vacío. El precipitado se lavó con dioxano frío. El dioxano se separó del filtrado. El producto se precipitó de la solución remanente de DMF por adición de dietiléter. El producto se aisló por filtración, se lavó con dietiléter frío y se secó en un desecador de vacío durante la noche. Rendimiento: 1,33 (99 %).

*Síntesis de Tc-99m-MAG2- $\epsilon$ -HN(Lys)-L19-SIP*

Se diluyeron 200  $\mu$ g (2,66 nmol) de L19-SIP no reducido en 111  $\mu$ l de PBS con 300  $\mu$ l de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializó 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de fosfato (0,1 M, pH 8,5) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 50  $\mu$ l de solución de NHS éster de mercaptoacetil-glicil-glicina (0,50 mg disueltos en 500  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfato, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h y 1 x 17 h (durante la noche) con 200 ml de solución amortiguadora de fosfato (0,1 M, pH 8,5) por vez, emplean el equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 3,0

mg de L-tartrato disódico al vial seguido de adición de 90  $\mu$ l de eluato generador Tc-99m (eluido diariamente) y se agregaron 25  $\mu$ l de solución de  $\text{SnCl}_2$  (5 mg de  $\text{SnCl}_2$ /1 ml de HCl 0,1 M). La mezcla de reacción se agitó durante 0,5 h a 37 °C. El L19-SIP marcado con Tc-99m se purificó mediante cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

|                           |                    |
|---------------------------|--------------------|
| Rendimiento radioquímico: | 55,1 %.            |
| Pureza radioquímica:      | 94,5 % (SDS-PAGE). |
| Actividad específica:     | 15,2 MBq/nmol.     |
| Inmunorreactividad:       | 81,1 %             |

#### *Síntesis de Re-188-L19-SIP*

Se colocaron 3,0 mg de L-tartrato disódico en un vial seguido de adición de 150  $\mu$ g de L19-SIP reducido-SH en 310  $\mu$ l de PBS y la solución se diluyó con 100  $\mu$ l de solución amortiguadora acuosa de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 M, pH = 10,5). Se agregaron 100  $\mu$ l de eluato generador de Re-188 y 50  $\mu$ l de solución de  $\text{SnCl}_2$  (5 mg de  $\text{SnCl}_2$ /1 ml de HCl 0,1 M). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a 37°C. El L19-SIP marcado con Re-188 se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

|                           |                    |
|---------------------------|--------------------|
| Rendimiento radioquímico: | 34,8 %.            |
| Pureza radioquímica:      | 97,2 % (SDS-PAGE). |
| Actividad específica:     | 13,5 MBq/nmol.     |
| Inmunorreactividad:       | 91,7 %             |

*Síntesis de L19-SIP reducido para una conjugación específica de EDTA, CDTA, TETA, DTPA, TTHA, HBED, DOTA, NOTA, DO3A y quelantes semejantes con el grupo cisteína-SH*

Se agregaron 50 µl de solución de TCEP (14,34 mg TCEP x HCl/5 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> acuoso, 0,1 M, pH = 7,4) a una solución de 375 µg (5 nmol) de L19-SIP en 422 µl de PBS. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 1 h a 37 °C. El L19-SIP reducido se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: solución amortiguadora de acetato de sodio, 0,1 M, pH 5,0). El análisis por SDS-PAGE del producto aislado demostró la transformación cuantitativa de L19-SIP en L19-SIP reducido. Rendimiento: 105,7 µg/200 µl (28,2 %).

*Síntesis de In-111-MX-DTPA-maleimida-S(Cys)-L19-SIP-R*  
(R = reducido)

Se hicieron reaccionar 105 µg (2,8 nmol) de L19-SIP reducido en 200 µl de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 5) con 50 µl de 1,4,7-triaza-2-(N-maleimido etilen-p-amino)bencil-1,7-bi(carboximetil)-4-carboximetil-6-metil-heptano disuelto (0,25 mg de DTPA-maleimida en 500 µl de solución amortiguadora de acetato de sodio, 0,1 M, pH 5) durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 6) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

Se agregaron 80 µl de solución de [In-111]InCl<sub>3</sub> (HCl, 1 N, 40 MBq, Amersham Inc.) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 30 min.

El DTPA-maleimida-S(Cys)-L19-SIP marcado con In-111 se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 51,6 %.

Pureza radioquímica: 97,2 % (SDS-PAGE).

Actividad específica: 7,9 MBq/nmol.

Inmunorreactividad: 88,5 %

*Síntesis de MX-DTPA-maleimida (1,4,7-triaza-2-(N-maleimido-etilen-p-amino)bencil-1,7-bis (carboximetil)-4-carboximetil-6-metil-heptano)*

Se disolvieron 512 mg (1 mmol) de ácido {[3-(4-amino-fenil)-2-(bi-carboximetilamino)-propil]-[2-(bi-carboximetil-amino)-propil]}-aminoacético (Macrocyclics Inc. Dallas, TX, EE.UU.) y 707 mg (7 mmol) de trietilamina en 3 ml DMF seco. Se agregaron, por gotas, 400 mg (1,5 mmol) de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster del ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propiónico (Aldrich) en 1 ml de DMF seco. La solución se agitó durante 5 h a 50 °C. Se agregaron, lentamente, 30 ml de dietiléter. La mezcla de reacción se agitó durante otros 30 min. El precipitado se recolectó por filtración. El producto crudo se purificó mediante RP-HPLC (acetonitrilo:agua:ácido trifluoracético; 3:96,9:0,1 ->

99,9:0:0,1). Rendimiento: 61% (405 mg, 0,61 mmol). MS-ESI:  
664 =  $M^+ + 1$ .

*Síntesis de In-111-MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP*

Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP no reducido en 111 µl de PBS con 300 µl de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializaron 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 50 µl de solución de 1,4,7-triaza-2-(p-isotiocianato)bencil-1,7-bis(carboximetil)-4-carboximetil-6-metil-heptano (MX-DTPA) (0,33 mg de MX-DTPA disuelto en 500 µl de solución amortiguadora de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h y 1 x 17 h (durante la noche) con 200 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) por vez, empleando el equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

Se agregaron 80 µl de solución de [In-111]InCl<sub>3</sub> (HCl, 1 N, 40 MBq, Amersham Inc.) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 30 min. El MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP marcado con In-111 se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 72,4 %.

Pureza radioquímica: 80,3 % (SDS-PAGE).

Actividad específica: 8,8 MBq/nmol.

Inmunorreactividad: 77,5 %

*Síntesis de In-111-DOTA-C-bencil-p-NCS-ε-HN(Lys)-L19-SIP*

Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP no reducido en 108 µl de PBS con 300 µl de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializaron 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 50 µl de solución de ácido 1,4,7,10-tetra-aza-2-(p-isotiocianato)bencil-ciclododecan-1,4,7,10-tetraacético (bencil-p-SCN-DOTA, Macrocyclics Inc., Dallas TX, EE.UU.) (1,5 mg de bencil-p-SCN-DOTA disuelto en 5 ml de solución amortiguadora de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) a la solución y la mezcla de reacción se calentó durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h y 1 x 17 h (durante la noche) con 200 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) por vez, empleando el equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

Se agregaron 80 µl de solución de [In-111]InCl<sub>3</sub> (HCl, 1 N, 40 MBq, Amersham Inc.) y la mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 30 min. El DOTA-C-bencil-p-NCS-ε-HN(Lys)-L19-SIP marcado con In-111 se purificó por cromatografía

sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 70,8 %.

Pureza radioquímica: 92,1 % (SDS-PAGE).

Actividad específica: 10,1 MBq/nmol.

Inmunorreactividad: 75,1 %

*Síntesis de Y-88-MX-DTPA-ε-IN(Lys)-L19-SIP*

Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP no reducido en 110 µl de PBS con 300 µl de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializaron 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 50 µl de solución de MX-DTPA (0,33 mg de MXDTPA disuelto en 500 µl de solución amortiguadora de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h y 1 x 17 h (durante la noche) con 200 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) por vez, empleando el equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

Se agregaron 100 µl de solución de [Y-88]YCl<sub>3</sub> (HCl, 1 N, 75 MBq, Oak Ridge National Lab.) y la mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 30 min. El MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP marcado con Y-88 se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 68,1 %  
Pureza radioquímica: 91,5 % (SDS-PAGE).  
Actividad específica: 11,4 MBq/nmol.  
Inmunorreactividad: 70,5 %

*Síntesis de Lu-177-DOTA-C-bencil-p-NCS -ε-HN(Lys)-Z19-SIP*

Se disolvieron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP no reducido en 120 µl de PBS con 300 µl de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializaron 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 50 µl de solución de bencil-p-SCN-DOTA (1,5 mg disueltos en 5 ml de solución amortiguadora de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h y 1 x 17 h (durante la noche) con 200 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) por vez, empleando el equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

Se agregaron 200 µl de solución de [Lu-177]LuCl<sub>3</sub> (HCl, 1 N, 80 MBq, NRH-Petten, Los Países Bajos) y la mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 30 min. El DOTA-C-bencil-p-NCS-ε-HN(Lys)L19-SIP marcado con Lu-177 se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5

(Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 72,2 %.

Pureza radioquímica: 94,9 % (SDS-PAGE).

Actividad específica: 18,3 MBq/nmol.

Inmunorreactividad: 73,4 %

*Distribución en órganos y excreción de In-111-PU-DTPA-LI9-SIP después de una sola inyección i.v. en ratones desnudos portadores de tumores*

Los péptidos marcados de la invención fueron inyectados por vía intravenosa a una dosis de aproximadamente 37 kBq en animales portadores de F9 (teratocarcinoma) (peso corporal de 25 g aproximadamente). Se midió la concentración de radioactividad en diversos órganos y la radioactividad excretada usando un contador y en diversos tiempos después de administrar la sustancia.

La biodistribución de In-111-MX-DTPA-LI9-SIP en ratones desnudos portadores de F9 (teratocarcinoma) (media  $\pm$  DE, n = 3) se muestra en la tabla 6.

*Distribución en órganos y excreción de Tc-99m-LI9-SIP después de una sola inyección i.v. en ratones desnudos portadores de tumores*

Los péptidos marcados fueron inyectados por vía intravenosa a una dosis de 56 kBq aproximadamente en animales portadores de F9 (teratocarcinoma) (peso corporal de 25 g aproximadamente). Se midió la concentración de

radioactividad en diversos órganos y la radioactividad excretada usando un contador y en diversos tiempos después de administrar la sustancia. Además, se determinó la relación de tumor a sangre en diversos tiempos basado en la concentración del péptido en tumor y sangre.

La biodistribución de Tc-99m-L19-SIP en ratones desnudos portadores de F9 (teratocarcinoma) (media  $\pm$  DE, n = 3) se muestra en la tabla 7.

La relación de tumor a sangre de Tc-99m-L19-SIP en ratones desnudos portadores de F9 (teratocarcinoma) (media  $\pm$  DE, n = 3) se muestra en la tabla 8.

Los péptidos marcados radioactivamente demostraron que tienen propiedades favorables en los experimentos con animales. Por ejemplo, el DTPA- $\epsilon$ -HN(Lys)-L19-SIP marcado con Tc-99m-L19-SIP y In-111-MX presentó una gran acumulación en tumores de % dosis inyectada por gramo (ID/g) 1 hora después de la inyección (p.i.) del 17,2 (Tc-99m) o 12,9 (In-111). Se observó una retención significativa en el tumor del 9,4 (Tc-99m) o 13,0 (In-111) % ID/g a las 24 horas p.i.. Por consiguiente, la captación en tumor es significativamente mayor en comparación con otros fragmentos de anticuerpo conocidos marcados con In-111 o Tc-99m (por ejemplo Kobayashi et al., J. Nuc. Med., Vol. 41(4), págs. 755-762, 2000; Verhaar et al., J. Nuc. Med., Vol. 37(5), págs. 868-872, 1996). La depuración de sangre del compuesto condujo a

relaciones de tumor/sangre de 13:1 y 6:1, respectivamente, a las 24 h p.i.

Más notable aún, el In-111-MX-DTPA-s-HN(Lys)-L19-SIP mostró una captación y retención significativamente menor en riñón (22,5 % ID/g) que otros fragmentos de anticuerpo recombinante marcados con In-111 altamente retenidos (120 % ID/g) como se describe por ejemplo en Kobayashi et al. a las 24 h de p.i. La retención en riñón es un problema muy común y habitualmente dificulta el uso de compuestos marcados con lantánidos en las radioterapias.

Los resultados experimentales demuestran el excelente potencial de los radioinmunoconjugados que se describen en la presente para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas, preferentemente aplicadas al paciente mediante una administración parenteral.

#### DISCUSIÓN

La observación que las drogas anticancerosas citotóxicas se localizan más eficazmente en tejidos normales que en los tumores (37 Bosslet et al., 1998) desencadenó una oleada de estudios que investigaban la posibilidad de un suministro de drogas selectivo a los tumores. Sin embargo, un reconocimiento dirigido eficaz de tumores tiene dos requisitos principales: 1) un blanco en el tumor que sea específico, abundante, estable y fácilmente disponible para las moléculas de ligando que provienen del torrente

sanguíneo y 2) una molécula de ligando con propiedades farmacocinéticas adecuadas que difunda fácilmente desde el torrente sanguíneo hacia el tumor y que tenga una gran afinidad por el blanco para asegurar una acumulación eficaz y selectiva en el tumor.

Debido a sus características distintivas, el microambiente tumoral es un posible blanco que incluye a todos los tumoral. De hecho, el avance del tumor induce (y posteriormente necesita) modificaciones significativas en los componentes del microambiente tumoral, en particular en los de la matriz extracelular (ECM). Las moléculas que conforman la ECM de los tumores sólidos difieren tanto cuantitativamente como cualitativamente de las de la ECM normal. Más aún, muchos de estos componentes de la ECM del tumor son compartidos por todos los tumores sólidos, que explica las propiedades y funciones generales tales como invasión celular (tanto de células normales en tejidos tumorales como de células cancerosas en tejidos normales) y angiogénesis. Entre las numerosas moléculas que constituyen la ECM tumoral modificada, los inventores de la presente han centrado su atención en una isoforma de FN que contiene al dominio ED-B (B-FN).

El dominio B-FN se expresa ampliamente en la ECM de todos los tumores sólidos evaluados hasta el momento y constantemente se asocia con los procesos angiogénicos (22

Castellani et al., 1994), pero por lo demás no es detectable en los tejidos adultos normales (17 Carnemolla et al., 1989). El direccionamiento de agentes terapéuticos hacia la ECM subendotelial supera los problemas asociados con la hipertensión intersticial de los tumores sólidos (38 Jain et al. 1988; 39 Jain, 1997; 40 Jain RK, 1999).

El L19 (13 Pini et al. 1998; 25 Viti, Canc. Res., 23 Tarli, et al., 1999), un scFv con una gran afinidad ( $K_d = 5,4 \times 10^{-11}$  M) por el dominio ED-B de FN, se acumula selectiva y eficazmente *in vivo* alrededor de la neovasculatura tumoral y puede transportar y concentrar selectivamente en la masa tumoral cualquiera de numerosas moléculas terapéuticas con las cuales está conjugado (28 Birchler et al., 1999; 29 Nilsson, et al., 2001; 30 Halin et al., 2002; 31 Carnemolla et al., 2002). También se ha demostrado en pacientes la capacidad de L19 para reconocer selectivamente a los tumores usando técnicas centellográficas.

En la presente memoria descriptiva se describe la marcación de una inmunoproteína pequeña (SIP) con radioisótopos, sobre el uso de la SIP marcada radioactivamente y sobre el rendimiento del reconocimiento dirigido de la vasculatura de tumores y la farmacocinética de tres formas diferentes del anticuerpo L19 humano: el scFv, la mini-inmunoglobulina/inmunoproteína pequeña y la

IgG1 completa humana.

La molécula SIP se obtuvo por fusión del scFv(L19) con el dominio  $\epsilon$ CH4 de la isoforma secretora S<sub>2</sub> de la IgE humana. El  $\epsilon$ CH<sub>4</sub> es el dominio que permite la dimerización de las moléculas de IgE y la isoforma S<sub>2</sub> contiene una cisteína por el extremo COOH terminal que estabiliza covalentemente el dímero a través de un enlace disulfuro intercatenaria (35 Batista et al., 1996). Los sitios de unión de IgE para Fc $\epsilon$ RI residen en el dominio CH3 (41 Turner y Kinet, 1999; 42 Vangelista et al., 1999; 43 Garman et al., 2000), entonces el scFv fusionado al dominio  $\epsilon$ CH4 de acuerdo con realizaciones de la presente invención no activa todo el señalamiento que conduce a reacciones de hipersensibilidad.

Se estudió el rendimiento de estas tres formas en dos modelos diferentes de tumores en ratón: en teratocarcinoma F9 de murino y en melanoma SK-MEL-28 humano. El primero es un tumor de crecimiento rápido que, una vez implantado, mata a los animales en dos semanas aproximadamente. Por otro lado, el tumor SK-MEL-28 presenta una curva de crecimiento bifásica, con una fase de crecimiento rápido temprano seguido de una segunda fase más lenta. Se ha demostrado previamente que la cantidad de ED-B en el teratocarcinoma F9 permanece estable durante el crecimiento del tumor (23 Tarli, et al., 1999); por el contrario, el ED-B se acumula en el melanoma SK-MEL-28 proporcionalmente a la capacidad

del tumor para crecer (23 Tarli et al., 1999), con abundante ED-B en la primera fase y una menor cantidad en la segunda. El uso del tumor de melanoma SK-MEL-28 permitió llevar a cabo estudios a largo plazo sobre la biodistribución sin variaciones dramáticas de la masa tumoral (Figura 2) que podría dar lugar a una interpretación errónea de los resultados.

Los estudios comparativos de las tres formas del anticuerpo L19 en términos de estabilidad *in vivo* mostraron que L19-SIP y L19-IgG1 mantuvieron, durante toda la duración de los experimentos (144 h), la misma inmunorreactividad y masa molecular en plasma que antes de la inyección. Por el contrario, el scFv(L19) perdió rápidamente su inmunorreactividad en plasma y generó agregados que eran demasiado grandes como para ingresar en la columna de cromatografía para filtración por gel. Es muy probable que dicha agregación del scFv sea responsable de la relación entre el % ID/g del tumor y pulmón, dado que los agregados podrían acumularse en la microvasculatura del pulmón (Tabla 3). Para los tres formatos, la depuración de sangre tiene lugar principalmente por el riñón, mostrando una curva bifásica con una fase  $\alpha$  y una fase  $\beta$ , como se muestra en la tabla 4, que es inversamente proporcional al tamaño molecular.

La acumulación de las diferentes formas del anticuerpo

en los tumores estudiados era consecuencia de la velocidad de depuración y la estabilidad *in vivo* de las moléculas. Con el scFv, el porcentaje máximo de dosis inyectada por gramo (% ID/g) se observó 3h después de la inyección del anticuerpo marcado radioactivamente y luego disminuyó rápidamente. Con el SIP, el % ID/g en los tumores era 2-5 veces más alto que el de scFv, alcanzando un máximo 4-6 horas después de la inyección. Este patrón se observó en ambos tumores F9 y SK-MEL-28. Por el contrario, la acumulación de IgG1 en tumores aumentó de forma constante durante los experimentos. Sin embargo, debido a su depuración lenta, la relación de tumor-sangre para % ID/g después de 144 horas sólo era de 3 aproximadamente, en comparación con una relación de 10 para el scFv y 70 para el SIP después del mismo período de tiempo (Figura 4).

Estas mismas propiedades distintivas de estabilidad, depuración y rendimiento del reconocimiento dirigido de tumores *in vivo* que emplea las tres formas del anticuerpo estudiadas aquí se pueden aprovechar para diferentes fines de diagnóstico y/o terapéuticos, dependiendo de las necesidades clínicas y de la enfermedad. Por ejemplo, los anticuerpos marcados radioactivamente que muestran buenas relaciones de tumor-órgano y tumor-sangre rápidamente después de la inyección son los que se necesitan para un diagnóstico por inmunocentellografía *in vivo*, principalmente

porque se usan isótopos de vida media corta en dichos análisis.

Hay diferentes enfoques posibles con el uso de anticuerpos como vehículo para agentes terapéuticos: el suministro de sustancias que ejercen sus efectos terapéuticos después de alcanzar el blanco (por ejemplo, fotosensibilizadores activados solamente sobre los blancos), para las cuales la cantidad absoluta suministrada al tumor es relevante; el suministro de sustancias que ejercen sus efectos terapéuticos y tóxicos aún antes de alcanzar el blanco (por ejemplo, el emisor  $\beta$  itrio90), para las cuales se debe prestar particular atención con la relación al área bajo la curva de la acumulación en tumor y sangre en función del tiempo, con el fin de minimizar la toxicidad sistémica y para maximizar el efecto terapéutico anti-tumoral.

Por ejemplo, el L19-SIP parece ofrecer el mejor compromiso entre estabilidad molecular, velocidad de depuración y acumulación en el tumor. Ya sea han descrito proteínas de fusión similares compuestas de fragmentos de anticuerpo scFv unidos a un dominio dimerizante (44 Hu et al, 1996; 33 Li et al., 1997), pero en ambos casos se usó el  $\gamma$ 1CH3 humano como dominio dimerizante. El uso del dominio  $\epsilon$ S2CH4 humano provee una manera sencilla de lograr una estabilización covalente del dímero. Además, se puede reducir fácilmente el puente disulfuro formado por los

residuos cisteína C-terminales bajo condiciones suficientemente suaves como para preservar la estructura general de la molécula, proporcionando así un grupo reactivo fácilmente accesible para una marcación radioactiva o una conjugación química. Esta característica parece particularmente promisorio en vista del potencial clínico.

El L19-IgG1 se acumula abundantemente en los tumores y aún cuando esta acumulación es desplazado por una velocidad de depuración lenta de la sangre, se puede usar el procedimiento de tres pasos para eliminar los anticuerpos en circulación para permitir su uso no sólo con fines terapéuticos sino también en la inmunocentellografía de diagnóstico (45 Magnani et al. 2000) .

#### REFERENCIAS

1. Shawler et al. J. Immunol., 135: 1530-1535, 1985
2. Miller et al. Blood, 62: 988-995, 1983.
3. Hakimi et al. J. Immunol., 147: 1352-1359, 1991.
4. Stephens et al. Immunology, 85: 668-674, 1995.
5. Riechmann et al. Nature, 332: 323-327, 1988.
6. Junghans et al. Cancer Res., 50: 1495-1502, 1990.
7. McCafferty et al. Nature, 348: 552-554, 1990.
8. Zowman et al. Biochemistry, 30: 10832-10838, 1991
9. Nilsson et al. Advanced Drug Delivery Reviews, 43: 165-196, 2000.
10. Winter et al. Annu. Rev. Immunol., 12: 433-455,

1994.

11. Reichert. Nature Biotech., 19: 819-822, 2001.
12. Huls et al. Nature Biotech., 17: 276-281, 1999,
13. Pini et al. J Biol Chem, 273: 21769-21776, 1998.
14. Neri y Zardi. Advanced Drug Delivery Reviews, 31: 43-52, 1998.
15. Bissel y Radisky. Nature Reviews - Cancer., 1: 46-54, 2001.
16. Balza et al. FEBS Lett., 228: 42-44, 1988.
17. Carnemolla et al. J. Cell. Biol., 108: 1139-1148, 1989.
18. Borsi et al. FEBS Lett., 261: 175-178, 1990
19. Borsi et al. J. Biol. Chem., 270: 6243-6245, 1995.
20. Zardi et al. EMBO J., 6: 2337-2342, 1987.
21. ffrench-Constant et al. J. Cell Biol., 109: 903-914, 1989.
22. Castellani et al. Int J Cancer, 59: 612-618, 1994
23. Tarli et al. Blood, 94:192-198, 1999.
24. Carnemolla et al. Int J Cancer, 68: 397-405, 1996
25. Viti et al. Cancer Res, 59: 347-353, 1999.
26. Neri et al. Nature Biotechnol, 15: 1271-1275, 1997.
27. Demartis et al. Eur J Nucl Med, 28: 4534-4539, 2001.
28. Birchler et al. Nat Biotechnol, 17: 984-988, 1999
29. Nilsson et al. Cancer Res., 61: 711-716, 2001.

30. Halin et al. Nature Biotechnol. En prensa, 2002.
31. Carnemolla et al. Blood, 99 :, 2002
32. Wu et al. Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU., 97: 8495-8500, 2000.
33. Li et al. Protein Engineering, 10: 731-736, 1997
34. Pini et al. J. Immunol. Methods, 206: 171-183, 1997.
35. Batista et al. J. Exp. Med., 184: 2197-205, 1996.
36. Riske et al. J. Biol. Chem., 266: 11245-11251, 1991.
37. Bosslet et al. Cancer Res., 58:1195-1201, 1998.
38. Jain y Baxter. Cancer Res., 48: 7022-7032, 1988.
39. Jain. Vascular and interstitial physiology of tumors. Role in cancer detection and treatment. En: R. Bicknell, C.E. Lewis y N. Ferrara (eds). Tumour Angiogenesis, págs. 4559. Nueva York: Oxford University Press, 1997.
40. Jain. Annu. Rev. Biomed. Eng., 1: 241-263, 1999.
41. Turner y Kinet. Nature, 402 Supl., B24-B30, 1999.
42. Vangelista et al. Jour. Clin. Invest., 103:1571-1578, 1999.
43. Garman et al., Nature, 406: 259-266, 2000.
44. Hu et al. Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996.
45. Magnani et al. Br. J. Cancer, 82: 616-620, 2000.

Tabla 1. Inmunorreactividad (I\*) y recuperación de la radioactividad (R) de Superdex 200 para los anticuerpos marcados radioactivamente, en diferentes tiempos después de la inyección i.v.

| Tiempo    | 3   |     | 6   |     | 24  |     | 48  |     | 72  |     | 144 |     |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| (h)       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|           | I   | R   | I   | R   | I   | R   | I   | R   | I   | R   | I   | R   |
| L19(scFv) | 36  | 54  | 32  | 58  | 27  | nd  | 14  | nd  | 9   | nd  | 4   | nd  |
| L19SIP    | 100 | 100 | 100 | 96  | 100 | 94  | 95  | 96  | 100 | nd  | 95  | nd  |
| L19IgG1   | 100 | 100 | 100 | 100 | 95  | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 95  | 100 |

Los valores de inmunorreactividad (%) y recuperación de la radioactividad (%) de Superdex 200 se determinaron en plasma como se describe en *Materiales y métodos*.

\* Para normalizar los valores, los resultados de la prueba de inmunorreactividad se refieren a los valores porcentuales de la inmunorreactividad antes de la inyección i.v..

nd: no determinado

107

Tabla 2a. Experimentos de biodistribución de fragmentos de anticuerpo D1.3 y L19 marcados radioactivamente en ratones portadores del tumor SK-MEL-28

| L19 (scFv) |             |             |             |             |             |             |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|            | 3h          | 6h          | 24h         | 48h         | 72h         | 144h        |
| TUMOR      | 2,47 ± 0,65 | 2,01 ± 0,72 | 1,62 ± 0,43 | 0,95 ± 0,14 | 0,68 ± 0,04 | 0,32 ± 0,14 |
| Sangre     | 1,45 ± 0,58 | 0,54 ± 0,12 | 0,10 ± 0,03 | 0,04 ± 0,01 | 0,03 ± 0,02 | 0,03 ± 0,01 |
| Hígado     | 0,48 ± 0,20 | 0,18 ± 0,05 | 0,04 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 |
| Bazo       | 0,67 ± 0,28 | 0,27 ± 0,04 | 0,07 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 0,02 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 |
| Riñón      | 4,36 ± 0,32 | 1,67 ± 0,08 | 0,16 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 | 0,04 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 |
| Intestino  | 0,77 ± 0,21 | 0,57 ± 0,05 | 0,24 ± 0,06 | 0,17 ± 0,04 | 0,12 ± 0,05 | 0,09 ± 0,01 |
| Corazón    | 0,77 ± 0,20 | 0,31 ± 0,07 | 0,07 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 |
| Pulmón     | 2,86 ± 0,34 | 1,50 ± 0,67 | 1,07 ± 0,42 | 0,73 ± 0,39 | 0,55 ± 0,11 | 0,51 ± 0,22 |

| D1.3 (scFv) |             |             |             |             |     |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|------|
|             | 3h          | 6h          | 24h         | 48h         | 72h | 144h |
| TUMOR       | 1,03 ± 0,74 | 0,87 ± 0,42 | 0,15 ± 0,10 | 0,07 ± 0,02 | nd  | nd   |
| Sangre      | 1,52 ± 0,86 | 0,81 ± 0,13 | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | nd  | nd   |
| Hígado      | 1,19 ± 0,65 | 0,66 ± 0,26 | 0,14 ± 0,04 | 0,03 ± 0,08 | nd  | nd   |
| Bazo        | 1,05 ± 0,88 | 0,42 ± 0,33 | 0,07 ± 0,02 | 0,05 ± 0,01 | nd  | nd   |
| Riñón       | 3,01 ± 2,48 | 1,83 ± 0,76 | 0,48 ± 0,01 | 0,18 ± 0,05 | nd  | nd   |
| Intestino   | 0,56 ± 0,54 | 0,56 ± 0,13 | 0,17 ± 0,03 | 0,02 ± 0,01 | nd  | nd   |
| Corazón     | 0,86 ± 0,54 | 0,55 ± 0,84 | 0,02 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | nd  | nd   |
| Pulmón      | 1,28 ± 0,65 | 1,06 ± 0,88 | 0,04 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 | nd  | nd   |

Los resultados se expresan como el porcentaje de dosis inyectada de anticuerpo por gramo de tejido (% ID/g) ± DE

nd: no determinado

105

Tabla 2b. Experimentos de biodistribución de L19-SIP y D1.3-SIP marcados radioactivamente en ratones portadores del tumor SK-MEL-28

| L19SIP    |             |             |             |             |             |             |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|           | 3h          | 6h          | 24h         | 48h         | 72h         | 144h        |
| TUMOR     | 5,23 ± 0,65 | 6,14 ± 2,23 | 4,20 ± 2,47 | 2,57 ± 0,31 | 2,33 ± 0,90 | 1,49 ± 0,65 |
| Sangre    | 9,82 ± 0,68 | 5,03 ± 0,52 | 1,39 ± 0,06 | 0,29 ± 0,04 | 0,08 ± 0,02 | 0,02 ± 0,01 |
| Hígado    | 2,65 ± 0,14 | 1,74 ± 0,31 | 0,50 ± 0,04 | 0,19 ± 0,01 | 0,10 ± 0,02 | 0,05 ± 0,01 |
| Bazo      | 3,76 ± 0,36 | 2,43 ± 0,24 | 0,71 ± 0,05 | 0,26 ± 0,04 | 0,13 ± 0,01 | 0,17 ± 0,18 |
| Riñón     | 7,33 ± 0,91 | 3,87 ± 0,21 | 1,09 ± 0,05 | 0,30 ± 0,04 | 0,14 ± 0,02 | 0,05 ± 0,01 |
| Intestino | 1,45 ± 0,24 | 1,44 ± 0,29 | 1,06 ± 0,43 | 0,56 ± 0,08 | 0,40 ± 0,08 | 0,18 ± 0,00 |
| Corazón   | 4,16 ± 0,30 | 2,15 ± 0,08 | 0,52 ± 0,05 | 0,13 ± 0,03 | 0,06 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 |
| Pulmón    | 7,72 ± 0,60 | 5,41 ± 0,55 | 1,81 ± 0,40 | 0,59 ± 0,29 | 0,19 ± 0,03 | 0,05 ± 0,01 |

| D1.3SIP   |              |             |             |             |             |             |
|-----------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|           | 3h           | 6h          | 24h         | 48h         | 72h         | 144h        |
| TUMOR     | 3,80 ± 0,30  | 1,65 ± 0,12 | 0,70 ± 0,00 | 0,26 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,04 ± 0,03 |
| Sangre    | 10,40 ± 0,81 | 4,45 ± 0,14 | 1,21 ± 0,01 | 0,32 ± 0,00 | 0,08 ± 0,01 | 0,06 ± 0,02 |
| Hígado    | 4,05 ± 0,98  | 2,73 ± 0,33 | 1,43 ± 0,07 | 0,51 ± 0,21 | 0,15 ± 0,08 | 0,02 ± 0,01 |
| Bazo      | 3,31 ± 0,66  | 1,76 ± 0,50 | 0,82 ± 0,12 | 0,46 ± 0,20 | 0,15 ± 0,05 | 0,04 ± 0,02 |
| Riñón     | 8,41 ± 0,49  | 4,64 ± 0,06 | 1,47 ± 0,05 | 0,36 ± 0,03 | 0,16 ± 0,03 | 0,06 ± 0,01 |
| Intestino | 2,03 ± 0,55  | 1,06 ± 0,20 | 1,02 ± 0,06 | 0,14 ± 0,03 | 0,08 ± 0,02 | 0,12 ± 0,04 |
| Corazón   | 3,28 ± 0,20  | 1,81 ± 0,02 | 0,29 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,05 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |
| Pulmón    | 6,16 ± 0,28  | 4,52 ± 0,07 | 1,16 ± 0,05 | 0,09 ± 0,00 | 0,06 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 |

Los resultados se expresan como el porcentaje de dosis inyectada de anticuerpo por gramo de tejido (% ID/g) ± DE

nd: no determinado

107

Tabla 2c. Experimentos de biodistribución de L19IgG1 y hIgG1k marcados radioactivamente en ratones portadores del tumor SK-MEL-28

| L19 IgG1  |  | 3h           | 6h           | 24h         | 48h         | 72h         | 144h         |
|-----------|--|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| TUMOR     |  | 4,46 ± 0,08  | 5,39 ± 1,01  | 6,70 ± 2,10 | 7,80 ± 2,51 | 8,90 ± 2,52 | 11,22 ± 3,19 |
| Sangre    |  | 16,04 ± 0,81 | 12,02 ± 1,65 | 8,31 ± 1,77 | 5,12 ± 1,42 | 5,02 ± 3,81 | 4,87 ± 0,26  |
| Hígado    |  | 6,03 ± 0,37  | 6,77 ± 0,53  | 2,41 ± 0,35 | 1,45 ± 0,41 | 1,26 ± 0,71 | 1,09 ± 0,16  |
| Bazo      |  | 6,63 ± 1,34  | 6,37 ± 1,37  | 2,51 ± 0,47 | 2,01 ± 0,32 | 1,80 ± 1,02 | 1,51 ± 0,29  |
| Riñón     |  | 6,47 ± 0,39  | 5,12 ± 0,47  | 3,07 ± 0,35 | 1,73 ± 0,63 | 1,54 ± 1,14 | 1,12 ± 0,44  |
| Intestino |  | 1,60 ± 0,39  | 1,35 ± 0,65  | 1,43 ± 0,19 | 1,13 ± 0,32 | 1,13 ± 0,98 | 0,97 ± 0,47  |
| Corazón   |  | 5,63 ± 0,67  | 4,77 ± 0,52  | 2,87 ± 0,45 | 1,48 ± 0,51 | 1,32 ± 1,09 | 0,92 ± 0,37  |
| Pulmón    |  | 6,55 ± 0,65  | 5,15 ± 0,62  | 4,16 ± 0,66 | 2,28 ± 0,80 | 1,98 ± 1,60 | 1,42 ± 0,45  |

| hIgG1k    |    | 3h | 6h           | 24h         | 48h         | 72h | 144h        |
|-----------|----|----|--------------|-------------|-------------|-----|-------------|
| TUMOR     | nd |    | 3,28 ± 0,38  | 4,00 ± 0,22 | 2,78 ± 0,20 | nd  | 2,32 ± 0,26 |
| Sangre    | nd |    | 10,12 ± 0,35 | 7,87 ± 0,25 | 6,24 ± 0,34 | nd  | 5,41 ± 0,51 |
| Hígado    | nd |    | 4,02 ± 0,09  | 2,06 ± 0,10 | 1,90 ± 0,24 | nd  | 1,28 ± 0,03 |
| Bazo      | nd |    | 4,47 ± 0,28  | 1,82 ± 0,01 | 1,42 ± 0,19 | nd  | 1,24 ± 0,03 |
| Riñón     | nd |    | 5,40 ± 0,19  | 2,56 ± 0,06 | 2,08 ± 0,22 | nd  | 1,30 ± 0,15 |
| Intestino | nd |    | 0,72 ± 0,07  | 0,46 ± 0,05 | 0,36 ± 0,03 | nd  | 0,31 ± 0,01 |
| Corazón   | nd |    | 3,80 ± 0,15  | 2,52 ± 0,21 | 0,99 ± 0,18 | nd  | 1,48 ± 0,13 |
| Pulmón    | nd |    | 4,82 ± 0,92  | 3,64 ± 0,08 | 1,75 ± 0,32 | nd  | 1,09 ± 0,13 |

Los resultados se expresan como el porcentaje de dosis inyectada de anticuerpo por gramo de tejido (% ID/g)± DE

nd: no determinado

108

Tabla 3. Relaciones de tumor-órgano del % ID/g de las formas del anticuerpo L19 marcado radioactivamente en ratones portadores del tumor SK-MEL-28.

| Tiempo(h) | L19 (ScFv) |      |      |      |      |      | L19-SIP |     |     |      |      |      | L19 IgG1 |     |     |     |     |     |
|-----------|------------|------|------|------|------|------|---------|-----|-----|------|------|------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
|           | 3          | 6    | 24   | 48   | 72   | 144  | 3       | 6   | 24  | 48   | 72   | 144  | 3        | 6   | 24  | 48  | 72  | 144 |
| TUMOR     | 1          | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1       | 1   | 1   | 1    | 1    | 1    | 1        | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| Sangre    | 1,7        | 3,7  | 16,2 | 23,7 | 22,7 | 10,7 | 0,5     | 1,2 | 3,0 | 8,9  | 29,1 | 74,5 | 0,3      | 0,4 | 0,8 | 1,5 | 1,8 | 2,3 |
| Hígado    | 5,1        | 11,1 | 40,5 | 47,5 | 34,0 | 16,0 | 2,0     | 3,5 | 8,4 | 13,5 | 23,3 | 29,8 | 0,7      | 0,8 | 2,8 | 5,4 | 7,1 | 6,3 |
| Bazo      | 3,7        | 7,4  | 23,1 | 31,6 | 34,0 | 16,0 | 1,4     | 2,5 | 5,9 | 10,0 | 17,9 | 8,8  | 0,7      | 0,6 | 2,7 | 3,9 | 4,9 | 7,4 |
| Riñón     | 0,6        | 1,2  | 10,1 | 15,8 | 17,0 | 10,7 | 0,7     | 1,6 | 3,8 | 8,6  | 16,6 | 29,8 | 0,7      | 1,0 | 2,2 | 4,5 | 5,8 | 5,3 |
| Intestino | 3,2        | 3,5  | 6,7  | 5,6  | 5,7  | 3,6  | 3,6     | 4,3 | 4,0 | 4,6  | 5,8  | 8,3  | 2,8      | 4,0 | 4,7 | 6,9 | 7,9 | 7,1 |
| Corazón   | 3,2        | 6,5  | 23,1 | 47,5 | 34,0 | 16,0 | 1,3     | 2,9 | 8,1 | 20,0 | 38,8 | 74,5 | 0,8      | 1,1 | 2,3 | 5,3 | 6,7 | 5,8 |
| Pulmón    | 0,9        | 1,3  | 1,5  | 1,3  | 1,2  | 0,6  | 0,7     | 1,1 | 2,3 | 4,3  | 12,3 | 29,8 | 0,7      | 1,0 | 1,6 | 3,4 | 4,5 | 3,7 |

109

Tabla 4. Parámetros cinéticos para la depuración de sangre de las tres formas del anticuerpo L19

|            | $\alpha$          |                      | $\beta$           |                      |
|------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|            | (%) <sup>a)</sup> | t <sub>1/2</sub> (h) | (%) <sup>a)</sup> | t <sub>1/2</sub> (h) |
| L19 (sCFv) | 96,7              | 0,53                 | 3,3               | 8,00                 |
| L19-SiP    | 83,7              | 1,06                 | 16,3              | 10,66                |
| L19-IgG1   | 76,9              | 1,48                 | 23,1              | 106,7                |

<sup>a)</sup> Magnitud relativa de los dos componentes de la vida media

110

Tabla 5. Experimentos de biodistribución de L19(scFv) y L19SIP marcados radioactivamente en ratones portadores del tumor F9

| L99(scFv) | 3h           | 6h          | 24h         | 48h         |
|-----------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| TUMOR     | 10,43 ± 1,75 | 8,15 ± 2,63 | 3,18 ± 0,83 | 2,83 ± 0,71 |
| Sangre    | 2,05 ± 0,38  | 1,88 ± 1,14 | 0,17 ± 0,01 | 0,06 ± 0,02 |
| Hígado    | 1,62 ± 1,67  | 0,73 ± 0,51 | 0,07 ± 0,01 | 0,04 ± 0,02 |
| Bazo      | 1,53 ± 0,36  | 0,90 ± 0,54 | 0,11 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 |
| Riñón     | 12,70 ± 0,73 | 4,37 ± 0,98 | 0,24 ± 0,03 | 0,18 ± 0,08 |
| Intestino | 0,68 ± 0,15  | 0,95 ± 0,23 | 0,24 ± 0,01 | 0,17 ± 0,06 |
| Corazón   | 1,35 ± 0,21  | 0,81 ± 0,38 | 0,08 ± 0,02 | 0,04 ± 0,01 |
| Pulmón    | 2,88 ± 0,29  | 2,06 ± 0,69 | 0,38 ± 0,69 | 0,33 ± 0,05 |

| L19SIP    | 3h           | 6h           | 24h          | 48h          |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TUMOR     | 17,46 ± 1,93 | 16,65 ± 2,59 | 15,32 ± 2,17 | 12,00 ± 1,91 |
| Sangre    | 13,51 ± 0,57 | 9,62 ± 1,18  | 1,73 ± 0,02  | 1,14 ± 0,20  |
| Hígado    | 2,81 ± 0,37  | 2,39 f 0,13  | 0,54 ± 0,14  | 0,32 ± 0,00  |
| Bazo      | 3,42 ± 0,26  | 2,66 ± 0,27  | 0,61 ± 0,09  | 0,37 ± 0,01  |
| Riñón     | 9,18 ± 0,76  | 5,85 ± 0,50  | 1,16 ± 0,05  | 0,76 ± 0,06  |
| Intestino | 0,95 ± 0,03  | 1,36 ± 0,21  | 0,83 ± 0,11  | 1,04 ± 0,14  |
| Corazón   | 4,64 ± 0,24  | 3,67 ± 0,46  | 0,67 ± 0,06  | 0,46 ± 0,07  |
| Pulmón    | 5,61 ± 0,01  | 5,93 ± 0,53  | 1,66 ± 0,19  | 0,91 ± 0,08  |

Los resultados se expresan como el porcentaje de dosis inyectada de anticuerpo por gramo de tejido (% ID/g)± DE

nd: no determinado

MM

|                         | % de dosis / g de tejido |              |              |
|-------------------------|--------------------------|--------------|--------------|
|                         | 1h p.i.                  | 3h p.i.      | 24h p.i.     |
| Bazo                    | 5,0 ± 1,04               | 4,27 ± 0,27  | 4,86 ± 1,77  |
| Hígado                  | 10,80 ± 1,52             | 10,57 ± 1,44 | 10,68 ± 1,51 |
| Riñón                   | 14,30 ± 1,45             | 16,1 ± 2,42  | 22,48 ± 6,79 |
| Pulmón                  | 9,94 ± 1,72              | 6,15 ± 0,80  | 3,03 ± 0,95  |
| Estómago sin contenido  | 1,10 ± 0,13              | 1,62 ± 0,19  | 1,66 ± 0,24  |
| Intestino con contenido | 1,67 ± 0,14              | 2,65 ± 0,30  | 2,64 ± 1,40  |
| Tumor                   | 12,93 ± 2,76             | 10,18 ± 2,28 | 12,96 ± 3,13 |
| Sangre                  | 17,10 ± 1,49             | 9,08 ± 0,96  | 1,98 ± 0,47  |

Tabla 6

|                         | % de dosis / g de tejido |              |             |
|-------------------------|--------------------------|--------------|-------------|
|                         | 1h p.i.                  | 3h p.i.      | 24h p.i.    |
| Bazo                    | 6,92 ± 1,3               | 5,37 ± 0,23  | 2,06 ± 0,48 |
| Hígado                  | 14,65 ± 0,81             | 12,43 ± 0,37 | 4,62 ± 0,52 |
| Riñón                   | 22,07 ± 1,87             | 15,99 ± 1,10 | 5,92 ± 1,18 |
| Pulmón                  | 10,06 ± 1,67             | 5,33 ± 0,49  | 1,32 ± 0,25 |
| Estómago sin contenido  | 2,18 ± 0,39              | 2,12 ± 0,09  | 1,15 ± 0,08 |
| Intestino con contenido | 3,03 ± 0,25              | 3,62 ± 0,58  | 1,20 ± 0,12 |
| Tumor                   | 17,20 ± 7,49             | 18,79 ± 5,35 | 9,42 ± 3,84 |
| Sangre                  | 16,53 ± 2,04             | 7,42 ± 0,21  | 0,73 ± 0,14 |

Tabla 7

|                            | 1h p.i.     | 3h p.i.    | 24h p.i.    |
|----------------------------|-------------|------------|-------------|
| Relación de tumor a sangre | 1,01 ± 0,33 | 2,5 ± 0,74 | 2,81 ± 4,03 |

Tabla 8

ISTADO DE SECUENCIAS

|       |                                                                                                                      |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <110> | Philogen SRL                                                                                                         |
|       | Schering AG                                                                                                          |
|       | Borsi, Laura                                                                                                         |
|       | Carnemolla, Barbara                                                                                                  |
|       | Balza, Enrica                                                                                                        |
|       | Castellani, Patrizia                                                                                                 |
|       | Zardi, Luciano                                                                                                       |
|       | Friebe, Matthias                                                                                                     |
|       | Hilger, Christoph-Stephan                                                                                            |
| <120> | Reconocimiento dirigido selectivo de la vasculatura tumoral usando moléculas de anticuerpo marcadas radioactivamente |
| <130> | SMW/FP6354716                                                                                                        |
| <150> | EP 03255633.4                                                                                                        |
| <151> | 2003-09-10                                                                                                           |
| <150> | US 60/501,881                                                                                                        |
| <151> | 2003-09-10                                                                                                           |
| <160> | 15                                                                                                                   |
| <170> | PatentIn version 3.1                                                                                                 |
| <210> | 1                                                                                                                    |
| <211> | 5                                                                                                                    |
| <212> | PRT                                                                                                                  |

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Phe Ser Met Ser  
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala  
1 5 10

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 5  
Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr  
1 5 10

<210> 7  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido ligador

<400> 7  
Gly Gly Ser Gly  
1

<210> 8  
<211> 35  
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 8

gtgtgcactc ggaggtgcag ctgttggagt ctggg

35

<210> 9

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 9

gcctccggat ttgatttcca ccttggtccc ttggcc

36

<210> 10

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 10

ctcgtgcact cgcaggtgca gctgcaggag tca

33

<210> 11

<211>30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 11

ctctccggac cgtttgatct cgcgcttggt 30

- <210> 12
- <211> 33
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador

<400> 12  
tgggtgtgcac tcggaaattg tggtgacgca gtc 33

- <210> 13
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador

<400> 13  
ctctcgtagc tttgatttcc accttggtcc 30

- <210> 14
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 14  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
116  
1                    5                    10                    15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
                  20                    25                    30  
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                  35                    40                    45  
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110  
Thr Val Ser Ser  
115

<210> 15  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30  
Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80  
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro  
85 90 95  
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

**DECLARATION OF DR. ALESSANDRO PINI**

1. I, Dr. Alessandro Pini, am Assistant Professor of Biochemistry at the School of Medicine of the University of Siena, Italy, and a specialist in the field of antibody engineering, with more than 15 years of experience in this field. My CV is attached as Exhibit 1.
2. I am first author of the scientific paper entitled "Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinities against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel", which discloses the isolation of the L19 scFv antibody fragment and was published in the Journal of Biological Chemistry (1998), Vol. 273, page 21769-21776. This paper (Pini *et al.*) is referenced at page 6 lines 10-13 of the international patent application published as WO 03/076469 A3, and is attached as Exhibit 2.
3. The sequences of the L19 VH and VL domains are precisely defined and identifiable from the disclosure of Pini *et al.*, for the reasons explained in detail below.

**Identification of the L19 scFv sequence**

4. My paper, Pini *et al.*, which is referenced at page 6 lines 10-13 of the patent application, describes the construction of the L19 scFv antibody and states that this antibody was deposited in the EBI database (see the legend to Table II on page 21771). Simply searching the EBI database (<http://www.ebi.ac.uk>) using the keywords "L19 human ED-B" reveals that the nucleotide sequence of the L19 anti-(ED-B) scFv recombinant antibody has accession number AJ006113 and provides the sequence of this antibody. Notably, this database entry includes a reference to my paper. A copy of the database entry is attached as Exhibit 3.
5. The deposit history associated with this database entry confirms that the deposit information (including a corrected version of the sequence) was available to the public at the priority date of the patent application (which is 11 March 2002).
6. Therefore, the sequence of the L19 scFv antibody can be readily identified from the disclosure of my 1998 Journal of Biological Chemistry paper, referenced in the patent application.

**Identification of the VH and VL domains of L19 scFv**

7. Once the sequence of the L19 scFv antibody has been obtained from the EBI database, the L19 VH and VL sequences can be routinely determined based on my own disclosure in Pini *et al.*
8. The antibody library used in my paper (the ETH-2 antibody library) was originally cloned using the single VH and VL germline genes referred to as DP47 and DPK22 (see page 21770, left-hand column, "Experimental Procedures", under "Library Construction and Cloning", and Figure 1 of the paper). The amino acid sequence of DP47 is provided by Tomlinson *et al.*, J. Mol. Biol. (1992) 227, 776-798 (see Figure 2a), which is reference no. 19 in my paper, and is attached as Exhibit 4. The amino acid sequence of DPK22 is provided by Cox *et al.*, Eur. J. Immunol. (1994) 24, 827-836 (see Figure 3 on page 830), which is reference no. 20 in my paper, and is attached as Exhibit 5.

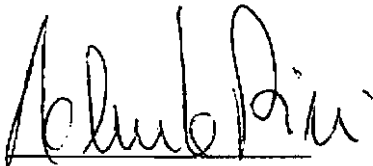
9. Comparison of the L19 scFv sequence (obtained from the EBI database entry) with the sequence of DP47 shown in Figure 2a of Tomlinson *et al.*, 1992 (Exhibit 4), allows the N-terminal sequence of the VH domain to be readily identified as "EVQLL.....".
10. Further comparison of the L19 scFv sequence with other DP-47-derived scFv sequences available at the priority date of the patent application identifies the C-terminal sequence of the VH domain as ".....VTVSS". For example, Table 2 of Mao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 6953-6958, attached as Exhibit 6, shows that the VH domain of clone S7 (which is derived from DP47) ends with the sequence "VTVSS" (see the framework sequence, "FR4", of S7). Similarly, Table 1 of Giovannoni *et al.*, Nucleic Acids Research (2001) 29(5) e27, attached as Exhibit 7, shows that the VH domain of scFv(ME4C) (which is also derived from DP-47) also has the C-terminal sequence "VTVSS" (see, in particular, the legend to Table 1, which identifies residues 118 to 129 of the sequence shown in Table 1 as belonging to a flexible linker connecting the VH and VL domains of scFv(ME4C). Therefore, the C-terminal sequence of the L19 VH domain was readily identifiable from the L19 scFv sequence at the priority date of the patent application.
11. Thus, a reader familiar with antibodies would readily have been able to identify the VH domain of the L19 scFv sequence from the disclosure of Pini *et al.*
12. Comparison of the L19 scFv sequence with the sequence of DPK22 shown in Figure 3 of Cox *et al.* (Exhibit 5) allows the N-terminal sequence of the VL domain to be readily identified. Such comparison shows that the first five amino acids at the N-terminal sequence of the VL domain are "EIVLT". Therefore, there is no possibility that any of the preceding amino acids (GDGSSGGSGGAS) would be identified as part of the VL domain.
13. Thus, the sequences of both the VH and VL domains of L19 would be readily identified from the L19 scFv sequence (which is itself readily identifiable from Pini *et al.*) at the priority date of the application.

#### Identification of the VL CDR3 sequence

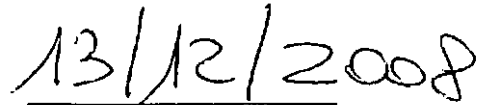
14. In the patent application, the sequence of the VL CDR3 is provided in the sequence listing as SEQ ID NO:6, which reads "CQQTGRIPPT". However, there is an error in this sequence; it includes an extra N-terminal cysteine ('C') residue. A scientist knowledgeable about antibodies would immediately be aware that this extra 'C' residue had been erroneously included in SEQ ID NO:6 and that the sequence of VL CDR3 should in fact be "QQTGRIPPT" for the reasons set out below.
15. It was well known prior to the priority date of the patent application that the location of immunoglobulin variable domains could be determined by reference to their Kabat numbering (see page 12 line 32 to page 13 line 5 of the patent application). Therefore, a scientist knowledgeable about antibodies would have known that the VL CDR3 domain is formed by residues 89-97 of the VL domain (see, for example, the enclosed definition of the VL CDR3 based on Kabat numbering obtained from <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/GeneralInfo.html>), which is attached as Exhibit 8. Similarly, Tomlinson *et al.*, The EMBO Journal (1995), vol. 14 no. 18, 4628-4638, attached as Exhibit 9, and upon which I have based the numbering of the scFV L19 in Pini *et al.*, clearly states that residues 89-97 of the VL domain form the

CDR3. Therefore, the skilled antibody scientist would immediately know that the cysteine at position 88 was not part of the VL CDR3.

16. Furthermore, Cox *et al.* (Exhibit 5), which is referenced in my paper and which provides the DPK22 sequence used to construct the VL domain of the L19 scFv antibody, clearly shows that the cysteine residue at position 88 is not part of the VL CDR3, which starts 'QQ' (see Figure 3). Instead, the cysteine is part of the framework, "FR3". Thus, it is immediately seen that the cysteine residue at position 88 is not part of the VL CDR3 and has been erroneously included in SEQ ID NO:6.
17. Therefore, it is immediately evident that the VL CDR3 sequence, SEQ ID NO:6 in the patent application, should be "QQTGRIPPT" and should not include an extra cysteine residue at its N-terminal.
18. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true.
19. I declare further that these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such wilful false statements may jeopardise the validity of the US patent application of any patent issuing thereon.



Dr. Alessandro Pini



Date

Enc. Exhibits 1-9

**DOCUMENTS REFERENCED IN THE DECLARATION OF DR. ALESSANDRO PINI**

- Exhibit 1 Dr. Alessandro Pini's CV
- Exhibit 2 Pini, *et al.* "Design and Use of a Phage Display Library. Human antibodies with subnanomolar affinities against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel", 1998, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 34, pp. 21769-21776
- Exhibit 3 EBI database entry for the L19 scFv antibody
- Exhibit 4 Tomlinson *et al.* "The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops", 1992, J. Mol. Biol., Vol. 227, pp. 776-798
- Exhibit 5 Cox *et al.* "A directory of human germ-line V<sub>x</sub> segments reveals a strong bias in their usage", 1994, Eur. J. Immunol., Vol. 24, pp. 827-836
- Exhibit 6 Mao *et al.* "Phage-display library selection of high-affinity human single-chain antibodies to tumour-associated carbohydrate antigens sialyl Lewis<sup>x</sup> and Lewis<sup>x</sup>", 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 96, pp. 6953-69-58
- Exhibit 7 Giovannoni *et al.* "Isolation of anti-angiogenesis antibodies from a large combinatorial repertoire by colony filter screening", 2001, Nucleic Acid Research, Vol. 29, No. 5, e27
- Exhibit 8 Table of CDR Definitions
- Exhibit 9 Tomlinson *et al.* "The structural repertoire of the human V<sub>x</sub> domain", 1995, The EMBO Journal, Vol. 14, No. 18, pp. 4628-4638

## Experimental Studies

# Radioimmunotherapy of Solid Tumors by Targeting Extra Domain B Fibronectin: Identification of the Best-Suited Radioimmunoconjugate

Dietmar Berndorff,<sup>1</sup> Sandra Borkowski,<sup>1</sup> Stephanie Sieger,<sup>1</sup> Axel Rother,<sup>2</sup> Matthias Friebe,<sup>1</sup> Francesca Viti,<sup>3</sup> Christoph S. Hilger,<sup>1</sup> John E. Cyr,<sup>1</sup> and Ludger M. Dinkelborg<sup>1</sup>

**Abstract Purpose:** The expression of extra domain B (ED-B) fibronectin is always associated with angiogenic processes and can be exclusively observed in tissues undergoing growth and/or extensive remodeling. Due to this selective expression, ED-B fibronectin is an interesting target for radioimmunotherapy of malignant diseases. The aim of this study was to identify the most appropriate ED-B-targeting radioimmunoconjugate for the therapy of solid tumors.

**Experimental Design:** Three ED-B fibronectin-binding human antibody formats of L19 were investigated: dimeric single-chain Fv (~50 kDa), "small immunoprotein" (SIP, ~80 kDa), and immunoglobulin G1 (IgG1, ~150 kDa). These L19 derivatives were either labeled with I-125 or with In-111 (using MX-diethylenetriaminepentaacetic acid, MX-DTPA). Pharmacokinetics and tumor accumulation of the radiolabeled immunoconjugates were investigated in F9 (murine teratocarcinoma) tumor-bearing mice. Subsequently, dosimetry for the corresponding therapeutic isotopes I-131 and Y-90 was done. After testing the myelotoxicity of I-131-L19-SIP and I-131-L19-IgG1 in non-tumor-bearing mice, the therapeutic efficacy of these iodinated antibody formats was finally investigated in F9 tumor-bearing mice.

**Results:** The most favorable therapeutic index was found for I-131-L19-SIP followed by I-131-L19-IgG1. The therapeutic index of all In-111-labeled derivatives was significantly inferior. Considering the bone marrow as the dose-limiting organ, it was calculated that activities of 74 MBq I-131-L19-SIP and 25 MBq I-131-L19-IgG1 could be injected per mouse without causing severe myelotoxicity. The best therapeutic efficacy was observed using I-131-L19-SIP, resulting in significant tumor growth delay and prolonged survival after a single injection.

**Conclusion:** Compared with other L19-based radioimmunoconjugates, I-131-L19-SIP is characterized by superior antitumor efficacy and toxicity profile in the F9 teratocarcinoma animal model. These results indicate that ED-B fibronectin-targeted radioimmunotherapy using I-131-L19-SIP has potential to be applied to treatment of solid cancers.

Radioimmunotherapy using systemically administered radiolabeled antibodies is an interesting approach to metastatic cancer treatment. Promising results have been reported in patients with hematologic malignancies, presumably due to their high intrinsic radiosensitivity and a relatively good access of the radiolabeled antibodies to the cancer cells (1, 2). Solid cancers, however, have proved to be far less sensitive to this form of treatment due to several reasons, including a limited vascular supply, heterogeneous uptake of the antibody and elevated interstitial pressure in

combination with a relatively long transport distance in the interstitium (3). Several approaches have been tried to overcome these problems, including use of small molecular weight fragments that target tumors faster (4) or alternatively, the use of intact antibodies that can be modified for use in pretargeting protocols (5-7). Thus far, however, remissions in solid tumors have been partial, infrequent, and short-lived (8). Consequently, new approaches will be needed to hopefully overcome the impediments to successful radioimmunotherapy.

The extra domain B (ED-B) of fibronectin consists of 91 amino acids that are identical in mouse, rat, rabbit, dog, monkey, and man (9). This domain arises by alternative splicing in the fibronectin molecule exclusively at sites of tissue remodeling and is one of the few angiogenesis markers known thus far. A number of human antibodies to ED-B have been isolated using different technologies (10, 11). In particular, L19 is a human single-chain Fv antibody fragment with subnanomolar affinity to ED-B (12), which has been shown to efficiently localize on tumoral neovasculature both in animal models (13, 14) and in cancer patients (15). Several derivatives of L19 have already been described that selectively deliver

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Schering AG Research Laboratories, Berlin, Germany; <sup>2</sup>Forschungszentrum Rossendorf e.V., Institut für Bioorganische und Radio-pharmazeutische Chemie, Dresden, Germany; and <sup>3</sup>Philogen S.p.A, Monteriggioni-Siena, Italy

Presented at the Tenth Conference on Cancer Therapy with Antibodies and Immunoconjugates, October 21-23, 2004, Princeton, New Jersey.

**Requests for reprints:** Dietmar Berndorff, Schering AG, Research Laboratories, 13342 Berlin, Germany. Phone: 49-30-46817555; Fax: 49-30-46816609. E-mail: dietmar.berndorff@schering.de.

©2005 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-1004-0015

Experimental Studies

therapeutically efficacious molecules to the tumor vasculature in preclinical animal models (16–20).

In this article, we report on a novel approach for radioimmunotherapy of solid tumors by making use of ED-B fibronectin targeting. ED-B fibronectin is accessible from the blood stream because its expression is predominantly vessel associated during angiogenesis. Compared with the targeting of receptors that are expressed on the tumor cell surface, the delivery of ionizing radiation mainly to the tumor vasculature might lead to an improved therapeutic efficacy by destroying the tumor's vascular supply.

To determine the best-suited radioimmunoconjugate for ED-B-targeted radioimmunotherapy, a series of experiments was designed. First, three human antibody formats of L19 [i.e., dimeric single-chain Fv (~50 kDa), "small immunoprotein" (SIP; ~80 kDa), and immunoglobulin G1 (IgG1, ~150 kDa)] were labeled with I-125 and In-111 (MX-DTPA), respectively. Each of the labeled immunoconjugates was carefully analyzed *in vitro* for labeling efficiency, radiochemical purity, and immunoreactivity. Subsequently, the biodistributions of these

radioimmunoconjugates were studied *in vivo* after i.v. injection in the s.c. syngeneic F9 teratoma nude mouse model. Based on the biodistribution results, doses for mouse organs and for tumor, the maximum tolerable activity (MTA), and the resulting therapeutic index (i.e., the dose ratio between the tumor and the dose-limiting organ) for the corresponding radiotherapeutic immunoconjugates labeled with I-131 and Y-90 were estimated. To confirm the predicted MTA of I-131-L19-SIP and I-131-L19-IgG1, the myelotoxicity of both compounds was investigated after injection in non-tumor-bearing mice. Finally, the therapeutic efficacy of I-131-L19-SIP and I-131-L19-IgG1 was studied in F9 tumor-bearing mice.

Materials and Methods

**Cell culture and animals.** Mouse embryonal teratocarcinoma cells (F9) were kindly provided by Dario Neri (Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland). Tumor cells were cultivated in DMEM with Glutamax supplemented with 10% FCS (all reagents from Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

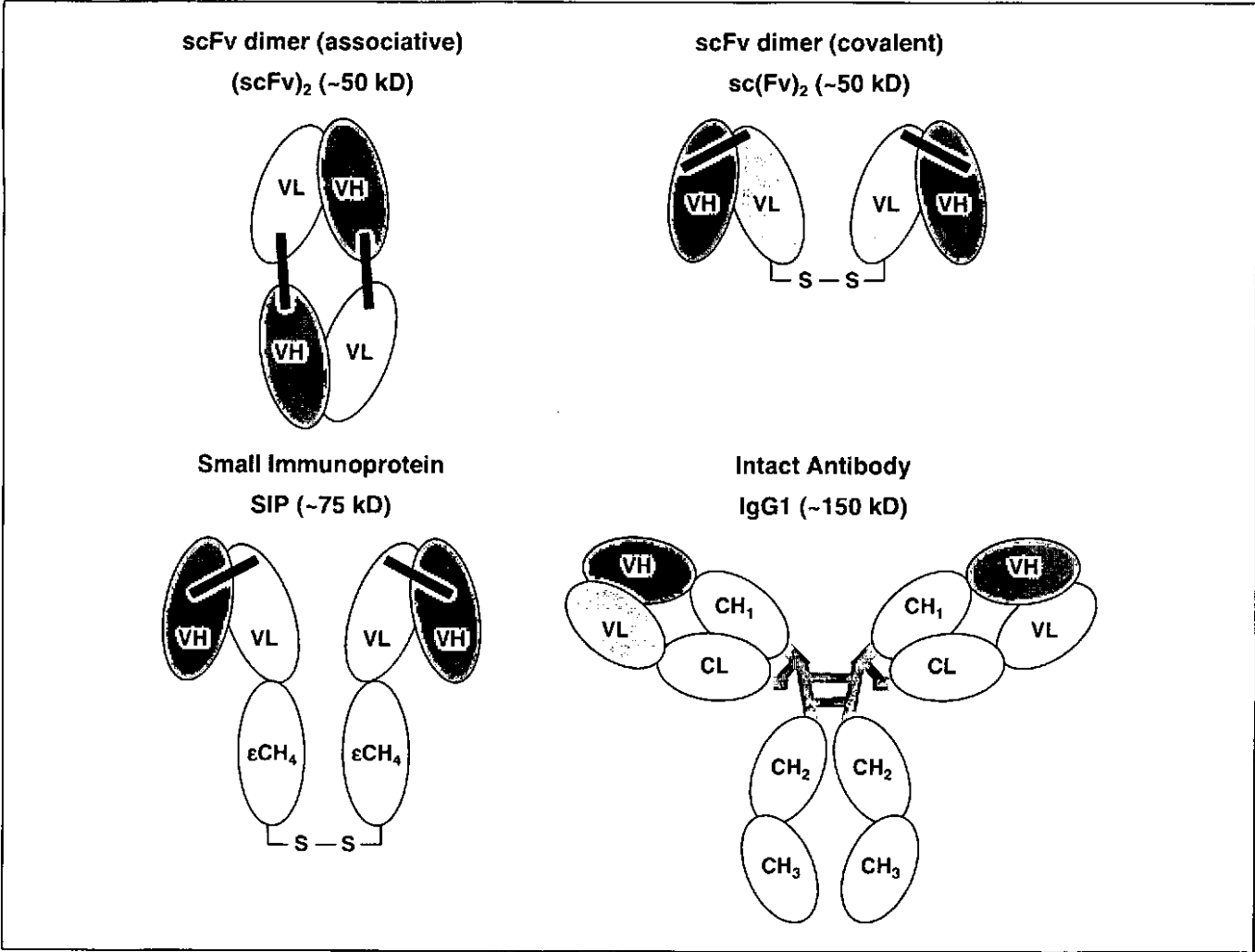


Fig. 1. Schematic drawing shows the domain structure of all antibody formats that were investigated in this study. The derivatives of this study are consisting of V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains of L19 scFv. The covalent scFv dimer is formed by an intermolecular disulfide bridge after recombinant insertion of the peptide sequence (Gly)<sub>3</sub>-Cys-Ala at the C-OH-terminal end of L19 scFv. In the SIP molecule, the dimerization of V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains of L19 scFv is achieved by recombinant connection of the L19 scFv to the εCH<sub>4</sub> domain of the human IgE secretory isoform IgE-S2. The intact antibody is formed by recombinant connection of the L19 heavy and light chain to the complete human γ1 constant heavy and the human constant κ light chain, respectively.

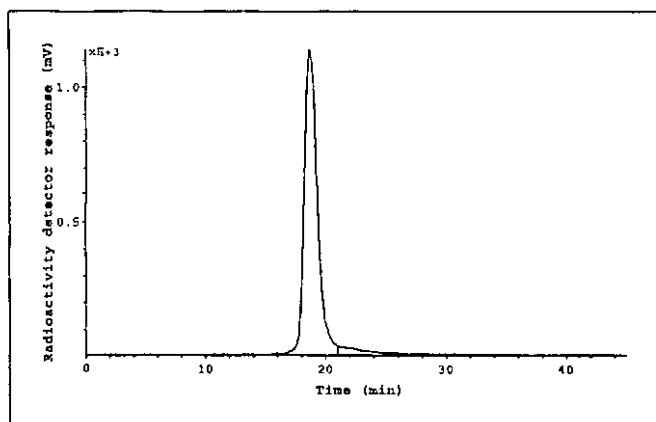


Fig. 2. SE-HPLC (radiation detection) of I-125-L19-SIP.

To induce tumors, female nude mice (NMRI-Foxn1<sup>tm</sup>) weighing 20 to 25 g and purchased from Taconic Europe (Bomholtgard, Denmark) were s.c. injected with  $1 \times 10^6$  F9 cells in a volume of 100  $\mu$ L PBS into the right hind limb. Biodistribution experiments were carried out after 10 to 12 days when tumors reached a mass of 100 to 300 mg. For therapy experiments, mice with palpable tumors of 50 to 100 mm<sup>2</sup> were used after 7 to 9 days of tumor growth. All animal experiments were done in compliance with the German law on the Protection of Animals.

**Antibody expression, purification, and radiolabeling.** Single-chain Fv (L19), SIP (L19), and IgG1 (L19) were expressed and purified by immunoaffinity chromatography as described earlier (21). Expression and purification of the single-chain Fv AP39, which has been generated by insertion of the peptide sequence (Gly)<sub>3</sub>-Cys-Ala at the COOH-terminal end of the V<sub>L</sub> chain of single-chain Fv (L19), was done according to a procedure described elsewhere.<sup>4</sup> Both the single-chain Fv (L19) and AP39 used in this study were dimeric single-chain Fv molecules, either due to associative interactions (L19) or because of an intermolecular disulfide bridge (AP39). All antibody formats used in this study are schematically shown in Fig. 1. It has been shown that different L19-based antibody formats have a similar binding affinity when measurements are done with the antigen in solution to avoid avidity effects (22). However, when the antigen is bound to a solid phase, bivalent L19-based antibody formats show better performance due to slow disassociation rates (22).

Radioiodination of antibodies and antibody fragments was done following a slightly modified version of the original IODO-GEN method (23) using IODO-GEN precoated iodination tubes (Pierce, Rockford, IL). For the reported biodistribution studies, 200  $\mu$ g of protein in 500  $\mu$ L of PBS were labeled with 0.5 mCi of NaI-125 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, United Kingdom). For the therapy studies, 1,000  $\mu$ g protein in 1,000  $\mu$ L of PBS were labeled with 20 mCi of NaI-131 (Amersham Buchler, Braunschweig, Germany). After incubation at room temperature for 15 minutes, the radiolabeled protein was separated from free radioiodine by gel filtration using NAP5 columns (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) for I-125 labelings and PD10 columns (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) for I-131 labelings. The columns were pretreated with 0.5% bovine serum albumin (BSA) in PBS and equilibrated and eluted with PBS. For NAP5 columns, 1 mL fractions, and for PD10 columns, 3.5 mL fractions, were collected. The radioactivity of the fractions was measured with a dose calibrator (MED Nuclear-Medizintechnik Dresden GmbH, Dresden, Germany).

The purity of the radiolabeled proteins was analyzed by SDS-PAGE using Gradient 10-15 Phast gels and a Phast System (Pharmacia,

Uppsala, Sweden) followed by autoradiography using a Phosphorimager (Molecular Dynamics, Krefeld, Germany). I-125-labeled BSA and I-125-labeled carbonic anhydrase were used as standards. Size exclusion high pressure liquid chromatography (SE-HPLC) was done on a HPLC-pump 64 (Knauer, Berlin, Germany) equipped with a LB 507 B radiation detector (EG&G Berthold, Bad Wildbach, Germany) using a TSK-gel column SWxL, 50  $\times$  6 mm (Tosoh Haas, Montgomeryville, PA) with TSK buffer as mobile phase (0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05 mol/L NaN<sub>3</sub>) and a flow rate of 0.5 mL/min.

The immunoreactivity of the radioimmunoconjugates was determined using a test column comprised of a Pasteur pipette filled with 250  $\mu$ L ED-B Sepharose resin (24) and saturated with 0.5% BSA in PBS. The test column was loaded with  $\sim$ 0.2 MBq radiolabeled protein in 500  $\mu$ L of 0.5% BSA in PBS and rinsed with  $2 \times 500$   $\mu$ L 0.5% BSA in PBS to remove the non-immunoreactive protein fraction. The immunoreactive protein fraction was then eluted with  $2 \times 750$   $\mu$ L of aqueous triethylamine solution (0.1 mol/L). Both, the radioactivity of the fractions and that remaining on the column, were measured with a dose calibrator and the immunoreactivity was calculated as the percent radioactivity bound to the column or in the immunoreactive fraction.

MX-DTPA isothiocyanate (4-*p*-benzylisothiocyanato-8-methyl-3,6,9-triaza-3*N*,6*N*,9*N*-tricarboxymethyl-1,11-undecanoic acid) for conjugation to the proteins was synthesized according to the literature (25, 26).

Subsequent conjugation of MX-DTPA isothiocyanate to the  $\epsilon$ -amine group of lysine residues of the L19-based antibody derivatives AP39, L19-SIP, and L19-IgG1, and labeling of the proteins with In-111 (Amersham Health, Little Chalfont, United Kingdom) were conducted according to described procedures (27). For example, 3.6 nmol of AP39 in sodium borate buffer (80  $\mu$ L, 0.1 mol/L, pH 8.5) were added to 50  $\mu$ g of MX-DTPA isothiocyanate (1 mg/mL in sodium borate buffer, 0.1 mol/L, pH 8.5), and the mixture was incubated for 1 hour at 37°C. Subsequently, the sample was dialyzed thrice ( $2 \times 1$  hour,  $1 \times$  overnight) using a Slide-A-Lyzer (10,000 molecular weight cut-off membrane; Pierce) and sodium acetate buffer (0.1 mol/L, pH 6) and stored at 4°C until use. For In-111 radiolabeling, 28 MBq of [In-111] InCl<sub>3</sub> (in HCl, 0.1 mol/L) were added to the AP39-MX-DTPA conjugate. After incubation at room temperature for 30 minutes, the radiolabeled product was purified on a NAP5 column as described above for the radioiodinated products. The purity of the In-111 radiolabeled conjugates was evaluated by SE-HPLC, immunoreactivity, and SDS-PAGE.

**Biodistribution experiments.** Mice were i.v. injected with 37 to 74 kBq of the labeled antibody formats into the tail vein in a total

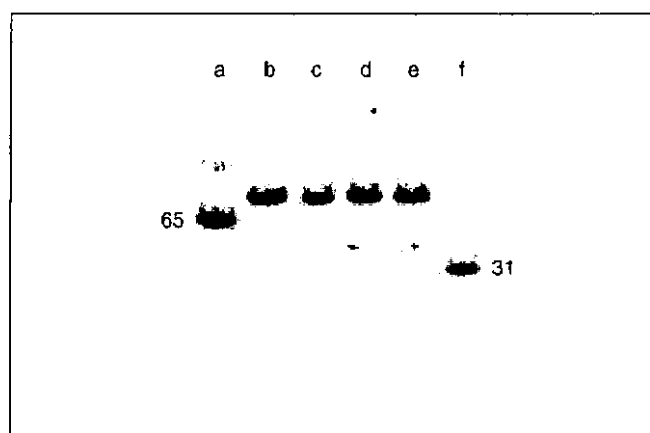


Fig. 3. Autoradiogram of a SDS-PAGE of I-125-L19-SIP: I-125-labeled BSA (lane a), I-125-L19-SIP (lanes b and c), I-125-L19-SIP heated for 4 minutes at 95 °C (lanes d and e), and I-125-labeled carbonic anhydrase (lane f). Molecular weights of I-125-labeled BSA and I-125-labeled carbonic anhydrase are given in kDa.

<sup>4</sup> In preparation.

Experimental Studies

volume of 50 to 100 µL. At least four different time points with three mice per time point were investigated after a single injection of the radioactive compounds. At predetermined time points (0.25-24 hours for small antibody formats, 4-96 hours for larger formats), animals were sacrificed by decapitation. The dissected organs and collected excretions were counted for radioactivity in a γ-counter (Compugamma, LKB Wallac, Turku, Finland) and values of % injected dose/g and % injected dose were calculated.

**Mouse dosimetry.** Doses for mouse organs were estimated based on medical internal radiation dose (28) using the biodistribution results of the labeled antibody formats. Using I-125 and In-111 as surrogates, dosimetric calculations were made for the corresponding therapeutic isotopes I-131 and Y-90. The following assumptions in accordance to medical internal radiation dose were used: (a) uniform distribution of radioactivity within the organs, (b) organ shapes as spheres, (c) linear interpolation of *S* values. Residence times were calculated and isotope-specific *S* values were linearly interpolated depending on the mouse organ masses to obtain tumor and organ doses in mGy/MBq (29). Only self-to-self doses but not cross-fire effects were taken into account. The red marrow doses were estimated based on a method by Sgouros (30) assuming a red marrow-to-blood activity concentration ratio of 0.36. Regarding the dose-limiting organ, which was either the red marrow or the kidneys depending on the antibody format, maximum activities to be injected per mouse were determined based on published

human tolerance doses of  $TD_{50/5} = 4.5$  Gy for the red marrow and  $TD_{50/5} = 25$  Gy for the kidneys (31). These MTAs per mouse were used to calculate absolute tumor doses (in Gy) for a 100-mg normalized tumor mass in relation to the respective dose-limiting organ (therapeutic index).

**Determination of blood counts.** To confirm the calculated MTAs of I-131-L19-SIP or I-131-L19-IgG1 that can be injected into a mouse without causing irreversible bone marrow toxicity, non-tumor-bearing mice were injected with increasing doses of iodinated antibody (25-74 MBq). The total and differential leukocyte and thrombocyte numbers were counted before injection of radioiodinated antibody and at weekly intervals thereafter. Approximately 100 µL of blood were collected by retro-orbital bleeding in EDTA-coated microtubes (Sarstedt, Nuembrecht, Germany). Samples were counted using the Hematology Analyzer Advia 120 (Bayer-Diagnostik, Munich, Germany).

**Radioimmunotherapy.** Tumor sizes were monitored by measurement of the length and width of the tumor using calipers immediately before therapy started and thrice per week thereafter. Tumor-bearing mice were either injected with NaCl (controls) or with a single dose (25-74 MBq) of the radiolabeled antibodies I-131-L19-SIP or I-131-L19-IgG1. The maximum activity injected per mouse was determined earlier by dosimetry calculations and confirmed by myelotoxicity studies. All treatment groups consisted of *n* = 6 to 10 animals. In a

| Table 1. Biodistribution of I-125-labeled anti-ED-B antibody formats in F9 tumor-bearing mice each at two selected time points |                                     |              |                    |               |                     |              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------------|---------------|---------------------|--------------|
| Format                                                                                                                         | L19 (scFv) <sub>2</sub> , mean (SD) |              | L19-SIP, mean (SD) |               | L19-IgG1, mean (SD) |              |
| Time points                                                                                                                    | 1 h                                 | 24 h         | 5 h                | 24 h          | 24 h                | 96 h         |
| Uptake in % ID/g                                                                                                               |                                     |              |                    |               |                     |              |
| Spleen                                                                                                                         | 2.3 (0.5)                           | 0.2 (0.0)    | 3.2 (0.4)          | 0.8 (0.1)     | 1.9 (0.5)           | 0.5 (0.4)    |
| Liver                                                                                                                          | 1.8 (0.2)                           | 0.1 (0.0)    | 2.6 (0.3)          | 0.5 (0.1)     | 1.8 (0.4)           | 0.2 (0.1)    |
| Kidneys                                                                                                                        | 27.7 (5.4)                          | 1.5 (0.8)    | 6.9 (3.5)          | 1.0 (0.1)     | 1.5 (0.5)           | 0.3 (0.2)    |
| Lung                                                                                                                           | 4.8 (0.3)                           | 0.7 (0.3)    | 7.2 (1.9)          | 1.4 (0.4)     | 3.6 (1.0)           | 0.4 (0.3)    |
| Bone                                                                                                                           | 3.2 (0.5)                           | 0.8 (0.1)    | 5.8 (0.4)          | 1.9 (0.6)     | 5.5 (1.9)           | 0.9 (1.0)    |
| Thyroid                                                                                                                        | 54.6 (39.1)                         | 214.9 (35.4) | 132.4 (46.8)       | 569.8 (297.7) | 80.0 (78.3)         | 152.2 (78.6) |
| Muscle                                                                                                                         | 1.2 (0.4)                           | 0.6 (0.8)    | 0.8 (0.1)          | 0.3 (0.0)     | 0.4 (0.1)           | 0.2 (0.2)    |
| Tumor                                                                                                                          | 8.6 (2.6)                           | 3.4 (2.3)    | 18.4 (1.8)         | 12.6 (5.0)    | 13.0 (5.0)          | 3.9 (3.1)    |
| Blood                                                                                                                          | 4.7 (0.5)                           | 0.4 (0.0)    | 8.6 (0.5)          | 1.5 (0.1)     | 4.9 (1.9)           | 0.7 (0.9)    |
| Ovaries                                                                                                                        | 7.0 (2.8)                           | 1.3 (0.4)    | 11.6 (3.3)         | 3.1 (0.6)     | 8.5 (3.3)           | 1.8 (1.8)    |
| Uterus                                                                                                                         | 4.2 (0.7)                           | 0.8 (0.3)    | 8.6 (2.6)          | 7.3 (1.8)     | 10.4 (5.7)          | 2.9 (3.5)    |
| Tumor/Tissue ratios                                                                                                            |                                     |              |                    |               |                     |              |
| T/Spleen                                                                                                                       | 3.7 (0.5)                           | 14.1 (8.0)   | 5.8 (1.3)          | 15.8 (5.1)    | 7.5 (4.3)           | 9.0 (4.6)    |
| T/Liver                                                                                                                        | 4.6 (0.9)                           | 25.6 (18.1)  | 7.2 (1.5)          | 29.7 (18.0)   | 7.2 (1.7)           | 19.3 (1.8)   |
| T/Kidneys                                                                                                                      | 0.3 (0.1)                           | 2.6 (2.1)    | 3.2 (1.5)          | 13.3 (5.9)    | 8.6 (0.4)           | 16.8 (9.2)   |
| T/Lung                                                                                                                         | 1.8 (0.5)                           | 5.2 (3.1)    | 2.7 (0.9)          | 9.6 (4.5)     | 3.5 (0.5)           | 8.4 (1.6)    |
| T/Bone                                                                                                                         | 2.6 (0.4)                           | 4.3 (2.2)    | 3.2 (0.5)          | 6.4 (0.8)     | 2.3 (0.4)           | 6.4 (2.9)    |
| T/Thyroid                                                                                                                      | 0.2 (0.1)                           | 0.0 (0.0)    | 0.2 (0.1)          | 0.0 (0.0)     | 0.3 (0.2)           | 0.1 (0.1)    |
| T/Muscle                                                                                                                       | 7.9 (3.2)                           | 24.5 (27.3)  | 25.5 (7.4)         | 48.4 (21.4)   | 30.5 (7.8)          | 24.9 (11.6)  |
| T/Blood                                                                                                                        | 1.8 (0.4)                           | 9.0 (5.6)    | 2.2 (0.3)          | 8.7 (3.9)     | 2.7 (0.0)           | 8.2 (3.9)    |
| T/Ovaries                                                                                                                      | 1.2 (0.1)                           | 3.0 (2.2)    | 1.7 (0.5)          | 4.3 (2.1)     | 1.6 (0.9)           | 3.3 (2.7)    |
| T/Uterus                                                                                                                       | 2.1 (0.9)                           | 4.8 (3.9)    | 2.3 (0.6)          | 1.8 (0.9)     | 1.4 (0.4)           | 1.9 (0.8)    |
| Excretion in % ID                                                                                                              |                                     |              |                    |               |                     |              |
| Urine                                                                                                                          | 30.5 (6.5)                          | 67.8 (7.3)   | 9.7 (5.7)          | 50.2 (2.1)    | 28.7 (13.7)         | 67.5 (12.1)  |
| Faeces                                                                                                                         | 0.0 (0.0)                           | 3.4 (2.1)    | 0.2 (0.3)          | 3.2 (0.74)    | 1.5 (1.0)           | 6.2 (1.8)    |

NOTE: The first time point always represents maximum tumor accumulation of each respective format followed by a wash-out time point. Total excretion is measured cumulatively at indicated time points and is calculated as % injected dose. All data are presented as mean values and SD (*n* = 3).  
Abbreviation: ID, injected dose.

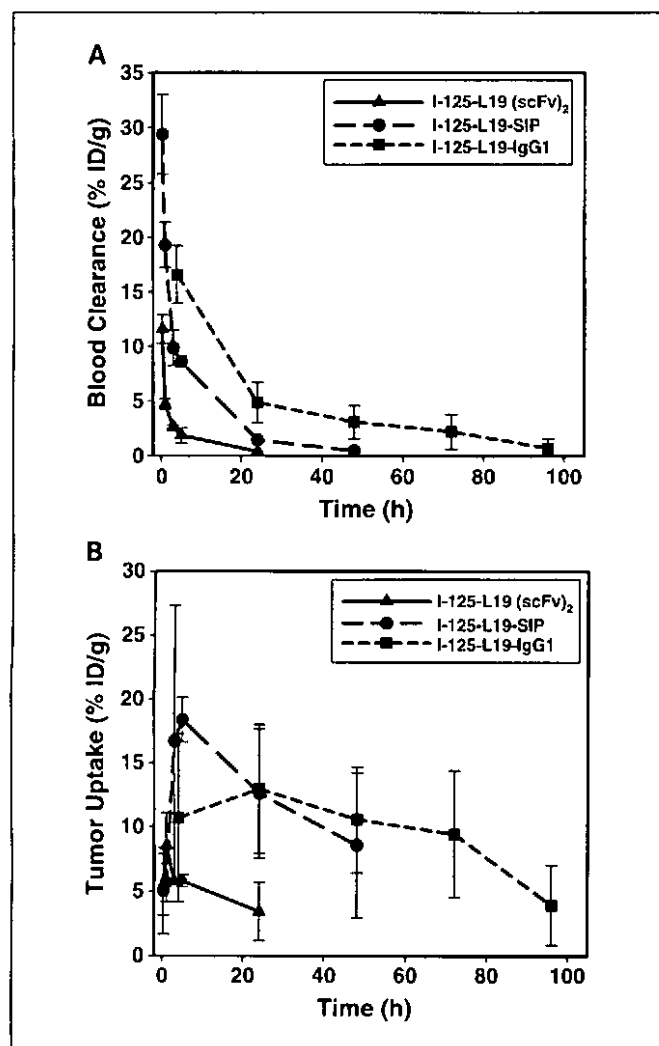


**Fig. 4.** Uptake and clearance kinetics of different I-125-labeled L19 antibody formats from blood (A) and tumor (B). Mice bearing F9 tumors were injected i.v. with I-125-L19 (15 kBq), I-125-L19-SIP (34 kBq), or I-125-L19-IgG1 (83 kBq), respectively. Animals injected with iodinated L19 were sacrificed after 0.25, 1, 3, 5, and 24 hours; mice injected with L19-SIP were sacrificed after 0.25, 1, 3, 5, 24, and 48 hours p.i.; and mice injected with L19-IgG1 were killed after 4, 24, 28, 72, and 96 hours p.i. Radioactivity was measured in the blood and the tumor. Mean percentage injected dose per gram of tissue ( $n = 3$ ); bars,  $\pm$ SD.

separate experiment, the radioiodinated nonbinding small immunoprotein HyHEL-10 (hen egg white lysozyme) was used as the nonspecific control. Criteria to sacrifice the animals were tumor size of  $>300 \text{ mm}^2$ , ulceration of the tumor through the skin and/or body weight loss of  $>20\%$ . Body weights were collected thrice a week.

## Results

**Radiolabeling.** The radiochemical yields of all radioiodinations ranged between 70% and 90% and the purity of the radiolabeled proteins, as determined by SE-HPLC, was always higher than 90%. The specific activities of the final products ranged from 2 to 6 MBq/nmol for the I-125-labeled derivatives and from  $\sim 50$  to 100 MBq/nmol for the I-131-labeled immunoconjugates, respectively. Figure 2 shows a representative SE-HPLC chromatogram of I-125-L19-SIP. The SDS-PAGE

of I-125-L19-SIP (Fig. 3) revealed only minor amounts of iodinated aggregates or fragments and indicated that the main impurity has approximately half the molecular weight of the iodinated product. This impurity is likely the corresponding monomer resulting from cleavage of the disulfide bridge. For all iodinated L19-bearing proteins the immunoreactivity was higher than 80%.

To radiolabel AP39, L19-SIP, or L19-IgG1 with In-111 the proteins had to be conjugated to a bifunctional metal-chelating moiety. Therefore, MX-DTPA isothiocyanate was reacted with the  $\epsilon$ -amine group of lysine residues of the protein. The resulting thio-urea protein-chelator conjugate allowed for easy introduction of the In-111 radiolabel. Incubation at room temperature gave the respective In-111-AP39-MX-DTPA, In-111-L19-SIP-MX-DTPA, and In-111-L19-IgG1-MX-DTPA- radioimmunoconjugates with radiochemical yields ranging from 30% to 60% with specific radioactivity ranging from 2 to 6 MBq/nmol. The radiochemical purity was always higher than 90% and immunoreactivity ranged from 85% to 95%.

**Biodistributions.** Biodistributions in tumor-bearing mice were carried out up to 24 hours with the small antibody format L19 (AP39), up to 72 hours with the intermediate L19-SIP, and up to 96 hours with the full-size antibody L19-IgG1. Two selected time points of each antibody format either labeled with I-125 or with In-111 via MX-DTPA are listed in Tables 1 and 2. Independent of the format, iodinated antibodies showed increasing thyroid uptake over time (thyroid was not blocked) due to dehalogenation of I-125 *in vivo*. Excretion of the radioactivity was predominantly via the urine (up to  $\sim 70\%$  injected dose; Table 1). Whole body elimination and blood clearance were slowest with the full-size antibody format and fastest with the single-chain fragment (Fig. 4A). I-125-L19-SIP showed an intermediate blood and organ clearance and additionally high tumor uptake combined with high tumor-to-tissue ratios (Fig. 4; Table 1). Besides the F9 tumor, specific uptake was found in the ED-B fibronectin-expressing organs ovaries and uterus.

The biodistributions of the In-111-labeled antibodies showed in general a much slower organ and body clearance compared with their I-125-labeled counterparts (Table 2). A particularly high and persistent kidney uptake was found for both of the In-111-labeled antibody fragments, the dimeric single-chain Fv (L19) and the L19-SIP. Whereas the In-111-labeled dimeric single-chain Fv (L19) was rapidly excreted via the urinary pathway (50% injected dose at 24 hours p.i.), the higher molecular weight compounds L19-SIP and L19-IgG1 showed slow excretion in total when labeled with In-111-MX-DTPA. Tumor uptake (in % injected dose/g) was equal or even higher than the iodinated counterparts. However, tumor-to-tissue ratios were significantly lower for all In-111-labeled compounds (Table 2).

**Dosimetry of mouse organs.** Based on the biodistribution data described above, radiation doses for mouse organs were estimated for the three antibody formats and for both therapeutic isotopes (I-131 and Y-90; Table 3 and 4). For I-131, the calculated doses in the ED-B-expressing tumor and organs (ovaries and uterus), as well as in the non-ED-B-expressing organs increased with the molecular weight of the investigated antibody formats (Table 3). The higher dose in both uterus and ovaries is consistent with known ED-B

## Experimental Studies

fibronectin expression in these organs (32), but only the dose to the ovaries could be critical. However, polyovulating mouse ovaries are not comparable with the human situation and are therefore not considered as dose-limiting organs. For the iodinated dimeric single-chain Fv (L19), the kidneys were the dose-limiting organ when related to the human tolerance dose ( $TD_{50/5} = 25$  Gy). It was calculated that 94 MBq of I-131-L19 could be injected per mouse to achieve this kidney dose. This MTA would result in a tumor dose of 25 Gy for a 100-mg F9 tumor. The red marrow ( $TD_{50/5} = 4.5$  Gy) was the dose-limiting organ in case of the L19-SIP and the L19-IgG1. Corresponding MTAs per mouse were ~71 MBq for the I-131-L19-SIP and 24 MBq for I-131-L19-IgG1, resulting in F9 tumor doses of 66 and 27 Gy, respectively. The dose ratio between the dose-limiting organ and F9 tumor (100 mg) here defined as the therapeutic index was highest for the I-131-L19-SIP with a factor of 14.7 (Fig. 5A). For the respective Y-90-labeled antibody formats, significantly higher organ doses and higher tumor doses were found compared with the iodinated counterparts (Table 4). The kidneys were determined to be the dose-limiting organ in case of the dimeric single-chain Fv Y-90-MX-DTPA-AP39 and the Y-90-

MX-DTPA-L19-SIP resulting in MTAs of 3 and 4 MBq, respectively. For the Y-90-MX-DTPA-L19-IgG1, again the red marrow was the dose-limiting organ with a maximum activity of 7 MBq to be injected per mouse. The dose ratios for the therapeutic index (Fig. 5B) of the Y-90 antibody formats were therefore much lower compared with the iodinated antibody formats.

**Myelotoxicity.** Blood cell counts were done in non-tumor-bearing mice injected with increasing doses of I-131-L19-SIP or I-131-L19-IgG1. 37 MBq and 74 MBq of L19-SIP (the approximate MTA, based on dosimetry), and 25 MBq (the approximate MTA, based on dosimetry) and 74 MBq of L19-IgG1 were administered. 74 MBq L19-IgG1 was chosen as a second dose group with expected severe bone marrow toxicity. Figure 6 shows the blood cell counts at the respective doses. The nadirs of leukocyte counts depending on the dose were reached at 1 to 2 weeks after antibody administration. At the respective MTAs for I-131-labeled L19-SIP and L19-IgG1, the severity of the myelotoxicity was not significantly different for both antibody formats (Fig. 6A). However, recovery from myelotoxicity was faster for the L19-SIP (~3 weeks p.i.) compared to the L19-IgG1 (4-5 weeks p.i.).

**Table 2.** Biodistribution of In-111-labeled anti-ED-B antibody formats in F9 tumor-bearing mice each at two selected time points

| Formats             | AP39 sc(Fv) <sub>2</sub> , mean (SD) |            | L19-SIP, mean (SD) |            | L19-IgG1, mean (SD) |             |
|---------------------|--------------------------------------|------------|--------------------|------------|---------------------|-------------|
|                     | 1 h                                  | 24 h       | 4 h                | 24 h       | 24 h                | 96 h        |
| Uptake in % ID/g    |                                      |            |                    |            |                     |             |
| Spleen              | 1.9 (0.5)                            | 1.2 (0.2)  | 4.1 (0.2)          | 3.7 (0.5)  | 8.1 (3.8)           | 7.2 (0.7)   |
| Liver               | 2.6 (1.3)                            | 2.3 (0.8)  | 6.4 (0.3)          | 7.1 (1.0)  | 6.1 (2.4)           | 3.3 (0.4)   |
| Kidneys             | 66.9 (8.2)                           | 44.0 (3.4) | 22.9 (2.4)         | 32.1 (2.9) | 6.0 (0.8)           | 1.7 (0.4)   |
| Lung                | 1.5 (1.6)                            | 0.8 (0.2)  | 8.2 (0.4)          | 3.5 (0.6)  | 2.0 (0.7)           | 0.7 (0.2)   |
| Bone                | 3.0 (0.5)                            | 1.6 (0.2)  | 5.5 (1.1)          | 8.0 (1.5)  | 10.9 (2.8)          | 4.0 (1.3)   |
| Thyroid             | 7.9 (8.6)                            | 1.7 (1.1)  | 8.7 (3.9)          | 3.9 (1.4)  | 1.9 (0.7)           | 1.1 (0.2)   |
| Muscle              | 3.4 (4.5)                            | 0.4 (0.1)  | 1.0 (0.1)          | 1.1 (0.1)  | 0.4 (0.1)           | 0.3 (0.2)   |
| Tumor               | 12.9 (4.8)                           | 4.3 (0.8)  | 16.7 (5.2)         | 14.3 (1.5) | 12.0 (1.9)          | 4.9 (0.9)   |
| Blood               | 5.6 (1.9)                            | 0.1 (0.0)  | 9.4 (0.4)          | 1.9 (0.2)  | 2.3 (1.2)           | 0.3 (0.2)   |
| Ovaries             | 4.6 (1.5)                            | 2.5 (0.3)  | 25.8 (6.9)         | 11.7 (4.8) | 9.5 (2.2)           | 5.4 (1.1)   |
| Uterus              | 8.6 (11.8)                           | 4.3 (1.5)  | 10.1 (4.5)         | 18.0 (1.9) | 7.9 (7.4)           | 7.8 (3.0)   |
| Tumor/Tissue ratios |                                      |            |                    |            |                     |             |
| T/Spleen            | 7.4 (4.6)                            | 3.7 (0.2)  | 4.1 (1.4)          | 3.9 (0.4)  | 1.7 (1.3)           | 0.7 (0.1)   |
| T/Liver             | 7.2 (7.0)                            | 2.0 (0.6)  | 2.6 (0.9)          | 2.0 (0.1)  | 2.2 (1.1)           | 1.5 (0.3)   |
| T/Kidneys           | 0.2 (0.1)                            | 0.1 (0.0)  | 0.8 (0.3)          | 0.5 (0.1)  | 2.1 (0.6)           | 2.9 (0.2)   |
| T/Lung              | 17.6 (13.3)                          | 5.8 (1.0)  | 2.0 (0.6)          | 4.2 (0.3)  | 6.2 (1.7)           | 7.4 (1.0)   |
| T/Bone              | 4.5 (2.2)                            | 2.7 (0.2)  | 3.1 (1.1)          | 1.8 (0.4)  | 1.2 (0.4)           | 1.3 (0.2)   |
| T/Thyroid           | 2.7 (1.7)                            | 3.2 (1.5)  | 2.2 (1.3)          | 4.0 (1.2)  | 7.1 (3.1)           | 4.6 (1.0)   |
| T/Muscle            | 9.8 (7.1)                            | 9.9 (1.4)  | 16.5 (3.6)         | 12.8 (1.8) | 30.7 (12.1)         | 19.5 (10.3) |
| T/Blood             | 2.8 (2.0)                            | 38.4 (3.8) | 1.8 (0.6)          | 7.6 (0.8)  | 6.4 (3.1)           | 17.5 (5.5)  |
| T/Ovaries           | 3.0 (1.5)                            | 1.8 (0.4)  | 0.7 (0.4)          | 1.3 (0.4)  | 1.3 (0.3)           | 0.9 (0.1)   |
| T/Uterus            | 4.2 (3.2)                            | 1.1 (0.3)  | 1.8 (0.7)          | 0.8 (0.0)  | 2.6 (1.8)           | 0.7 (0.2)   |
| Excretion in % ID   |                                      |            |                    |            |                     |             |
| Urine               | 19.0 (16.8)                          | 50.3 (5.3) | 5.5 (1.1)          | 20.3 (5.1) | 14.9 (4.5)          | 52.7 (3.2)  |
| Faeces              | 2.0 (1.9)                            | 5.1 (3.5)  | 0.5 (0.4)          | 4.1 (2.0)  | 2.6 (0.7)           | 14.6 (2.2)  |

NOTE: The first time point always represents maximum tumor accumulation of the respective format followed by a wash-out time point. Total excretion is measured cumulatively at indicated time points and is calculated as % injected dose. All data are presented as mean values and SD ( $n = 3$ ).

Abbreviation: ID, injected dose.

**Table 3.** Doses delivered to mouse organs and F9 tumor (100 mg) calculated for the therapeutic isotope I-131 based on biodistributions with three I-125-labeled anti-ED-B antibody formats (mGy/MBq)

| Organ, I-131       | Mouse organ doses (mGy/MBq) |         |          |
|--------------------|-----------------------------|---------|----------|
|                    | L19 (scFv) <sub>2</sub>     | L19-SIP | L19-IgG1 |
| Spleen             | 15                          | 61      | 163      |
| Liver              | 7                           | 50      | 170      |
| Kidneys            | 265                         | 160     | 315      |
| Lung               | 79                          | 176     | 560      |
| Red Marrow         | 14                          | 63      | 186      |
| Ovaries            | 517                         | 586     | 664      |
| Uterus             | 133                         | 959     | 1,019    |
| F9 Tumor (100 mg)  | 264                         | 925     | 1,135    |
| MTA (MBq)          | 94                          | 71      | 24       |
| F9 Tumor Dose (Gy) | 25                          | 66      | 27       |

NOTE: The dose to a F9 tumor (100 mg) after injection of the maximum tolerated activity is additionally presented for the three I-125-labeled anti-ED-B antibody formats (Gy).

The number of thrombocytes returned 1 week earlier into the reference range than the leukocytes (Fig. 6B). In the group of animals receiving 37 MBq of I-131-L19-SIP, no significant drop beneath the reference range of leukocytes as well as thrombocyte counts was detected. After injection of 74 MBq I-131-L19-IgG1, severe toxicity to the mice was found in terms of rapid body weight loss of >20% and dramatic decrease of leukocytes and thrombocytes counts after 1 week. The bone marrow damage due to radiation was irreversible and resulted in death of all animals. The results of these

myelotoxicity studies confirmed the calculated MTAs for I-131-labeled L19-SIP and L19-IgG1 with the red bone marrow as the dose-limiting organ in a radioimmunotherapeutic setting.

**Radioimmunotherapy.** Radioimmunotherapy with a single injection of I-131-L19-SIP (37-74 MBq) showed a dose-dependent effect on the growth of F9 tumors in mice (Fig. 7). Treatment with the MTA of 74 MBq I-131-L19-SIP (determined by dosimetry calculations and myelotoxicity studies; as described before) led to a stasis of tumor growth for 10 days (Fig. 7A). Median survival after high-dose treatment (74 MBq) was 22 versus 15 days for mice treated with 37 MBq and 9 days for untreated controls (Fig. 7B). In all groups, body weight loss did not exceed 5%. In a separate control experiment using the unspecific small immunoprotein HyHEL-10, no therapeutic effect on F9 tumor growth could be observed (data not shown). Survival of the animals injected with 64 MBq I-131-HyHEL-10 was identical to untreated control animals. A tumor regression study was also done with the I-131-radiolabeled L19-IgG1 in the F9 tumor model. The MTA of I-131-L19-IgG1 was determined to be 25 MBq. Given as a single injection, 25 MBq I-131-L19-IgG1 led to slower tumor growth and a 7-day prolongation of survival compared to the untreated controls (Fig. 8). No loss in body weight was observed.

**Table 4.** Doses delivered to mouse organs and F9 tumor (100 mg) calculated for the therapeutic isotope Y-90 based on biodistributions with three In-111-labeled anti-ED-B antibody formats (mGy/MBq)

| Organ, Y-90        | Mouse organ doses (mGy/MBq) |         |          |
|--------------------|-----------------------------|---------|----------|
|                    | AP39 sc(Fv) <sub>2</sub>    | L19-SIP | L19-IgG1 |
| Spleen             | 123                         | 557     | 1,370    |
| Liver              | 466                         | 1,489   | 1,699    |
| Kidneys            | 10,153                      | 6,876   | 1,620    |
| Lung               | 265                         | 1,042   | 757      |
| Thyroid            | 333                         | 462     | 321      |
| Red Marrow         | 39                          | 211     | 635      |
| Ovaries            | 232                         | 1,293   | 1,465    |
| Uterus             | 921                         | 1,972   | 2,141    |
| F9 Tumor(100 mg)   | 578                         | 1,925   | 1,720    |
| MTA (MBq)          | 3                           | 4       | 7        |
| F9 Tumor Dose (Gy) | 1                           | 7       | 12       |

NOTE: The dose to a F9 tumor (100 mg) after injection of the maximum tolerated activity is additionally presented for the three In-111-labeled anti-ED-B antibody formats (Gy).

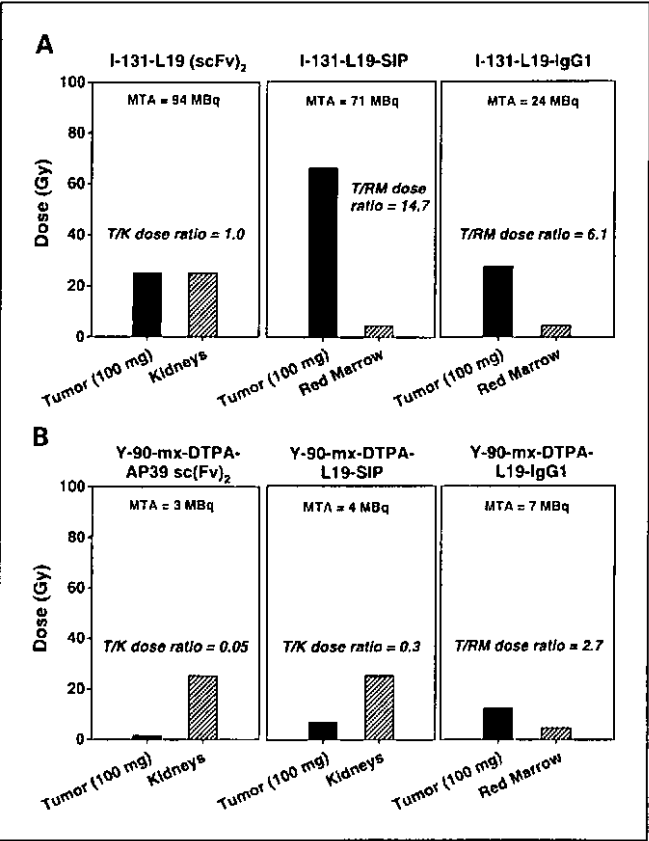


**Fig. 5.** Therapeutic index given as the ratio between F9 tumor and dose-limiting organ doses for I-131-labeled (A) and Y-90-labeled (B) anti-ED-B antibody formats. Dose-limiting organs (either kidney or red marrow) were determined by reference to known human tolerance dose (TD<sub>50/5</sub>) values. The F9 tumor dose was calculated for a tumor mass of 100 mg. The MTA, (given in MBq) corresponds to the amount of injected activity that delivers the TD<sub>50/5</sub> to the dose-limiting organ.

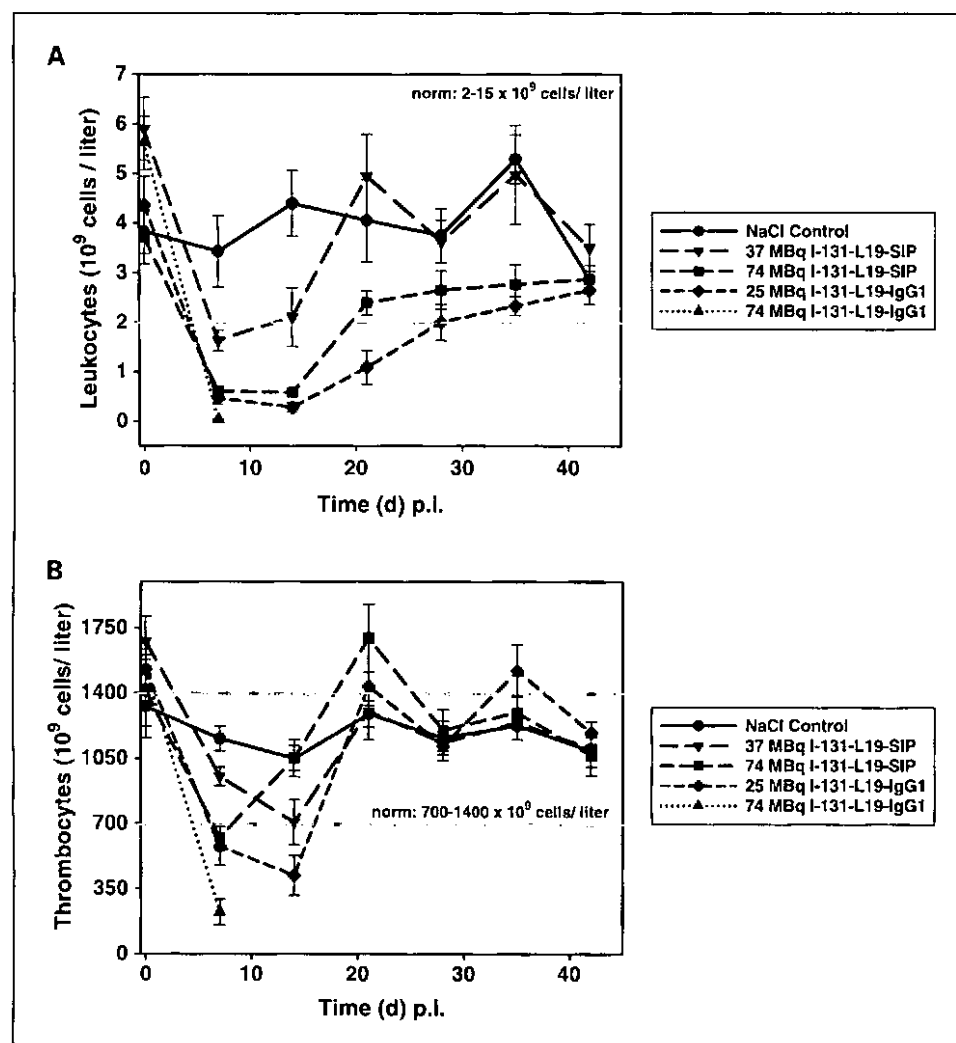


Fig. 6. Myelotoxicity in non-tumor-bearing mice after single administration of different doses I-131-L19-SIP (37 and 74 MBq) and I-131-L19-IgG1 (25 and 74 MBq). The blood cell counts were determined weekly for 6 weeks. A, leukocytes; B, thrombocytes. Mean ( $n = 6$ ); bars,  $\pm$  SE.

## Discussion

In the present study, different formats of the anti-ED-B fibronectin antibody L19 (dimeric single-chain Fv, SIP, and IgG1) have been investigated after radioiodination and radiometal labeling. All tested L19-based radioimmunoconjugates displayed good targeting of ED-B fibronectin expressing tissues (i.e., tumor, uterus, and ovaries) in biodistribution studies. ED-B fibronectin expression in F9 tumors as well as in uterus and ovaries has been reported earlier (14, 32). As expected, based on their molecular weights, elimination from normal organs and whole body was slowest with the IgG1 and fastest with the dimeric single-chain Fv (Tables 1 and 2). In general, In-111-labeled anti-ED-B antibodies (labeled via MX-DTPA) showed significantly slower organ and whole body clearance compared with their I-125-labeled counterparts (Tables 1 and 2). In particular, the In-111-labeled derivatives AP39 and L19-SIP showed a high and persistent kidney uptake as documented for other radiometal-labeled antibody fragments (33, 34). Previous studies have already shown that In-111-labeled DTPA-conjugated antibody fragments (via lysine residues) were degraded to a DTPA- $\epsilon$ -amino-lysine derivative, which is retained in the lysosomes of the kidneys (35). In contrast to In-111-labeled L19-SIP, its I-125-labeled counterpart

did not show such a high and persistent kidney retention. This result is in agreement with a report of Yazaki et al. (36) who made the same observation when they had investigated the biodistribution of an anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment of similar size after I-125 and In-111 labeling.

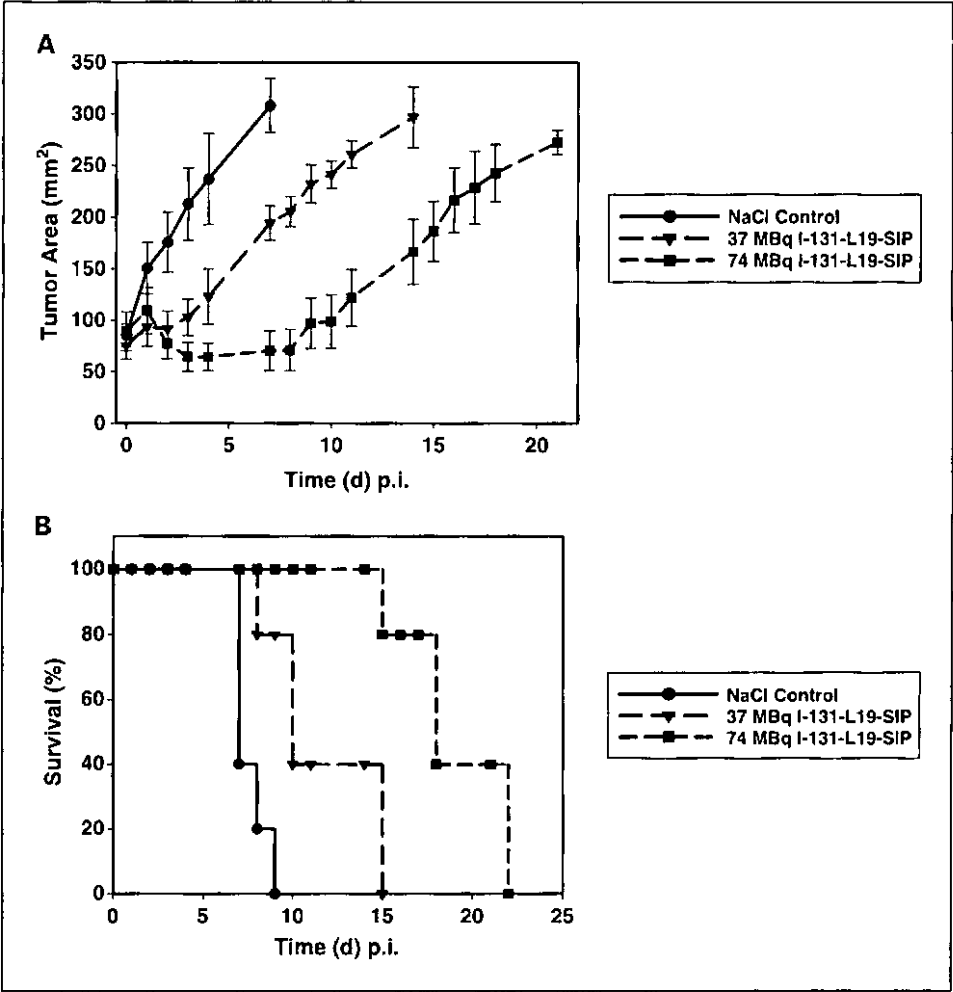
For radiolabeled antibodies and antibody fragments used for radioimmunotherapy, the ionizing dose that can be administered is limited by the dose tolerated by normal organs and tissues. By making dose estimates based on biodistribution studies, critical organs can be determined before therapy. By this means, safe activity doses can be calculated either for patients or for animals. In addition, a certain range of effectiveness to the tumor can be predicted, which is needed for individual treatment planning and patient management. In our animal study, we decided in particular not to pursue Y-90-labeled antibody formats for tumor therapy, because based on medical internal radiation dose dosimetry, I-131-labeled antibodies seemed much more promising in terms of mouse organ doses and doses delivered to the tumor after injection of the MTA (Tables 3 and 4). However, it has to be considered that dosimetry based on medical internal radiation dose is very limited as it uses several simplified assumptions such as an homogenous organ or tumor distribution of the labeled compound (28).

In addition, this principle is considered for human use but not for animals. Only a few reports described mouse dosimetry models and mouse S-values taking only a few isotopes and some selected organs into account (37–39). An extensive, user-friendly software does not exist for animals thus far. Other difficulties in mouse dosimetry reveal for example the cross-fire effect, which is especially important for Y-90 due to its long range of  $\beta$  particles but relatively small size of mouse organs. However, the cross-fire effect of Y-90-labeled antibodies was not considered in our study. For the short-range  $\beta$  particles of I-131, the cross-fire effect in mice is less important. The dose-limiting toxicity of radioimmunoconjugates is in most cases either hematopoietic suppression resulting from the marrow radiation exposure associated with the circulation time of the radioimmunoconjugate (40) or nephrotoxicity due to high uptake and retention of the radioimmunoconjugate in the kidneys (41). Concerning the bone marrow toxicity of radioimmunoconjugates, it should be mentioned that the calculation of human red marrow doses is still under debate. Several methods have been tested thus far without a final consensus (28, 42–44). Nevertheless, our mouse dosimetry results regarding the predicted bone marrow MTAs for I-131-L19-SIP and I-131-L19-IgG1 were confirmed by the myelotoxicity study, because after injection of the predicted MTA, a reversible decrease of both leukocytes and thrombocytes below normal was observed for both

radioimmunoconjugates (Fig. 6a and b). These results show the predictive power and usefulness of the dosimetric calculations.

The most favorable therapeutic index (dose ratio between the F9 tumor and the dose-limiting organ) was observed for I-131-L19-SIP (Fig. 5a and b). Therefore, higher doses to the tumor can be safely delivered by I-131-L19-SIP compared with the other investigated radioimmunoconjugates. The better performance of I-131-L19-SIP compared with I-131-L19-IgG1 could also be shown by improved therapeutic efficacy (Figs. 7 and 8). The question of which format should be used for radioimmunotherapy was often addressed using different targets and different radioimmunoconjugates (45, 46) but still remains unsolved. Additionally, therapeutic isotopes were compared at their MTAs to find the most suited dose rate and effectiveness (47, 48). Whereas some have recommended iodinated Fab fragments (47), we came to the conclusion that the I-131-labeled small immunoprotein is the most suitable radioimmunoconjugate for ED-B fibronectin-targeted radioimmunotherapy. Cure of tumor-bearing animals was not achieved, which might be influenced by several factors. First, the F9 teratocarcinoma is a very aggressive tumor (doubling time ~ 48 hours) and therapy studies were started with already palpable tumors of ~ 80 mm<sup>2</sup> in size. Second, neither dose fractionation nor repeated injections after recovery from toxic side effects were tested here. Dose fractionation as well as repeated injections of

Fig. 7. Tumor growth (A) and survival (B) curves of F9 tumor-bearing mice treated with I-131-L19-SIP given as a single injection of either 37 or 74 MBq compared with control animals injected with saline. Mean tumor area (tumor growth,  $n = 5$ ); bars,  $\pm$  SE.



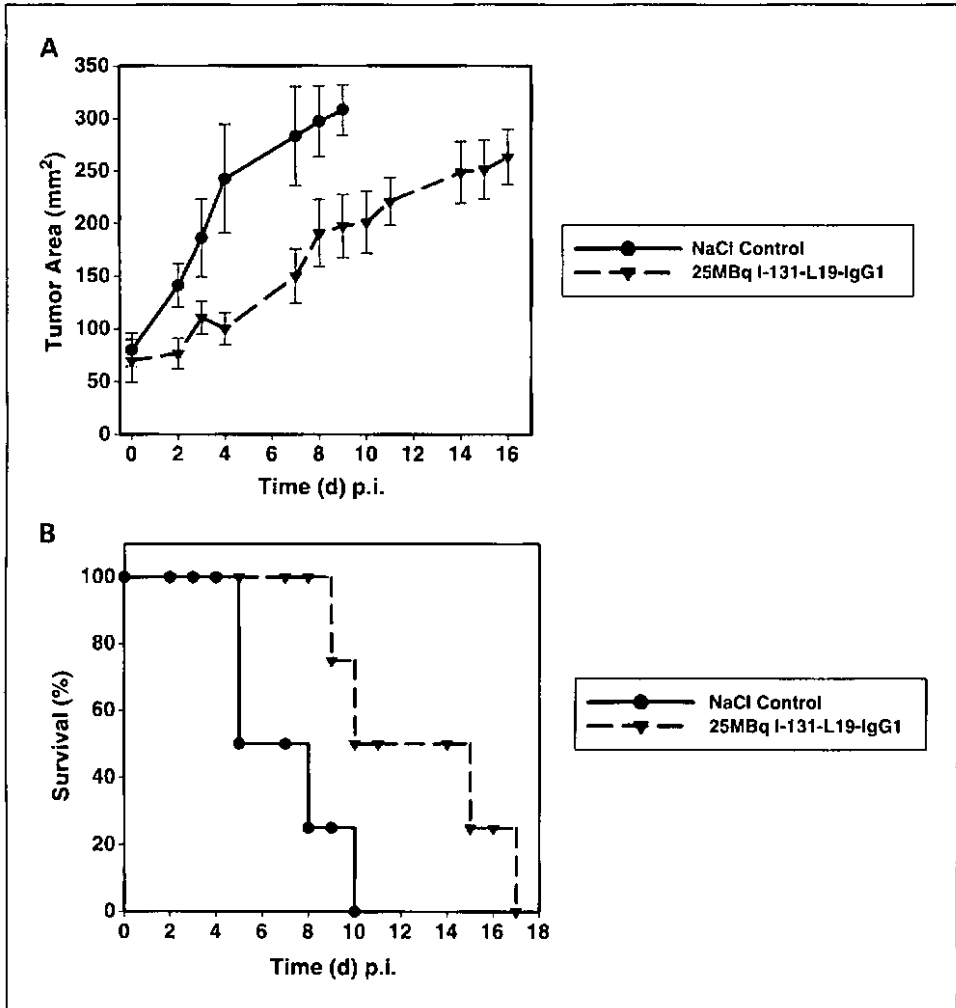


Fig. 8. Tumor growth (A) and survival (B) curves of F9 tumor-bearing mice treated with I-131-L19-IgG1 given as single injection of 25 MBq compared with control animals injected with saline. Mean tumor area (tumor growth, *n* = 8); bars,  $\pm$  SE.

radioimmunoconjugates given at their maximum tolerated doses have been reported to improve the prospects of radioimmunotherapy significantly (49–51).

In conclusion, the results presented in this report suggest a new avenue for the treatment of cancer in patients by ED-B fibronectin-targeted radioimmunotherapy. Based on animal experiments, we have identified the I-131-labeled human SIP as the best-suited antibody format for ED-B-targeted radioimmunotherapy when compared with I-131-labeled dimeric single-chain Fv and IgG1 formats, as well as Y-90-labeled dimeric single-chain Fv, SIP, and IgG1. The administration of

I-131-labeled ED-B fibronectin-binding L19-SIP led to an effective tumor growth delay and prolonged survival in an extremely aggressive tumor model without causing severe side-effects. This novel radioimmunoconjugate could potentially be used for the treatment of solid cancers.

Acknowledgments

We thank Melanie Appel, Ingo Horn, Joerg Pioch, Volker Stickel, Ingolf Weber, and Simone Zolchow for excellent technical assistance and Dieter Moosmayer and Guido Malawski for production and purification of the AP39 antibody fragment.

References

- Vose JM. Antibody-targeted therapy for low-grade lymphoma. *Semin Hematol* 1999;36:15–20.
- Goldenberg DM. The role of radiolabeled antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: the coming of age of radioimmunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001;39:195–201.
- Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res* 1990;50:814–9s.
- Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 1992; 52:3402–8.
- Paganelli G, Magnani P, Zito F, et al. Three-step mono-clonal antibody targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients. *Cancer Res* 1991;51:5960–6.
- Barbet J, Kraeber-Bodere F, Vuillez JP, Gautherot E, Rouvier E, Chatal JF. Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* 1999;14:153–66.
- Breitz HB, Weiden PL, Boauquier PL, et al. Clinical optimization of pretargeted radioimmunotherapy with antibody-streptavidin conjugate and <sup>90</sup>Y-DOTA-biotin. *J Nucl Med* 2000;41:131–40.
- Imam SK. Status of radioimmunotherapy in the new millenium. *Cancer Biother Radiopharm* 2001;16: 237–56.
- Zardi L, Carnemolla B, Siri A, et al. Transformed hu-man cells produce a new fibronectin isoform by prefer- ential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 1987;6:2337–42.
- Carnemolla B, Neri D, Castellani P, et al. Phage anti- bodies with pan-species recognition of the oncofoetal angiogenesis marker fibronectin ED-B domain. *Int J Cancer* 1996;68:397–405.
- Neri D, Carnemolla B, Nissim A, et al. Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform. *Nat Biotechnol* 1997;15:1271–5.
- Pini A, Viti F, Santucci A, et al. Design and use of a phage display library. Human antibodies with sub- nanomolar affinity against a marker of angiogenesis

- cluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* 1998; 273:21769-76.
13. Viti F, Tarli L, Giovannoni L, Zardi L, Neri D. Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:347-52.
  14. Tarli L, Balza E, Viti F, et al. A high-affinity human antibody fragment that targets tumoral blood vessels. *Blood* 1999;94:192-8.
  15. Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL, et al. Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:571-9.
  16. Birchler M, Viti F, Zardi L, Spiess B, Neri D. Selective targeting and photocoagulation of ocular angiogenesis mediated by a phage-derived human antibody fragment. *Nat Biotechnol* 1999;17:984-8.
  17. Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, Neri D. Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res* 2001;61:711-6.
  18. Carnemolla B, Borsi L, Balza E, et al. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood* 2002;99:1659-65.
  19. Halin C, Rondini S, Nilsson F, et al. Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to neovasculature. *Nat Biotechnol* 2002;20:264-9.
  20. Borsi L, Balza E, Carnemolla B, et al. Selective targeted delivery of TNF $\alpha$  to tumor blood vessels. *Blood* 2003;102:4384-92.
  21. Borsi L, Balza E, Bestagno M, et al. Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int J Cancer* 2002;102:75-85.
  22. Scheuermann J, Viti F, Neri D. Unexpected observation of concentration-dependent dissociation rates for antibody-antigen complexes and other macromolecular complexes in competition experiments. *J Immunol Methods* 2003;276:129-34.
  23. Fraker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ -6 $\alpha$ -diphenylglycouril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;80:849-57.
  24. Birchler M, Neri G, Tarli L, Halin C, Viti F, Neri D. Infrared photodetection for the *in vivo* localization of phage-derived antibodies directed against angiogenic markers. *J Immunol Methods* 1999;231:239-48.
  25. Brechbiel MW, Gansow OA. Backbone-substituted DTPA-ligands for Y-90 radioimmunotherapy. *Bioconjugate Chem* 1991;2:187-94.
  26. Lehmann L, Suelzle D, Friebe M, Brumby T, Platzek J, inventors; Schering AG, assignee. Conjugate enantiomerically pure (4S,8S)- and (4R, 8R)-4-*p*-benzyl-8-methyl-3,6,9-triaza-3*N*,6*N*,9*N*-tricarboxymethyl-1,11-undecanoic acid and their metal complexes with biomolecules, procedure for their production and use in radiodiagnostics and radiotherapy. Germany patent DE 10305463 A1 20040812; 2003.
  27. Borsi L, Carnemolla B, Balza E, et al. inventors; Philogen S.r.l., Schering AG, assignees. Selective targeting of tumor vasculature using anti-fibronectin antibodies. PCT International patent application WO 2003076469 A2 20030918; 2003.
  28. Loevinger R, Budinger T, Watson E. *MIRD Primer for absorbed dose calculations*. New York: Society of Nuclear Medicine; 1988.
  29. Siegel JA, Thomas SR, Stubbs JB, et al. *MIRD Pamphlet No. 16: techniques for quantitative radiopharmaceutical biodistribution data acquisition and analysis for use in human radiation dose estimates*. *J Nucl Med* 1999;40:37-61S.
  30. Sgouros G. Bone marrow dosimetry for radioimmunotherapy: theoretical considerations. *J Nucl Med* 1993;34:689-94.
  31. Pizzarello DJ, Witcofski RL. *Medical radiation biology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1982.
  32. Carnemolla B, Balza E, Siri A, et al. A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol* 1989; 108:1139-48.
  33. Tahtis K, Lee FT, Smyth FE, et al. Biodistribution properties of In-111-labeled C-functionalized *trans*-cyclohexyl diethylenetriaminepentaacetic acid humanized 3S193 diabody and F(ab')<sub>2</sub> constructs in a breast carcinoma xenograft model. *Clin Cancer Res* 2001;7: 1061-72.
  34. Colcher D, Goel A, Pavlinkova G, Beresford G, Booth B, Batra SK. Effects of genetic engineering on the pharmacokinetics of antibodies. *Q J Nucl Med* 1999;43:132-9.
  35. Rogers BE, Franano FN, Duncan JR, et al. Identification of metabolites of 111In-diethylenetriaminepentaacetic acid-monoconal antibodies and antibody fragments *in vivo*. *Cancer Res* 1995;55:5714-20s.
  36. Yazaki PJ, Wu AM, Tsai S, et al. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and T84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments. *Bioconjugate Chem* 2001;12:220-8.
  37. Hui TE, Fisher DR, Kuhn JA, et al. A mouse model for calculating cross-organ  $\beta$  doses from Yttrium-90-labeled immunoconjugates. *Cancer (Suppl)* 1994;73: 951-7.
  38. Flynn AA, Green AJ, Podley RB, Boxer GM, Boden R, Begent RHJ. A mouse model for calculating the absorbed  $\beta$ -particle dose from I-131- and Y-90-labeled immunoconjugates, including a method for dealing with heterogeneity in kidney and tumor. *Radiation Res* 2001;156:28-35.
  39. Kolbert KS, Watson T, Matei C, Xu S, Koutcher JA, Sgouros G. Murine S factors for liver, spleen, and kidney. *J Nucl Med* 2003;44:784-91.
  40. Bander NH, Nanus DM, Milowsky MI, Kostakoglu L, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ. Targeted systemic therapy of prostate cancer with a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen. *Semin Oncol* 2003;30:667-77.
  41. Adams GP, Shaller CC, Dadachova E, et al. A single treatment of yttrium-90 labeled CHX-A''C6.5 diabody inhibits the growth of established human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Cancer Res* 2004;64:6200-6.
  42. Siegel JA, Yeldell D, Goldenberg DM, et al. Red marrow radiation dose adjustment using plasma FLT3-L cytokine levels: improved correlations between hematologic toxicity and bone marrow dose for radioimmunotherapy patients. *J Nucl Med* 2003; 44:67-76.
  43. O'Donoghue JA, Baidoo NE, Deland D, Welt S, Divgi CR, Sgouros G. Hematologic toxicity in radioimmunotherapy: dose-response relationships for I-131 labeled antibody therapy. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17:435-43.
  44. DeNardo GL, Hartmann-Siantar CL, DeNardo SJ. Radiation dosimetry for radionuclide therapy in a non-myeloablative strategy. *Cancer Biother Radiopharm* 2002;17:107-18.
  45. Hudson PJ. Recombinant antibody constructs in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1999;11: 548-57.
  46. Behr TM, Memtsoudis S, Sharkey RM, et al. Experimental studies on the role of antibody fragments in cancer radio-immunotherapy: influence of radiation dose and dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy. *Int J Cancer* 1998;77:787-95.
  47. Brouwers AH, van Eerd JEM, Frielink C, et al. Optimization of radioimmunotherapy of renal cell carcinoma: labeling of monoclonal antibody cG250 with I-131, Y-90, Lu-177, or Re-186. *J Nucl Med* 2004;45: 327-37.
  48. Behr TM, B  he M, Loehr M, et al. Therapeutic advantages of Auger electron- over  $\beta$ -emitting radio-metals or radioiodine when conjugated to internalizing antibodies. *Eur J Nucl Med* 2000;27:753-65.
  49. Vallabhajosula S, Smith-Jones PM, Navarro V, Goldsmith SJ, Bander NH. Radioimmunotherapy of prostate cancer in human xenografts using monoclonal antibodies specific to prostate specific membrane antigen (PSMA): studies in nude mice. *Prostate* 2004; 58:145-55.
  50. DeNardo GL, Schlom J, Buchsbaum DJ, et al. Rationales, evidence, and design considerations for fractionated radioimmunotherapy. *Cancer (Suppl)* 2002;94:1332-48.
  51. Blumenthal RD, Alisauskas R, Juweid M, Sharkey RM, Goldenberg DM. Defining the optimal spacing between repeat radioantibody doses in experimental models. *Cancer (Suppl)* 1997;80:2624-35.



American Society of Clinical Oncology

www.asco

## A phase I trial of antifibronectin $^{131}\text{I}$ -L19-small immunoprotein (L19-SIP) in solid tumors and lymphoproliferative disease.

Sub-category: Phase I Studies

Category: Developmental Therapeutics: Cytotoxic Chemotherapy

Meeting: 2008 ASCO Annual Meeting

Abstract No: 2575

Citation: *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 2575)

Author(s): G. Del Conte, D. Tosi, A. Fasolo, C. Chiesa, P. Erba, C. M. Grana, H. D. Menssen, G. Mariani, E. Bombardi, L. Gianni

**Abstract:** **Background:** L19-SIP is a human recombinant antibody-fragment consisting of the variable regions of the L mAb directed against the extra-domain B (ED-B) of fibronectin that is overexpressed in tumoral vasculature. explored the targeting potential of  $^{131}\text{I}$ -L19-SIP for both tumor imaging and radioimmunotherapy (RIT). **Methods:**  $^{131}\text{I}$ -L19-SIP (4 mg; 74-193 MBq) was administered iv for dosimetry and pharmacokinetics (PK). Patients (pts) with high tumor uptake (lesion/red marrow absorbed dose ratio  $\geq 10$ ) received a single therapeutic dose of about 3,700 MBq (n=11) or 5,550 MBq (n=7) of  $^{131}\text{I}$ -L19-SIP. Dosimetry was based on dual-head gamma-camera planar imaging. **Results:** 37 pts (median age 59 yr [range 34-82], median ECOG PS 0 [range 0-1], median prior chemotherapies 2 [range 0-5]) with the following cancers were enrolled: colorectal (8), melanoma (7), thymoma (4), mesothelioma (4), prostate (2), pancreatic (2), lymphomas (2), other (8). Eighty pts (48.6%) were eligible for RIT. Blood elimination profile in the first 13 pts: T1/2 $\alpha$  13 h, T1/2 $\beta$  39 h, with an extremely low interpatient variability. Dosimetry estimates as median absorbed doses (Gy): heart wall 2.8, kidneys 3.7, liver 3.0, lungs 1.98, testes 4.2, stomach 0.67, red marrow 0.85, tumor lesions 12.24. Imaging was excellent and in some cases revealed lesions undetected by MRI or CT. Main toxicities of RIT: short-lived grade 3/4 thrombocytopenia (4 pts) and uncomplicated grade 4 neutropenia (1 pt). One objective response was recorded according to RECIST criteria. A clinical benefit was seen in 4 additional pts: stabilization of  $\geq 3$  mm in 1 thymoma pt, clinical evidence of long-term tumor shrinkage in 1 melanoma pt, stabilization of rapidly progressive skin lesions in 1 melanoma pt, and pain palliation in 1 breast cancer pt with brachial plexus neoplastic infiltration. Furthermore, a substantial decrease of [18F]FDG uptake was observed for several lesions in 3 out of 4 mesothelioma pts. **Conclusions:** Good tolerability and high tumor uptake combined with low red marrow absorbed dose justify testing the feasibility of further increase of the  $^{131}\text{I}$ -L19-SIP dose for RIT.

### Abstract Disclosures

### Associated Presentation(s):

1. A phase I trial of antifibronectin  $^{131}\text{I}$ -L19-small immunoprotein (L19-SIP) in solid tumors and lymphoproliferative disease.

No presentation available

Meeting: 2008 ASCO Annual Meeting

Presenter: Gianluca Del Conte, MD

Session: Developmental Therapeutics: Cytotoxic Chemotherapy (General Poster Session)

### Other Abstracts in this Sub-Category

1. Clinical, pharmacokinetic (PK), pharmacodynamic findings in a phase I trial of weekly (wkly) intravenous AZD4877 in patients with refractory solid tumors.  
Meeting: 2008 ASCO Annual Meeting. Abstract No: 2501. First Author: J. R. Infante  
Category: Developmental Therapeutics: Cytotoxic Chemotherapy - Phase I Studies
2. BIIB021, an oral, synthetic non-ansamycin Hsp90 inhibitor: Phase I experience.  
Meeting: 2008 ASCO Annual Meeting. Abstract No: 2503. First Author: A. Elfiky  
Category: Developmental Therapeutics: Cytotoxic Chemotherapy - Phase I Studies
3. Final results of phase I and pharmacokinetic trial of SJG-136 administered on a daily x 3 schedule.  
Meeting: 2008 ASCO Annual Meeting. Abstract No: 2504. First Author: I. Puzanov  
Category: Developmental Therapeutics: Cytotoxic Chemotherapy - Phase I Studies

More...

### Abstracts by G. Del Conte

1. A phase I trial of antifibronectin  $^{131}\text{I}$ -L19-small immunoprotein (L19-SIP) in solid tumors and lymphoproliferative disease.

Meeting: [2008 ASCO Annual Meeting](#). Abstract No: 2575 First Author: [G. Del Conte](#)  
Category: [Developmental Therapeutics: Cytotoxic Chemotherapy - Phase I Studies](#)

2. A phase II combination study of bortezomib with pegylated-liposomal doxorubicin in patients with ovarian cancer failing platinum containing regimens.

Meeting: [2008 ASCO Annual Meeting](#). Abstract No: 5581 First Author: [G. Scambia](#)  
Category: [Gynecologic Cancer - Ovarian Cancer](#)

3. Results from a phase 1/2 study of volociximab in combination with liposomal doxorubicin in relapsed advanced epithelial ovarian and primary peritoneal carcinoma.

Meeting: [2008 ASCO Annual Meeting](#). Abstract No: 16527 First Author: [A. Delmonte](#)  
Category: [Gynecologic Cancer - Ovarian Cancer](#)

More...

# **<sup>131</sup>I-Lym-1 in Mice Implanted with Human Burkitt's Lymphoma (Raji) Tumors: Loss of Tumor Specificity due to Radiolysis**

Gerald L. DeNardo, Sally J. DeNardo, Barry W. Wessels, David L. Kukis, Naomi Miyao, and Aina Yuan

Department of Internal Medicine, University of California Davis Medical Center, Sacramento, CA (G.L.D., S.J.D., D.L.K., N.M., A.Y.), and Department of Radiation Oncology, University Hospitals of Cleveland, Cleveland, OH (B.W.W.)

*Preliminary evaluations of <sup>125</sup>I-labeled Lym-1, an anti-lymphoma mouse IgG<sub>2b</sub> monoclonal antibody, demonstrated favorable tumor uptake in mice bearing human Burkitt's lymphoma (Raji) tumors. In this study, the pharmacokinetics of <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-Lym-1, and the dosimetry, efficacy, and toxicity of <sup>131</sup>I-Lym-1 in Raji-tumored mice were evaluated. Methods. Lym-1 was radioiodinated by the chloramine-T method and analyzed for monomeric fraction and immunoreactivity (antigen cell binding, relative to unmodified Lym-1). Nude mice bearing Raji tumors (20–500 mm<sup>3</sup>) received 1.5 MBq (40 μCi) <sup>125</sup>I-Lym-1, or 1.5, 7.4, 14.8, or 18.5 MBq (40, 200, 400, or 500 μCi) <sup>131</sup>I-Lym-1. Pharmacokinetic data (total body and blood clearance and biodistribution) were used to estimate radiation dosimetry. Mini-thermoluminescent dosimetry (TLD) was also used to measure radiation dosimetry directly for 7 days after injection of <sup>131</sup>I-Lym-1. Tumor size, survival, body weight, and blood counts were monitored for 60 days to evaluate therapeutic efficacy and toxicity of <sup>131</sup>I-Lym-1. Results. At the time of injection, the mean quality assurance (QA) values for <sup>125</sup>I-Lym-1 were 100% monomer and 100% relative immunoreactivity; the corresponding values for <sup>131</sup>I-Lym-1 were 73% and 66%, indicating that radiolysis had occurred during the interval between radiolabeling and injection. <sup>125</sup>I-Lym-1 exhibited high and sustained concentration in tumors relative to normal organs, whereas <sup>131</sup>I-Lym-1 did not. Assuming identical pharmacokinetic behavior to <sup>125</sup>I-Lym-1, <sup>131</sup>I-Lym-1 would deliver radiation doses of 3.45, 0.83, 1.03, 0.34, and 0.56 Gy per MBq injected (12.8, 3.1, 3.8, 1.3, and 2.1 rad/μCi), to tumor, liver, lungs, total body, and marrow, respectively. When the actual pharmacokinetic data for <sup>131</sup>I-Lym-1 (1.5 MBq) were used to estimate dosimetry, corresponding values of 0.51, 0.72, 0.49, 0.31, and 0.41 Gy/MBq (1.9, 2.7, 1.8, 1.1, and 1.5 rad/μCi) were obtained. Similar values were obtained for mice receiving 7.4 or 14.8 MBq of <sup>131</sup>I-Lym-1. Similarly, TLD data indicated little preferential radiation dosimetry to tumor. Response rates (cure + CR + PR) for mice receiving 0, 7.4, 14.8, and 18.5 MBq of <sup>131</sup>I-Lym-1 were 8%, 7%, 21%, and 45%, respectively. The LD<sub>50/30</sub> dose of <sup>131</sup>I-Lym-1 was 12.7 MBq (343 μCi). Conclusions. <sup>125</sup>I-Lym-1 exhibited high and sustained concentration in Raji tumors in mice, indicating excellent therapeutic potential for <sup>131</sup>I-Lym-1. However, in vitro QA results for <sup>131</sup>I-Lym-1 indicated that radiolysis had occurred, and <sup>131</sup>I-Lym-1 demonstrated little accumulation in tumor, or preferential radiation dosimetry to tumor in the same model.*

**Key words:** antibody, iodine-131, Lym-1, lymphoma, radioimmunotherapy

Address reprint requests to Gerald L. DeNardo, M.D., Molecular Cancer Institute, 1508 Alhambra Blvd. Room 3100, Sacramento, CA 95616. Telephone (916) 734-3787; fax (916) 451-2857, e-mail [glddenardo@ucdavis.edu](mailto:glddenardo@ucdavis.edu)

139

INTRODUCTION

Antibody-based radioimmunotherapy (RIT) involves the targeted delivery of radiation to tumors by anti-cancer antibodies. Pharmaceutical development of RIT agents requires careful selection of the antibody and radioisotope, optimization of radiolabeling chemistry, development of *in vitro* evaluations of quality assurance (QA), evaluations of pharmacokinetics, dosimetry, efficacy, and therapeutic efficacy in an appropriate *in vivo* model, and validation of the predictive value of preclinical evaluations.<sup>1,2</sup>

Lym-1 is a mouse IgG<sub>2a</sub> monoclonal antibody (MAb) that targets human leukocyte antigen (HLA)-DR10, that is highly expressed on the surface of malignant human B-cells.<sup>3</sup> Epstein *et al.*<sup>4</sup> produced Lym-1 by immunizing mice with nuclei from Raji cells that originated from a patient with Burkitt's lymphoma; apparently HLA-DR10 was present in the immunogen. Because HLA-DR10 is expressed abundantly on the cell surface of Raji cells, where it is available for binding by Lym-1, Raji is a useful model for the evaluation of Lym-1-antigen binding. In preliminary studies, <sup>125</sup>I-Lym-1 demonstrated favorable tumor uptake in mice bearing Raji tumors.<sup>5</sup>

Herein, we report the results of further preclinical evaluation of Lym-1 (Figure 1). The pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-Lym-1 in Raji-tumored mice were

assessed, to estimate <sup>131</sup>I-Lym-1 radiation dosimetry, assuming identical pharmacokinetics for <sup>131</sup>I-Lym-1. Subsequently, the pharmacokinetics of <sup>131</sup>I-Lym-1 were assessed to estimate radiation dosimetry, to compare with the <sup>125</sup>I-Lym-1 results. <sup>131</sup>I-Lym-1 radiation dosimetry was also measured directly, by mini-thermoluminescent dosimetry (TLD). No biologic mathematical model for the time dependence of activity is required for TLD, because TLD detects cumulated radiation over the period of implantation, thus effectively integrating over time.<sup>6</sup> The therapeutic efficacy (tumor regression) and toxicity (mortality, weight loss, and blood counts) of <sup>131</sup>I-Lym-1 were evaluated. Quality assurance data were used to assess the influence of radiolysis on the *in vivo* behavior of <sup>131</sup>I-Lym-1. These data, plus data from other preclinical and clinical trials of radiolabeled Lym-1 for therapy of NHL, provided a basis to consider the association between *in vitro* QA results, *in vivo* characteristics, therapeutic efficacy in the Raji-tumored mouse model, and therapeutic response in patients with NHL.

MATERIALS AND METHODS

Antibody

Lym-1 is an IgG<sub>2a</sub> mouse MAb with high affinity for a discontinuous epitope on the  $\beta$  subunit of HLA-DR10, located on the surface membrane of

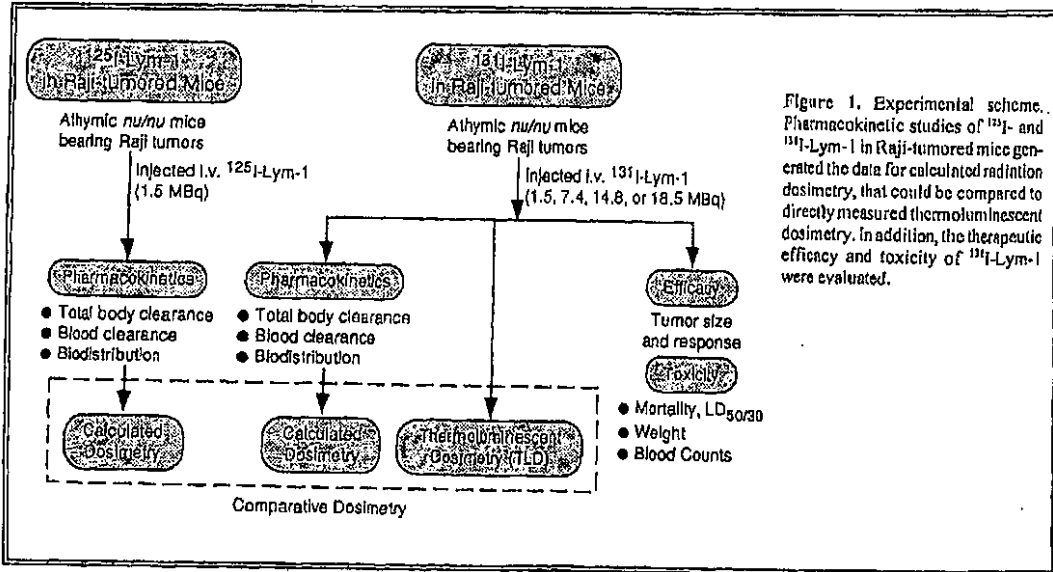


Figure 1. Experimental scheme. Pharmacokinetic studies of <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-Lym-1 in Raji-tumored mice generated the data for calculated radiation dosimetry, that could be compared to directly measured thermoluminescent dosimetry. In addition, the therapeutic efficacy and toxicity of <sup>131</sup>I-Lym-1 were evaluated.

malignant B-lymphocytes.<sup>3</sup> Solid-phase radioimmunoassay techniques have shown that HLA-DR10 is not significantly modulated after Lym-1 exposure nor shed into the circulation of lymphoma patients.<sup>4</sup> Lym-1 was purified from ascites by Protein-A column chromatography.<sup>7</sup>

#### Radiolabeling and Quality Assurance

Lym-1 was iodinated by the chloramine-T method,<sup>7</sup> using 0.1 to 1 mg chloramine-T per mg Lym-1. <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-Lym-1 were radiolabeled with specific activities of 0.50-0.65 GBq/mg (14-18 mCi/mg), and 1.5-1.9 GBq/mg (40-50 mCi/mg), respectively, equivalent to 0.4-1.2 radioiodine molecules per Lym-1 molecule. Five lots (products of individual radiolabelings) of <sup>125</sup>I-Lym-1 and 16 lots of <sup>131</sup>I-Lym-1 were prepared.

High performance liquid chromatography (HPLC), cellulose acetate electrophoresis (CAE), and radioimmunoassay (RIA) were used to assess the purity and quality of <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-Lym-1.<sup>8</sup> HPLC (Beckman, Fullerton, CA) was performed using a gel filtration column (Beckman TSK 3000 SW or equivalent) to determine the percentage of radioiodine associated with the antibody peak (MW 150 kD). CAE (Gelman Sciences, Inc., Ann Arbor, MI) was performed using 0.05 M sodium barbital buffer, pH 8.6. A current of 5 mA per strip was applied. Samples were electrophoresed for 11 and 45 minutes. At 11 minutes, lower MW species, *i.e.*, fragments or free iodine, were resolved from immunoconjugates. At 45 minutes, monomeric immunoconjugates were resolved from higher MW species, *i.e.*, aggregates. The immunoreactivity of <sup>125</sup>I-Lym-1, used for the pharmacokinetics/biodistribution study, was assessed by live cell (Raji) binding assay.<sup>7</sup> The immunoreactivity of <sup>131</sup>I-Lym-1 was assessed by solid-phase binding assay against partially purified membrane fragments from Raji cells.<sup>9</sup> A <sup>125</sup>I-Lym-1 standard, which has been shown to behave like unmodified Lym-1, was assayed in parallel. The relative immunoreactivity of <sup>131</sup>I-Lym-1 was calculated as (% <sup>131</sup>I-Lym-1 bound)/(% <sup>125</sup>I-Lym-1 bound).

#### Tumored Mouse Model

Female athymic *nu/nu* mice (Harlan Sprague Dawley, Frederick, MD) were maintained according to University of California Animal Care guidelines,

on normal diet *ad libitum* and under pathogen-free conditions. Five mice were housed per cage. At 3.3 to 9.3 weeks of age, the mice received 4.0-4.5 Gy (400-450 rads) by external-beam irradiation to suppress immune response to the Raji xenografts; 3-11 days later, Raji cells ( $1-10 \times 10^6$ ) were injected subcutaneously on the dorsal flank(s). Raji is an American Type Culture Collection certified cell line, established in 1963 from a Burkitt lymphoma of the left maxilla of an 11-year-old male. Tumors were grown for 17-36 days. The mice were given potassium iodide continuously in their water beginning one week prior to injection with <sup>125</sup>I- or <sup>131</sup>I-Lym-1. Tumors were measured in 3 orthogonal diameters with a caliper, and tumor volume was calculated by using the formula for hemiellipsoids.<sup>10</sup> At the time of injection, 73% of tumors were well established, *i.e.*, 20-500 mm<sup>3</sup>. To provide directly comparable results with previous studies, only mice with tumors of initial size 20-500 mm<sup>3</sup> were used to evaluate the biodistribution, dosimetry, and efficacy of <sup>131</sup>I-Lym-1, because smaller tumors were associated with enhanced therapeutic efficacy.<sup>10,11</sup> Mice with smaller tumors were included in the toxicity studies (mortality, mouse weight, and blood counts).

#### Injections

Mice received i.v. injections of 1.5 MBq (40  $\mu$ Ci) <sup>125</sup>I-Lym-1, or 1.5, 7.4, 14.8, or 18.5 MBq (40, 200, 400, or 500  $\mu$ Ci) <sup>131</sup>I-Lym-1, in the dorsal tail vein. A dose group was defined as the set of mice receiving a given activity of radiopharmaceutical, *e.g.*, the 14.8 MBq <sup>131</sup>I-Lym-1 dose group. So that all dose groups received radiopharmaceutical of similar quality, every lot of <sup>131</sup>I-Lym-1 was divided among multiple dose groups; for example, one lot was used to prepare two 1.5, six 7.4, and two 14.8 MBq doses. Unmodified Lym-1 was added to radioiodinated Lym-1 such that mice receiving <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-Lym-1 received total protein doses of 3 and 50  $\mu$ g, respectively. Previous studies indicated that 3-50  $\mu$ g Lym-1 exceeded the threshold for hepatocyte receptors, to provide uniform pharmacokinetics.<sup>12</sup>

#### Pharmacokinetic Studies

Clearance of radioactivity from the total body and blood of mice receiving <sup>125</sup>I-Lym-1 (1.5 MBq) and <sup>131</sup>I-Lym-1 (1.5, 7.4, 14.8, and 18.5 MBq) was

assessed. Total body radioactivity was measured at the time of injection, then daily for 7 days, with a dual sodium iodide crystal probe system (Picker Nuclear, North Haven, CT). The radioactivity in blood was evaluated daily for 7 days, by collecting blood samples (10  $\mu$ l) from the dorsal tail vein and counting them in a sodium iodide gamma well counter (Packard, Downers Grove, IL). Decay-corrected radioactivity in the total body and blood were expressed as percent injected dose (%ID) and %ID/ml, respectively.

To assess the biodistribution of  $^{125}$ I-Lym-1 (1.5 MBq) and  $^{131}$ I-Lym-1 (1.5, 7.4, and 14.8 MBq), mice were sacrificed by cervical dislocation 1, 3, and 5 days after injection, and tumors and normal tissues were harvested, weighed, and counted. The decay-corrected concentrations of radioactivity in tumors and normal tissues were expressed as %ID/g.

At least 8 mice in the  $^{125}$ I-Lym-1 group at each time point, and at least 3 mice in each  $^{131}$ I-Lym-1 dose group at each time point, were evaluated for total body and blood clearance. Eight to 10 mice in the  $^{125}$ I-Lym-1 group at each time point, and 4-18 mice in each  $^{131}$ I-Lym-1 dose group at each time point, were evaluated for biodistribution. The mean initial tumor size  $\pm$  1 S.D. in mice evaluated for biodistribution of  $^{125}$ I-Lym-1 (1.5 MBq) or  $^{131}$ I-Lym-1 (1.5, 7.4, or 14.8 MBq) were  $127 \pm 121$ ,  $120 \pm 98$ ,  $132 \pm 79$ , and  $86 \pm 64$  mm<sup>3</sup>, respectively.

#### Estimated Radiation Dosimetry

Pharmacokinetic and biodistribution data from mice receiving  $^{125}$ I-Lym-1 were used to estimate  $^{131}$ I-Lym-1 radiation dosimetry, assuming that  $^{131}$ I-Lym-1 would behave identically *in vivo*. Actual  $^{131}$ I-Lym-1 pharmacokinetic and biodistribution data were also used to calculate radiation dosimetry. Cumulated activities for the total body, blood, tumors, and normal organs were obtained by integration of monoexponential analysis of the pharmacokinetic and biodistribution data. Although blood clearance is biexponential, monoexponential fitting was used to simplify analysis, because the slow  $\beta$ -phase provided the dominant contribution to radiation dosimetry. To estimate the total radiation dose to tumor, liver, lungs, kidneys, and spleen, the penetrating radiation from the body of the mice was added to the nonpenetrating radiation from the

targeting tissue itself. A simplifying assumption of uniformly distributed activity in the total body was used to estimate the contribution from penetrating radiation. The absorbed fraction of photons in a 20 gram mouse was taken to be the same as the MIRD value for the absorbed fraction of photons in a human thyroid (standard man mass 19.6 grams).<sup>13</sup> A mean energy per nuclear transition of 0.0151 (cGy $\cdot$ g)/(MBq $\cdot$ h) was used to estimate the nonpenetrating radiation of  $^{131}$ I in the targeting tissue.<sup>14</sup> A specific activity for blood in marrow of 0.25 was used to estimate the nonpenetrating radiation dose to marrow from blood.<sup>15</sup> As observed by Hui,<sup>16</sup> escaping radiations can substantially affect the radiation dose delivered by long range beta emitters such as  $^{90}$ Y ( $x_{90}$  = 5.2 mm). However, only a small fraction of beta radiations from  $^{131}$ I ( $x_{90}$  = 0.82 mm) escape tumors and normal organs. Sample calculations correcting for absorbed fractions of  $^{131}$ I in tumor, liver, lungs, kidneys, and spleen<sup>17</sup> demonstrated little reduction in radiation dose; thus, correction for escaping  $^{131}$ I radiations was disregarded. However, escaping radiations from the marrow were greater (54%) and corrected radiation doses for marrow are provided parenthetically below.

#### Thermoluminescent Dosimetry

Radiation dosimetry in mice receiving  $^{131}$ I-Lym-1 (1.5, 7.4, 14.8, or 18.5 MBq) was measured directly by mini-TLD, as described previously.<sup>6,18</sup> Shortly before treatment with  $^{131}$ I-Lym-1, 12 mice bearing 23 tumors with a mean volume of  $203 \pm 115$  mm<sup>3</sup> were implanted with 0.2 x 0.4 x 5 mm TLDs, cut from CaSO<sub>4</sub>: Teflon matrix discs (Teledyne, Inc., Westwood, NJ). The TLDs were inserted through a 20 gauge needle in the following locations: right tumor, 1 cm above right tumor, left tumor, 1 cm above left tumor, right shoulder, left shoulder, peritoneum, and liver. Seven days after treatment with  $^{131}$ I-Lym-1, the mice were sacrificed, and the TLDs were removed, washed with decontaminating detergent, rinsed, and redried. To determine the radiation dose (Gy per MBq injected) to the sites of implantation, the optical density of autoradiographic film in the TLDs was converted to cumulated activity, using a calibration curve from film exposed to known cumulated activities. The methodology has been validated in polystyrene tumor phantom models.<sup>18</sup>

Therapeutic Efficacy and Toxicity of <sup>131</sup>I-Lym-1

Mice receiving <sup>131</sup>I-Lym-1 (0, 7.4, 14.8, or 18.5 MBq) were evaluated for therapeutic efficacy and toxicity. Each dose group included 9 or more mice, with similar distributions of tumor sizes among groups. After injection, survival was monitored daily, and mouse weight and tumor size were measured 2-3 times per week. Blood samples were collected 2-3 times per week from 3 or more mice from each dose group, chosen at random, and red blood cell (RBC) and platelet counts were measured as described previously.<sup>10</sup> Mice that survived 60 days after injection were sacrificed.

Therapeutic efficacy was assessed by tumor response, categorized as follows: cure (C), tumor disappeared and did not regrow during the 60 day study; complete regression (CR), tumor disappeared but later regrew; and partial regression (PR), tumor decreased in volume by 50% or more and regrew. Only tumors that began to shrink within 3 weeks of treatment were classified as C, CR, or PR, because earlier studies of the natural history of Raji tumors and their response to RIT indicated that RIT-induced tumor response occurred within this period.<sup>19</sup> Tumors that fulfilled the requirements for CR or PR in mice that subsequently died were categorized as CR (rather than C, which required the absence of tumor at 60 days) or PR. The time required for every tumor to double in volume after treatment with <sup>131</sup>I-Lym-1 was measured, and the median doubling time was determined for each dose group. If a mouse died, e.g., at 13 days and its tumor

had not doubled in size, its tumor doubling time was assessed as greater than 13 days.

Deaths within 30 days were attributed to radiation toxicity, as documented previously.<sup>10,20,21</sup> Logistic regression analysis (SAS system software, SAS Institute, Inc., Cary, NC) was used to estimate the injected activity of <sup>131</sup>I-Lym-1 lethal to 50% of the mice within 30 days (LD<sub>50/30</sub>), and a 95% confidence interval was calculated by Fieller's method.<sup>22</sup>

Microautoradiography of <sup>125</sup>I-Lym-1 in Cell Culture

Raji cells were incubated with <sup>125</sup>I-Lym-1 in RPMI 1640 (96 kBq/10<sup>6</sup> cells/0.1 ml) and incubated at 37 °C for 24 hours. The cells were washed three times with 0.15 M phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS), resuspended in PBS (0.1 ml), and added to a slide that was previously coated with 0.5% agarose. Acetic acid (2%; 0.1 ml) was added to the same area of the slide and spread evenly. The slide was dried by rapid passes over a flame, then rinsed by dipping 15-20 times in purified water (18 MΩ, NANOpure II, Barnstead, MA) to remove salt crystals. In a darkroom, the slides were dipped in NTB-2 nuclear track emulsion (Eastman Kodak, Rochester, NY), placed on absorbent paper in a light-tight slide box and incubated at 4°C for 1-2 hours. The slides were developed for 3-5 minutes in D-19 developer (Eastman Kodak) at 16°C, washed gently in distilled water for 3-5 minutes, placed in Rapid Fix (Eastman Kodak) for 8-10

| TABLE 1. Quality assurance of <sup>131</sup> I-Lym-1 at intervals of time following radiolabeling. |                                                   |              |         |                                   |                |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------|---------|-----------------------------------|----------------|-----------|
| Interval after radiolabeling (hours)                                                               | Median Quality Assurance Results (%) <sup>*</sup> |              |         | Mice injected during interval (%) |                |           |
|                                                                                                    | HPLC                                              | CAE          | RIA     | Pharmacokinetics study            | Efficacy study | TLD study |
| 0.00-0.99                                                                                          | 93                                                | 8 / 92 / 1   | 70      | 1                                 | 4              | 0         |
| 1.00-1.99                                                                                          | 86                                                | 18 / 73 / 10 | 66      | 39                                | 43             | 42        |
| 2.00-2.99                                                                                          | 85                                                | 20 / 73 / 8  | 66      | 52                                | 25             | 17        |
| 3.00-3.99                                                                                          | 64                                                | 21 / 64 / 15 | no data | 7                                 | 10             | 17        |
| 4.00-6.50                                                                                          | 66                                                | 26 / 56 / 19 | 50      | 0                                 | 18             | 25        |

<sup>\*</sup> % 150 kD by HPLC; % higher MW / % monomeric / % lower MW by CAE (may add up to >100 because of rounding); % immunoreactivity relative to unmodified Lym-1 by RIA

minutes, and washed under running water. The slides were dehydrated, excess emulsion was removed from the bottom of the slides, Permout® and coverslips were added, and the slides were dried 24 hours before examining under a light microscope.<sup>23,24</sup>

## RESULTS

QA of <sup>125</sup>I-Lym-1 indicated that greater than 95% of <sup>125</sup>I was associated with Lym-1, by HPLC and CAE. In the live cell immunoreactivity assay, 70% of <sup>125</sup>I-Lym-1 was bound to Raji cells, similar to the binding fraction of unmodified Lym-1 under the same conditions, thus <sup>125</sup>I-Lym-1 demonstrated 100% relative immunoreactivity. QA of <sup>131</sup>I-Lym-1, performed multiple times during the 6.5 hour interval over which mice were injected, indicated decreasing structural and functional integrity of <sup>131</sup>I-Lym-1 over the interval (Table 1). During the first hour after radiolabeling, 92% of <sup>131</sup>I-Lym-1 was in monomeric form, by CAE; in the solid phase immunoreactivity assay, 24.5% of <sup>131</sup>I-Lym-1 was bound to Raji extracts, as compared to 35.1% of <sup>125</sup>I-Lym-1, which had previously been showed to behave like unmodified Lym-1; thus the relative immunoreactivity of <sup>131</sup>I-Lym-1 was 70% (24.5%/35.1%). During the interval 4-6.5 hours, 56% of <sup>131</sup>I-Lym-1 was in monomeric form, and its relative immunoreactivity was 50%. The timing of mouse injections is provided in Table 1. The mean time at which mice evaluated for pharmacokinetics, efficacy, and TLD were injected with <sup>131</sup>I-Lym-1 were 2.1, 2.6, and 2.9 hours, respectively; QA indicated 73% monomeric <sup>131</sup>I-Lym-1 and 66% relative immunoreactivity during the corresponding interval of time.

The total body clearance of <sup>131</sup>I-Lym-1 was similar among all dose groups, and similar to that of <sup>125</sup>I-Lym-1. The blood clearance of <sup>131</sup>I-Lym-1 was similar among all dose groups, and faster than that of <sup>125</sup>I-Lym-1 (Figure 2). Pharmacokinetic data are provided in Table 2.

Microautoradiography of <sup>125</sup>I-Lym-1 after 2 hours in Raji cell culture indicated the deposition of <sup>125</sup>I on the cell surface, consistent with the presence of antigen available for Lym-1 binding on the cell surface (Figure 3).

The biodistribution data for <sup>125</sup>I-Lym-1 indicated highly preferential uptake and prolonged

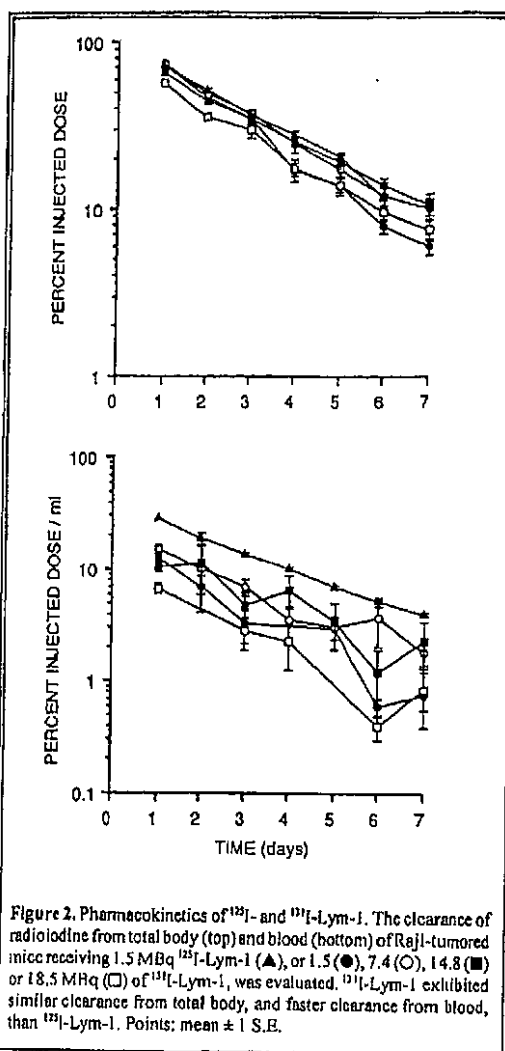


Figure 2. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-Lym-1. The clearance of radiolabeled from total body (top) and blood (bottom) of Raji-tumored mice receiving 1.5 MBq <sup>125</sup>I-Lym-1 (▲), or 1.5 (●), 7.4 (○), 14.8 (■) or 18.5 MBq (□) of <sup>131</sup>I-Lym-1, was evaluated. <sup>131</sup>I-Lym-1 exhibited similar clearance from total body, and faster clearance from blood, than <sup>125</sup>I-Lym-1. Points: mean ± 1 S.E.

retention in tumor, as compared to liver, lungs, kidneys, and spleen (Figure 4). Unlike <sup>125</sup>I-Lym-1, <sup>131</sup>I-Lym-1 exhibited little preferential uptake in tumor, as compared to liver, lungs, and kidneys. Relatively high concentrations of <sup>131</sup>I-Lym-1 in spleen were observed. All <sup>131</sup>I-Lym-1 dose groups exhibited similar patterns of biodistribution, except that prolonged retention in spleen was observed in the 7.4 MBq dose group.

When <sup>125</sup>I-Lym-1 pharmacokinetic data were used to estimate <sup>131</sup>I-Lym-1 dosimetry, the radiation dose to tumor was 3.45 Gy/MBq (12.8 rad/μCi), as compared to radiation doses of 0.67-1.03 Gy/MBq (2.5-3.8 rad/μCi) to liver, lungs, kidneys,

147

TABLE 2. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-Lym-1 in Raji-tumored mice.

|                                 | Total body clearance halftime<br>(hours) | Blood clearance<br>β-phase intercept<br>(%ID/ml) | Blood clearance<br>β-phase halftime<br>(hours) |
|---------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1.5 MBq <sup>125</sup> I-Lym-1  | 42                                       | 37                                               | 51                                             |
| 1.5 MBq <sup>131</sup> I-Lym-1  | 36                                       | 12                                               | 33                                             |
| 7.4 MBq <sup>131</sup> I-Lym-1  | 42                                       | 21                                               | 32                                             |
| 14.8 MBq <sup>131</sup> I-Lym-1 | 49                                       | 15                                               | 34                                             |
| 18.5 MBq <sup>131</sup> I-Lym-1 | 44                                       | 10                                               | 34                                             |

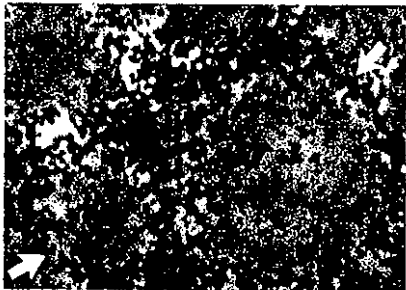


Figure 3. Autoradiograph of Raji cell culture 24 hours after incubation with <sup>125</sup>I-Lym-1, showing preferential localization around the periphery of cells, suggested membrane antigen and lack of internalization (750x, left; additional photographic magnification, right).

and spleen (Figure 5). Radiation dosimetry estimated from <sup>131</sup>I-Lym-1 pharmacokinetic and biodistribution data indicated that tumor, liver, and lungs all received similar radiation doses, 0.49-0.77 Gy/MBq (1.8-2.8 rad/μCi), and the spleen received comparatively high radiation doses, 1.55-4.49

Gy/MBq (5.7-16.6 rad/μCi). Similar radiation dosimetry, on a Gy/MBq basis, was observed among all <sup>131</sup>I-Lym-1 dose groups. The therapeutic index (TI) is the radiation dose to tumor divided by the radiation dose to specified normal tissues. If <sup>131</sup>I-Lym-1 exhibited pharmacokinetics identical to <sup>125</sup>I-Lym-1, its TI for tumor:total body would have been 10.3; tumor:marrow, 6.2 (13.5 when corrected for absorbed fraction in marrow); tumor:liver, 4.1; tumor:kidneys, 5.2; and tumor:spleen, 4.0 (Figure 5). However, radiation dosimetry based on <sup>131</sup>I-Lym-1 pharmacokinetic data were less favorable, providing TIs of 2 or less. TLD indicated that tumors and all other sites examined received similar radiation doses from <sup>131</sup>I-Lym-1 (Table 3).

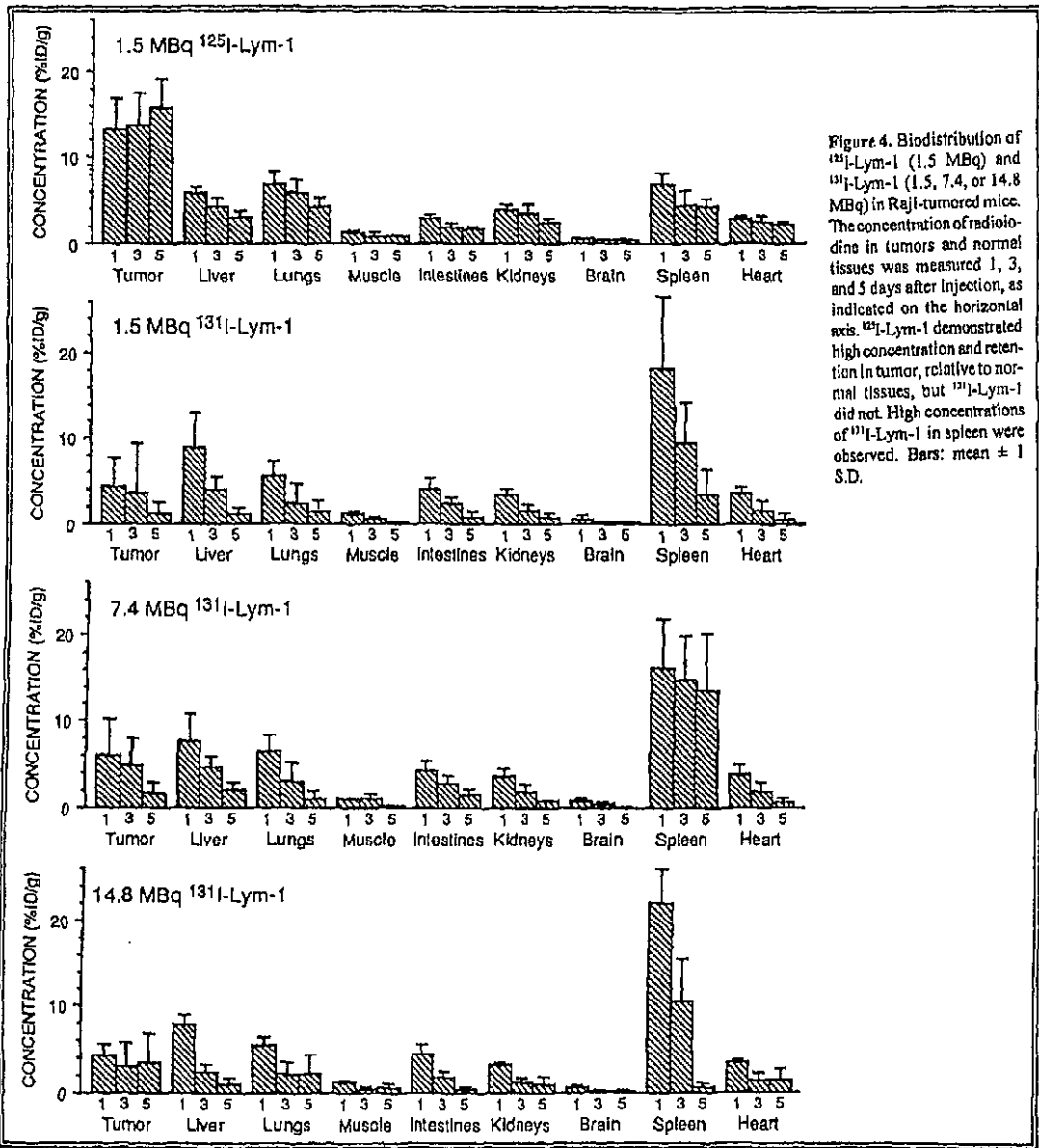
The percentages of mice that died within 30 days after receiving 7.4, 14.8, and 18.5 MBq of <sup>131</sup>I-Lym-1 were 33%, 50%, and 72%, respectively, indicating that toxicity was related to the activity of <sup>131</sup>I injected (Figure 6). Twenty-three percent of control mice that received no <sup>131</sup>I-Lym-1 died within 30 days, for reasons that were not apparent; their relatively low tumor burdens of 0-1191 mm<sup>3</sup> were inconsistent with lymphoma-related mortality. An

TABLE 3.

Mean radiation doses ± 1 S.D. (Gy/MBq injected) from <sup>131</sup>I-Lym-1 in Raji-tumored mice, as determined by thermoluminescent dosimetry.

| Location               | Radiation Dose |
|------------------------|----------------|
| Right tumor            | 0.14 ± 0.11    |
| 1 cm above right tumor | 0.14 ± 0.08    |
| Left tumor             | 0.13 ± 0.07    |
| 1 cm above left tumor  | 0.15 ± 0.09    |
| Right shoulder         | 0.18 ± 0.10    |
| Left shoulder          | 0.17 ± 0.07    |
| Peritoneum             | 0.13 ± 0.05    |
| Liver                  | 0.12 ± 0.09    |

143



LD<sub>50/30</sub> of 12.7 MBq (343  $\mu\text{C}$ ; 95% confidence interval 9.1-18.2 MBq) was estimated by logistic regression.

All  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 dose groups exhibited modest body weight loss of 9.4% or less, similar to the control group. Higher activity of  $^{131}\text{I}$  injected was associated with more prolonged weight loss: mice receiving 0, 7.4, 14.8 or 18.5 MBq recovered their initial body weight 2.5, 1.5, 3.5, and 4.0 weeks after

injection, respectively. Higher activity of  $^{131}\text{I}$  injected was also associated with larger and more sustained drops in platelet and RBC counts (Figure 7). The median time of death among mice receiving  $^{131}\text{I}$ -Lym-1, 19 days, coincided with the blood count nadirs, thus, the timing of death and the blood count data were consistent with radiation-induced myelotoxicity.

The response of tumors to treatment with  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 is summarized in Table 4. The cure rate in

149

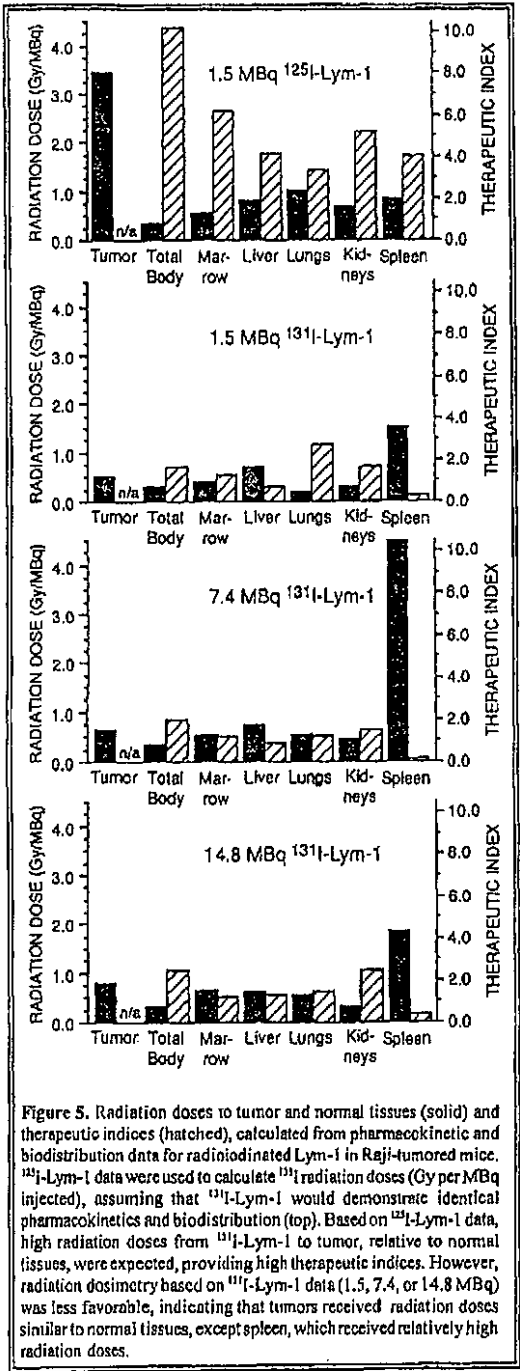


Figure 5. Radiation doses to tumor and normal tissues (solid) and therapeutic indices (hatched), calculated from pharmacokinetic and biodistribution data for radiolabeled Lym-1 in Raji-tumored mice.  $^{125}\text{I}$ -Lym-1 data were used to calculate  $^{131}\text{I}$  radiation doses (Gy per MBq injected), assuming that  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 would demonstrate identical pharmacokinetics and biodistribution (top). Based on  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 data, high radiation doses from  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 to tumor, relative to normal tissues, were expected, providing high therapeutic indices. However, radiation dosimetry based on  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 data (1.5, 7.4, or 14.8 MBq) was less favorable, indicating that tumors received radiation doses similar to normal tissues, except spleen, which received relatively high radiation doses.

all dose groups did not exceed the spontaneous cure rate of 8% observed in the control group that received no  $^{131}\text{I}$ -Lym-1; however, CRs and PRs

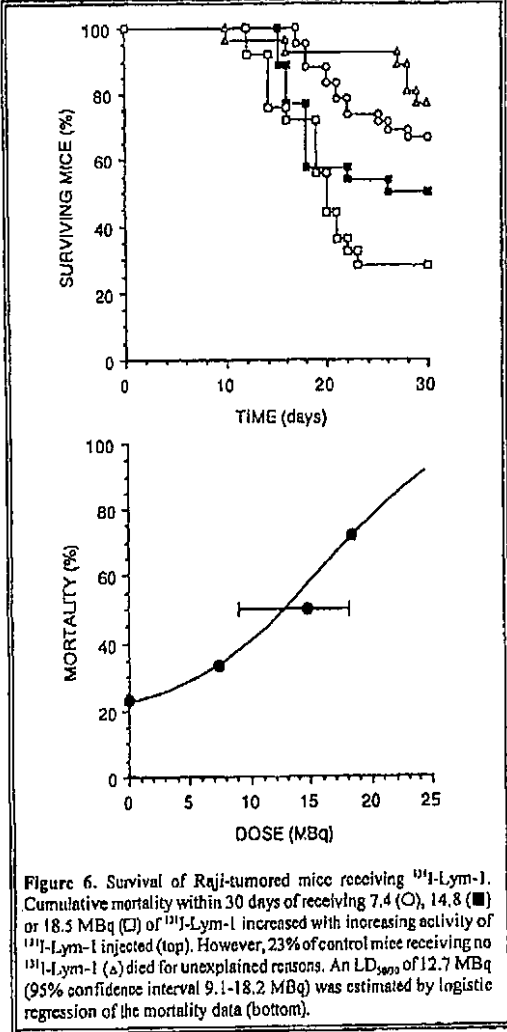


Figure 6. Survival of Raji-tumored mice receiving  $^{131}\text{I}$ -Lym-1. Cumulative mortality within 30 days of receiving 7.4 (○), 14.8 (■) or 18.5 MBq (□) of  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 increased with increasing activity of  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 injected (top). However, 23% of control mice receiving no  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 (△) died for unexplained reasons. An  $\text{LD}_{50}$  of 12.7 MBq (95% confidence interval 9.1-18.2 MBq) was estimated by logistic regression of the mortality data (bottom).

increased with increasing activity of  $^{131}\text{I}$  injected (Figure 8), contributing to overall response rates of 21 and 45% in the 14.8 and 18.5 MBq dose groups, respectively. The median time to tumor doubling for mice receiving 0, 7.4, 14.8, and 18.5 MBq of  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 was 10, 6, 13, and greater than 13 days, respectively.

DISCUSSION

QA of MAb-based pharmaceuticals involves a series of well-documented analytical procedures that reliably predict their *in vivo* characteristics. Preclinical studies may be used to define and

145

TABLE 4. Response of human Burkitt's lymphoma (Raji) tumor xenografts in mice to <sup>131</sup>I-Lym-1 therapy.

| Activity of <sup>131</sup> I-Lym-1 Injected (MBq) | No. of tumors / no. of mice | Initial tumor volume* (mm <sup>3</sup> ) | No. of Cs† | No. of CRs† | No. of PRs† | Response rate‡ (%) |
|---------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|------------|-------------|-------------|--------------------|
| 0 (control)                                       | 13/9                        | 110 ± 114                                | 1          | 0           | 0           | 8%                 |
| 7.4                                               | 43/30                       | 106 ± 101                                | 2          | 0           | 1           | 7%                 |
| 14.8                                              | 34/24                       | 115 ± 91                                 | 1          | 3           | 3           | 21%                |
| 18.5                                              | 31/23                       | 200 ± 133                                | 2          | 2           | 10          | 45%                |

\* Values are means ± 1 S.D.  
† C = cure; CR = complete regression; PR = partial regression  
‡ Response = Cs + CRs + PRs

substantiate conservative QA standards, which should then be continuously evaluated against patient data. <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-Lym-1 were evaluated in Raji tumored mice as described herein, followed by clinical trials of <sup>131</sup>I-Lym-1;<sup>25,26</sup> similarly, <sup>67</sup>Cu- and <sup>90</sup>Y-labeled Lym-1 have been evaluated *in vitro*, in mice, and in patients.<sup>9-11,27-29</sup> These studies provided abundant data to evaluate the association

between results from preclinical *in vitro* and *in vivo* studies, and clinical trials.

Microautoradiography of <sup>125</sup>I-Lym-1 in Raji cell culture indicated that Lym-1 was at the cell surface, and provided no evidence of internalization, nor, by inference, release of radioiodine secondary to catabolism of radioiodinated Lym-1, or by other mechanisms commonly referred to as "dehalogenation."<sup>30,31</sup> The results were consistent with previous studies indicating that Lym-1 is not internalized.<sup>4,32</sup> Mattes *et al.*<sup>32</sup> demonstrated that under specific conditions, intact <sup>125</sup>I-Lym-1 was released from Raji cells *in vitro* over time, as were all other MA-B-cell-lymphoma systems evaluated; but little release of <sup>125</sup>I-Lym-1 degradation products was observed.

HPLC, CAE, and RIA analysis of <sup>125</sup>I-Lym-1 used for the pharmacokinetic study indicated complete retention of the structural and functional characteristics of Lym-1. Consistent with the QA and microautoradiography results, <sup>125</sup>I-Lym-1 exhibited excellent specificity for and retention in Raji tumors, and no accumulation in normal tissues (Figure 4), as observed previously.<sup>5</sup> <sup>125</sup>I-Lym-1 pharmacokinetic and biodistribution data were used to predict <sup>131</sup>I-Lym-1 radiation dosimetry in Raji-tumored mice. Based on <sup>125</sup>I-Lym-1 data, <sup>131</sup>I-Lym-1 was expected to provide a TI for tumor:total body of 10.3; tumor:marrow, 6.2 (13.5 when corrected for absorbed fraction in marrow); tumor:liver, 4.1; tumor:kidneys, 5.2; and tumor:spleen, 4.0 (Figure 5).

The QA data for <sup>131</sup>I-Lym-1 were less favorable than those for <sup>125</sup>I-Lym-1, and indicated that radiolysis occurred during the interval between radiolabeling and injection (Table 1). The mean values

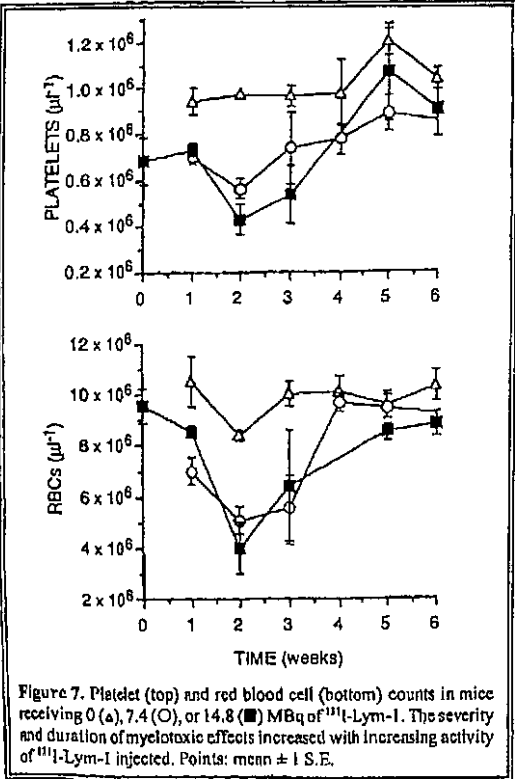


Figure 7. Platelet (top) and red blood cell (bottom) counts in mice receiving 0 (Δ), 7.4 (○), or 14.8 (■) MBq of <sup>131</sup>I-Lym-1. The severity and duration of myelotoxic effects increased with increasing activity of <sup>131</sup>I-Lym-1 injected. Points: mean ± 1 S.E.

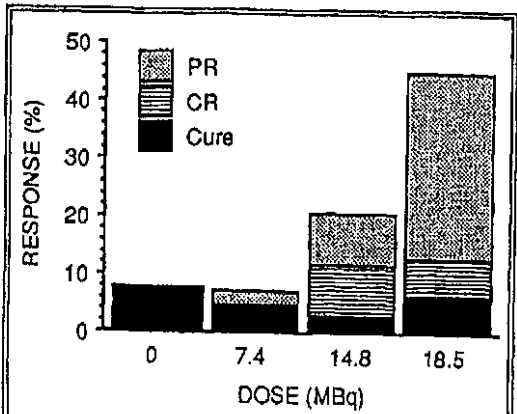


Figure 8. Therapeutic efficacy of <sup>131</sup>I-Lym-1 in mice bearing Raji tumors. The cure rate was similar for all <sup>131</sup>I-Lym-1 dose groups, and similar to the spontaneous cure rate in mice that received no therapy; thus, <sup>131</sup>I-Lym-1 therapy did not appear to be curative. However, the total response rate (PR plus CR plus cure) increased with increasing activity of <sup>131</sup>I-Lym-1 injected.

at the time of injection of <sup>131</sup>I-Lym-1 were 73% monomeric antibody and 66% relative immunoreactivity. <sup>131</sup>I-Lym-1 demonstrated little specificity for Raji tumors in mice, and high concentrations in spleen. When pharmacokinetic and dosimetry data for <sup>131</sup>I-Lym-1 (1.5 MBq) were used to estimate

<sup>131</sup>I radiation dosimetry, the TI for tumor:total body was 1.7; tumor:marrow, 1.2 (2.6 when corrected for absorbed fraction in marrow); tumor:liver, 0.7; tumor:kidneys, 1.7; and tumor:spleen, 0.3; similar values were obtained for mice receiving 7.4 and 14.8 MBq of <sup>131</sup>I-Lym-1. <sup>131</sup>I-Lym-1 radiation doses (Gy/MBq injected) measured directly by TLD were lower than those estimated from pharmacokinetic and biodistribution data, and were not corrected at the time of experimentation for *in vivo* fading as was done for later work.<sup>33,34</sup> However, the TLD data were consistent with the calculated radiation dose estimates, in the respect that little specificity for tumor was indicated.

In mice receiving <sup>131</sup>I-Lym-1 therapy, the rate of mortality exceeded the rate of therapeutic response in every dose group. In comparison, in clinical trials in non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients refractory to conventional therapy, <sup>131</sup>I-Lym-1 demonstrated excellent tumor targeting by imaging, and provided 52% responses, including 33% complete responses, which had a mean duration of 14 months.<sup>25</sup> The mouse study may have failed to predict the favorable results of the clinical trial due to inferior quality of <sup>131</sup>I-Lym-1 radiopharmaceutical. <sup>131</sup>I-Lym-1 for clinical trials was radiolabeled by optimized methods and

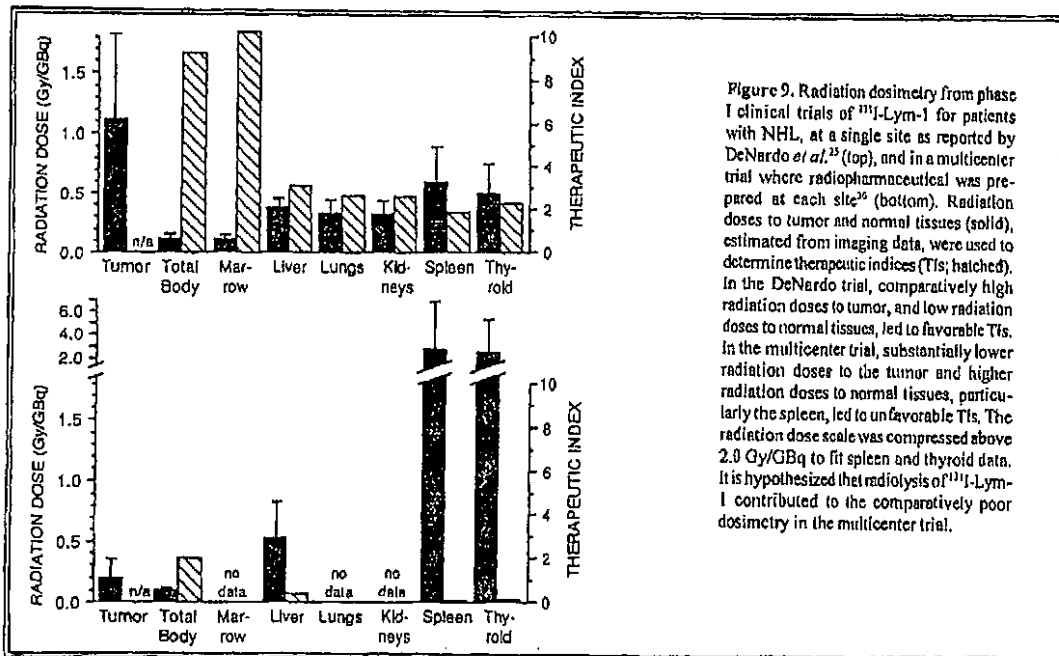


Figure 9. Radiation dosimetry from phase I clinical trials of <sup>131</sup>I-Lym-1 for patients with NHL, at a single site as reported by DeNardo *et al.*<sup>25</sup> (top), and in a multicenter trial where radiopharmaceutical was prepared at each site<sup>26</sup> (bottom). Radiation doses to tumor and normal tissues (solid), estimated from imaging data, were used to determine therapeutic indices (TIs; hatched). In the DeNardo trial, comparatively high radiation doses to tumor, and low radiation doses to normal tissues, led to favorable TIs. In the multicenter trial, substantially lower radiation doses to the tumor and higher radiation doses to normal tissues, particularly the spleen, led to unfavorable TIs. The radiation dose scale was compressed above 2.0 Gy/GBq to fit spleen and thyroid data. It is hypothesized that radiolysis of <sup>131</sup>I-Lym-1 contributed to the comparatively poor dosimetry in the multicenter trial.

147

formulated at approximately 37 MBq (1 mCi) per ml in 4% (w/v) human serum albumin (HSA) in saline, to prevent radiolysis.<sup>28</sup> Because of the radioprotectant qualities of HSA, QA of <sup>131</sup>I-Lym-1 for clinical trials indicated 93% or more monomeric fraction and 93% or more relative immunoreactivity. In comparison, <sup>131</sup>I-Lym-1 for the mouse study described herein was not protected from radiolysis. Volume constraints for the mouse study necessitated the formulation of <sup>131</sup>I-Lym-1 at higher radioactivity concentrations, and foreign proteins, e.g. HSA, were not added to the doses. The radioprotective properties of chemical stabilizing agents, such as ascorbate, were not well documented at the time of the experiment.<sup>35</sup>

In a multicenter clinical trial of <sup>131</sup>I-Lym-1 for NHL, in which radiopharmaceutical was prepared at each site, Kuzel *et al.*<sup>36</sup> reported partial responses, with a mean duration of 3.6 months, in 31% (4/13) of the patients. The mean radiation dose to tumor, which was evaluable in only 15% (2/15) of the patients due to poor tumor imaging, was 0.20 ± 0.16 Gy/GBq. In comparison, DeNardo *et al.*<sup>25</sup> reported a mean radiation dose to tumor of 1.1 ± 0.7 Gy/GBq and lower radiation doses to normal tissues, resulting in higher TIs (Figure 9). The substantial differences between the studies in the percentage, quality, and duration of responses, quality of tumor imaging, and radiation doses to tumor and normal tissues, imply differences in radiopharmaceutical quality. Thus, the importance of our observations in mice that the quality of the radiopharmaceutical at the time it is given to the recipient, and the potential impact of radiolysis that can occur after QA evaluation and before injection, is supported.

As indicated by RIA data of <sup>131</sup>I-Lym-1 given to mice, antigen binding was affected by radiolysis. Presumably, sites other than the binding site were also damaged, possibly accounting for the enhanced blood clearance of <sup>131</sup>I-Lym-1 (Figure 2), which in turn may have contributed to the failure of <sup>131</sup>I-Lym-1 to accumulate in tumor. Thus, radiation damage to the protein may have reduced both the ability and the availability of <sup>131</sup>I-Lym-1 to bind to tumor. These results illustrate that the loss of structural integrity of the antibody secondary to radiolysis, as indicated by pharmacokinetic data (e.g., total body, blood, or urine clearance), may affect the uptake of antibody in tumor. For example, in a clinical trial of <sup>177</sup>Lu-CC49 for ovarian cancer, the

urinary excretion of radioactivity accounted for 26% of the activity injected at 72 hours in patients receiving a 7 day old preparation of <sup>177</sup>Lu-CC49, as compared to 6.7% in patients receiving the same reagent prepared and given to the patient the same day.<sup>37</sup>

Evaluations of <sup>67</sup>Cu-radiolabeled Lym-1 in Raji-tumored mice, similar to the study of <sup>131</sup>I-Lym-1 herein, demonstrated the value of animal studies for preclinical development of radiolabeled Lym-1.<sup>9</sup> The chelating (metal binding) agent 6-[*p*-(bromacetamido)benzyl]-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-*N,N',N'',N'''*-tetraacetic acid (BAT) was conjugated to Lym-1 via 2-iminothiolane (2IT) to prepare 2IT-BAT-Lym-1. To determine the effect of the ratio of BAT molecules per Lym-1 molecule (chelating agents per antibody; c/a) on *in vitro* immunoreactivity and *in vivo* tumor binding, 2IT-BAT-Lym-1 with c/a of 1-23 was radiolabeled with <sup>67</sup>Cu, and evaluated for RIA and pharmacokinetics in Raji-tumored mice. 2IT-BAT-Lym-1 with c/a 1-5 behaved similarly to unmodified Lym-1, but above 5, increasing c/a was associated with decreasing immunoreactivity, decreasing uptake and retention in tumor, and increasing uptake in liver. Subsequently, <sup>67</sup>Cu-2IT-BAT-Lym-1 with c/a 5 or less, 95% or more monomeric fraction, and 90% or more relative immunoreactivity, demonstrated therapeutic efficacy at well tolerated doses in the Raji tumored mouse model.<sup>10,11</sup> In clinical trials, <sup>67</sup>Cu-2IT-BAT-Lym-1 with similar QA demonstrated excellent tumor uptake and retention, and therapeutic responses in 58% of NHL patients refractory to conventional therapy.<sup>27</sup>

In the <sup>67</sup>Cu- and <sup>131</sup>I-Lym-1 studies, pharmacokinetics in mice were sensitive indicators of the functional integrity of Lym-1, and particularly useful for preclinical development of Lym-1 radiopharmaceuticals. *In vivo* testing has also been used to validate *in vitro* QA results that demonstrated the stability of Lym-1 and Lym-1 conjugates during storage at -70 °C for 6 years or longer.<sup>38</sup>

In summary, <sup>125</sup>I-Lym-1 exhibited high and sustained concentration in Raji tumors in mice, indicating excellent therapeutic potential for <sup>131</sup>I-Lym-1 in the same model. *In vitro* QA results for <sup>131</sup>I-Lym-1 indicated that substantial radiolysis had occurred during the interval between radiolabeling and injection, and <sup>131</sup>I-Lym-1 exhibited little accumulation in tumor, or preferential delivery of

radiation dose to tumor. Taken with other preclinical and clinical assessments of radiolabeled Lym-1, the results demonstrated an association between *in vitro* QA results at the time of injection (rather than immediately after labeling), *in vivo* characteristics, therapeutic efficacy in the Raji-tumored mouse model, and therapeutic response in patients with NHL.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by National Cancer Institute grant PO1 CA47829, Department of Energy grant DE-FG03-84ER60233, and American Cancer Society grant PDT-94H. We gratefully acknowledge David R. Fregeau, Ph.D., for experimental contributions, and Kathleen R. Lamborn, Ph.D., University of California, San Francisco, for statistical analysis. The estimated dosimetry calculations were performed under the direction of G.L.D. with the valued assistance of Sui Shen, Ph.D., and the TLD evaluations were performed under the direction of B.W.W. with the valued assistance of M. Howard Griffith.

## REFERENCES

- DeNardo SJ, DeNardo GL, Deshpande SV, Adams GP, Macey DJ, Mills SL, *et al*. The design of a radiolabeled monoclonal antibody for radioimmunodiagnosis and radioimmunotherapy. In: Radiolabeled Monoclonal Antibodies for Imaging and Therapy, Srivastava SC (ed). New York: Plenum Publishing Corp, 1988, p 111.
- DeNardo SJ, DeNardo GL, Peng JS. Pharmaceutical quality control of radiolabeled monoclonal antibodies and their fragments. *Am J Physiol Imag* 1989; 4: 39.
- Rose LM, Gunasekera AH, DeNardo SJ, DeNardo GL, Meares CF. Lymphoma-selective antibody Lym-1 recognizes a discontinuous epitope on the light chain of HLA-DR10. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 43: 26.
- Epstein AL, Marder RJ, Winter JN, Stathopoulos E, Chen FM, Parker JW, Taylor CR. Two new monoclonal antibodies, Lym-1 and Lym-2, reactive with human-B-lymphocytes and derived tumors, with immunodiagnostic and immunotherapeutic potential. *Cancer Res* 1987; 47: 830.
- DeNardo GL, DeNardo SJ, Lamborn KR, VanHoosear KA, Kroger LA. Enhancement of tumor uptake of monoclonal antibody in nude mice with PEG IL-2. *Antibody Immunoconj Radiophar* 1991; 4: 859.
- Griffith MH, Yorke ED, Wessels BW, DeNardo GL, Neacy WP. Direct dose confirmation of quantitative autoradiography with micro-TLD measurements for radioimmunotherapy. *J Nucl Med* 1988; 29: 1795.
- DeNardo SJ, Peng J-S, DeNardo GL, Mills SL. Immunochemical aspects of monoclonal antibodies important for radiopharmaceutical development. *Nucl Med Biol* 1986; 13: 303.
- DeNardo GL, Mills SL, Kukis DL, Anderson V, DeNardo SJ. Review of a four-year experience iodinating monoclonal antibodies with therapeutic amounts of I-131. *Antibody Immunoconj Radiophar* 1995; 8: 1.
- Kukis DL, DeNardo GL, DeNardo SJ, Mirick GR, Miers LA, Greiner DP, Meares CF. Effect of the extent of chelate substitution on the immunoreactivity and biodistribution of 211Tl-BAT-Lym-1 immunoconjugates. *Cancer Res* 1995; 55: 878.
- DeNardo GL, Kukis DL, Shen S, Mausner LF, Meares CF, Srivastava SC, Miers LA, DeNardo SJ. Efficacy and toxicity of <sup>67</sup>Cu-211Tl-BAT-Lym-1 radioimmunoconjugate in mice implanted with Burkitt's lymphoma (Raji). *Clin Cancer Res* 1997; 3: 71.
- DeNardo GL, Kukis DL, DeNardo SJ, Shen S, Mausner LF, O'Donnell RT, Lamborn KR, Meyers FJ, Srivastava SC, Miers LA. Enhancement of <sup>67</sup>Cu-211Tl-BAT-Lym-1 therapy in mice with human Burkitt's lymphoma (Raji) using interleukin-2. *Cancer* 1997; 80 (Suppl): 2576.
- Adams GP, DeNardo SJ, Deshpande SV, DeNardo GL, Meares CF, McCall MJ, Epstein AL. Effect of mass of <sup>111</sup>In-benzyl-EDTA monoclonal antibody on hepatic uptake and processing in mice. *Cancer Res* 1989; 49: 1707.
- Snyder WS, Ford MR, Warner GG. Estimates of specific absorbed fractions for photon sources uniformly distributed in various organs of a heterogeneous phantom. In: MIRD Pamphlet No. 5. New York: Society of Nuclear Medicine, 1978.
- Dillman LT, Von der Lage FC. Radionuclide decay schemes and nuclear parameters for use in radiation-dose estimation. In: MIRD Pamphlet No. 10. New York: Society of Nuclear Medicine, 1975, p 5.
- Siegel JA, Wessels BW, Watson EE, Stabin MG, Vriesendorp HM, Bradley EW, Badger CC, Brill AB, Kwok CS, Stickney DR, *et al*. Bone marrow dosimetry and toxicity for radioimmunotherapy. *Antibody Immunoconj Radiophar* 1990; 3: 213.
- Hui TE, Fisher DR, Kuhn JA, Williams LE, Nourigat C, Badger CC, Beatty BQ, Beatty JD. A mouse model for calculating cross-organ beta dose from yttrium-90-labeled immunoconjugates. *Cancer* 1994; 73 (Suppl): 951s.
- Siegel JA, Stabin MG. Absorbed fractions for electrons and beta particles in spheres of various sizes. *J Nucl Med* 1994; 35: 152.
- Wessels BW, Griffith MH. Miniature thermoluminescent dosimeter absorbed dose measurements in tumor phantom models. *J Nucl Med* 27: 1308-1314, 1986.
- Buchsbaum DJ, Wahl RL, Normolle DP, Kaminski MS. Therapy with unlabeled and <sup>131</sup>I-labeled pan B-cell monoclonal antibodies in nude mice bearing Raji

149

- Burkitt lymphoma xenografts. *Cancer Res* 1992; 52: 6476.
20. DeNardo GL, Kroger LA, DeNardo SJ, Miers LA, Salako Q, Kukis DL, Fand I, Shen S, Renn O, Meares CF. Comparative toxicity studies of yttrium-90 MX-DTPA and 2-IT-BAD conjugated monoclonal antibody (BrE-3). *Cancer* 1994; 73 (Suppl): 1012s.
21. DeNardo SJ, Kukis DL, Miers L, Winthrop MD, Kroger LA, Salako QA, Shen S, Lamborn KR, Gumerlock PH, Meares CF, *et al*. Yttrium-90-DOTA-peptide ChL6 radioimmunoconjugate: Efficacy and toxicity in mice bearing p53 mutant human breast cancer xenografts. *J Nucl Med* 1998; 39: 842.
22. Govindarajulu Z. Statistical Methods in Bioassay. New York: Karger, 1988.
23. Rogers AW. Techniques of Autoradiography. Amsterdam: Elsevier Scientific Publication Co, 1973.
24. Mishell BB, Shiigi SM. Selected Methods in Cellular Immunology. San Francisco: W.H. Freeman and Co, 1980.
25. DeNardo GL, DeNardo SJ, Goldstein DS, Kroger LA, Lamborn KR, Levy NB, McGahan JP, Salako QA, Shen S, Lewis JP. Maximum tolerated dose, toxicity, and efficacy of <sup>131</sup>I-Lym-1 antibody for fractionated radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3246.
26. DeNardo GL, DeNardo SJ, Shen S, DeNardo DA, Mirick GR, Macey DJ, Lamborn KR. Factors affecting <sup>131</sup>I-Lym-1 pharmacokinetics and radiation dosimetry in patients with non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *J Nucl Med* 1999; 40: 1317.
27. O'Donnell RT, DeNardo GL, Kukis DL, Lamborn KR, Shen S, Yuan A, Goldstein DS, Carr CE, Mirick GR, DeNardo SJ. A clinical trial of radioimmunotherapy with <sup>67</sup>Cu-2IT-BAT-Lym-1 for non-Hodgkin's lymphoma. *J Nucl Med* 1999; 40: 2014.
28. O'Donnell RT, DeNardo GL, DeNardo SJ, Kukis DL, Lamborn KR, Miers LA, Meyers FJ. Efficacy and toxicity of radioimmunotherapy with <sup>90</sup>Y-DOTA-peptide-ChL6 for PC3-tumored mice. *The Prostate* 2000; in press.
29. DeNardo GL, O'Donnell RT, Shen S, Kroger LA, Yuan A, Meares CF, Kukis DL, DeNardo SJ. Radiation dosimetry for <sup>90</sup>Y-2IT-BAD-Lym-1 extrapolated from pharmacokinetics using <sup>111</sup>In-2IT-BAD-Lym-1 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Nucl Med* 2000; in press.
30. DeNardo GL, DeNardo SJ, Miyao NP, Mills SL, Peng JS, O'Grady LF, Epstein AL, Young WC. Non-dehalogenation mechanisms for excretion of radiiodine after administration of labeled antibodies. *Int J Biol Markers* 1988; 3: 1.
31. Mattes MJ, Griffiths GL, Diril H, Goldenberg DM, Ong GL, Shih LB. Processing of antibody-radioisotope conjugates after binding to the surface of tumor cells. *Cancer* 1994; 73 (Suppl): 787s.
32. Hanna R, Ong GL, Mattes MJ. Processing of antibodies bound to B-cell lymphomas and other hematological malignancies. *Cancer Res* 1996; 56: 3062.
33. Wessels BW, Vessella RL, Palme DF, Berkopec JM, Smith GK, Bradley EW. Radiobiological comparison of external beam irradiation and radioimmunotherapy in renal cell carcinoma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17: 1257.
34. Yorke ED, William LB, Demidecki AJ, Heidorn DB, Roberson PL, Wessels BW. Multicellular dosimetry for beta-emitting radionuclides: autoradiography, thermoluminescent dosimetry and three-dimensional dose calculations. *Med Phys* 1993; 20: 543.
35. Chakrabarti MC, Le N, Paik CH, De Graff WG, Carrasquillo JA. Prevention of radiolysis of monoclonal antibody during labeling. *J Nucl Med* 1996; 37: 1384.
36. Kuzel T, Rosen ST, Zimmer AM, Silverstein EA, Spies S, Salctan SL, Norvitch ME, Birkhofer M, Shochat D, LoBuglio AF, *et al*. A phase I escalating-dose safety, dosimetry and efficacy study of radiolabeled monoclonal antibody Lym-1. *Cancer Biother* 1993; 8: 3.
37. Alvarez RD, Partridge EE, Khazaeli MB, Plott G, Austin M, Kilgore L, Russell CD, Liu T, Orizzle WE, Schlom J, LoBuglio AF, Meredith RF. Intraperitoneal radioimmunotherapy of ovarian cancer with <sup>177</sup>Lu-CC49: a phase I/II study. *Gynecologic Oncology* 1997; 65: 947.
38. Kukis DL, DeNardo SJ, Mills SL, Shen S, O'Donnell RT, DeNardo GL. Stability of monoclonal antibodies, Lym-1 and ChL6, and 2IT-BAD-Lym-1 immunoconjugate with ultra freezer storage. *Cancer Biother Radiopharm* 1999; 14: 363.

## Effects of Temperature on Radiochemical Purity and Immunoreactivity of Radiolabeled Monoclonal Antibody 1H10

Wen-sheng Huang, Shiou-chi Cherng, Tsu-Kang Jen, Mu-hsien Yu, and Ming-yang Yeh

Departments of Nuclear Medicine and Obstetrics and Gynecology, Tri-Service General Hospital, National Defense Medical Center and Cheng Hsin General Hospital, Taipei, Taiwan, ROC

**Objective:** This study was undertaken to investigate the effects of temperature on preserving the radiochemical purity and immunoreactivity of  $^{125}\text{I}$ - and  $^{131}\text{I}$ -labeled monoclonal antibody (MAb) 1H10—an antibody against human cervical carcinoma cell-surface antigen.

**Methods:** An antibody-irrelevant human melanoma cell line, H2269, served as the control group. Iodine-125 and  $^{131}\text{I}$  radiolabeling of MAb 1H10 and H2669 was performed by the chloramine-T method. All the prepared MAb were divided into aliquots and stored at 4,  $-20$ , and  $-70^\circ\text{C}$  for 2–14 d. The radiochemical purity and immunoreactivity of the labeled antibodies in set conditions were measured by thin-layer chromatography and a modified index, respectively, after a single freeze-and-thaw cycle.

**Results:** Reduced release of free radioiodide and better preservation of immunoreactivity were observed in the radiolabeled MAb stored at  $-70^\circ\text{C}$  than in those stored at  $-20^\circ\text{C}$  or  $4^\circ\text{C}$ . The extent of free iodide dissociation and immunologic binding degradation of  $^{125}\text{I}$ -labeled MAb 1H10 appeared milder than that of  $^{131}\text{I}$ -labeled MAb under the same conditions. However, both  $^{125}\text{I}$ - and  $^{131}\text{I}$ -labeled MAb stored at  $-70^\circ\text{C}$  or  $-20^\circ\text{C}$  retained more than 90% radiochemical purity for at least 3 d.

**Conclusion:** Freezing provides an appropriate alternative for reducing radiolysis and preserving immunoreactivity of radioiodinated MAb. MAb 1H10, labeled with either  $^{125}\text{I}$  or  $^{131}\text{I}$  and stored at temperatures of  $-20^\circ\text{C}$  or below for 3 d after labeling, appeared stable in both radiolabeling and binding studies in vitro and was still acceptable for in vivo use.

**Key Words:** effects of temperature; immunoreactivity; monoclonal antibodies; radiochemical purity

*J Nucl Med Technol* 2000; 28:182–185

Monoclonal antibodies (MAbs), raised against specific tumor-associated antigens, have become valuable carriers to deliver

agents such as radionuclides to tumor sites (1). The localization of radioactivity in tumor sites, either primary or metastatic, has provided a means for tumor diagnosis and perhaps treatment (2,3). While radiolabeled MoAbs are potential tools for tumor imaging and treatment, such as radioimmunodetection (RAID) and radioimmunotherapy (RAIT), several problems need to be resolved before they can become applicable on a large-scale clinical basis (4,5).

Iodine-125 is the most often used radionuclide to determine relative tissue distribution in animals, while  $^{131}\text{I}$  is one of the basic isotopes for imaging and treating patients. Both are used frequently for radiolabeling of antibodies. Factors such as radiation from isotopes attached to antibodies and the interaction of chemicals used for iodination, or constituents of stock solutions of labeled antibodies, may deteriorate antibody molecular structure and result in dissociation of the isotope or a decrease in immunoreactivity of the radioiodinated antibodies (6). Unstable radiolabeling and poor binding studies in vitro usually exclude those antibodies from in vivo use (7). This is especially true when the time from radiolabeling to application is prolonged. Many techniques are available to stabilize the labeling and immunoreactivity (8–10).

Despite recent advances in cancer management, cervical carcinoma is still a serious problem and is ranked first among malignancies affecting women in Taiwan (11). MAb 1H10, which recognizes 40% of human cervical carcinoma tissues, has been used for in vivo tumor localization (12). In this study, we investigated the efficacy of cryopreservation on stabilizing labeled MAb, by observing the changes in radiochemical purity and immunoreactivity of  $^{125}\text{I}$ - or  $^{131}\text{I}$ -labeled MAb 1H10 after periods of storage at different temperatures.

### MATERIALS AND METHODS

Iodine-131 (40 mCi/mL) and  $^{125}\text{I}$  (100 mCi/mL) were both purchased from a commercial source (Amersham Co., Buckinghamshire, UK). Human CaSki cell line was provided by RA Pattillo (Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI). MAb 1H10 was generated against CaSki human cervical carcinoma cell-surface antigen as previously described (13). The MAb 1H10 belongs to the immunoglobulin of the IgG<sub>3</sub> subclass. An

For correspondence or reprints contact: Dr. Wen-sheng Huang, Department of Nuclear Medicine, Tri-Service General Hospital, 8, Sec. 3, Ting-chou Rd., Taipei, Taiwan, ROC; Phone: 886-2-2367-2132, 2356-2942; E-mail: wshuang@ms22.url.com.tw.

IgG<sub>3</sub> antibody-irrelevant human melanoma cell line, H2669 (provided by I Hellstrom, University of Washington, Seattle, WA), served as the control. Both cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 5% heat-inactive fetal calf serum (FLOW Laboratories, Springfield, IL), with 100 U/mL penicillin and 100 µ/mL streptomycin. Iodine-131 and <sup>125</sup>I radiolabeling of MABs was performed using the chloramine-T method (14), to a level of about 5 mCi/mg MAB for <sup>131</sup>I and 2 mCi/mg MAB for <sup>125</sup>I. The iodinated protein was separated from reactants using Sephadex G25 columns (Pharmacia, Piscataway, NJ) in phosphate-buffered saline (PBS) at a pH of 7.4, at room temperature (15). The preparations were each divided into 0.2-mL aliquots (adjusted to approximately 1 mCi/mL) and stored at -70, -20, and 4°C for various time periods. The labeled MABs in aliquots were frozen and thawed for 1 cycle only.

Assays for radiochemical purity of <sup>125</sup>I or <sup>131</sup>I iodinated MAB on Days 1, 2, 3, 5, and 8 after labeling were performed using instant thin-layer chromatography (ITLC; Gelman ITLC-SG, Ann Arbor, MI) using chloroform-methanol 0.25% KCl (30:15:4, v/v) as a developing agent (16). The percentage of the total activity remaining with the protein was determined by cutting the strip, followed by counting the radioactivity using a gamma counter (LKB 1272 Clinigamma gamma counter; Wallac, Turku, Finland).

Immunoreactivities for radiolabeled <sup>131</sup>I or <sup>125</sup>I antibody stored at -70, -20, and 4°C on Days 1, 3, 5, 8, and 14 after labeling were measured by *in vitro* binding assay. Briefly, labeled 1H10 MAB (about 10<sup>6</sup> cpm/50 µL) was incubated with 10<sup>5</sup> solid-phase glutaraldehyde-fixed CaSki or H2669 cells for 45 min at 37°C. After washing 3 times with PBS, the bound radioactivity was quantified using the gamma counter and expressed as CPM. The bound radioactivity in wells containing CaSki cells was considered as tumor binding (T) while that in wells containing H2669 cells was considered nonspecific binding (C). Radioactivity in a blank well was designated as background (B). The index of immunoreactivity was expressed as:

$$(\text{CPM in T} - \text{CPM in BKG})/(\text{CPM in NSB} - \text{CPM in BKG}).$$

This equation was modified from a previous report (17), where T CPM = Tumor, B CPM = Background, and C CPM = Nonspecific binding.

### RESULTS

For <sup>125</sup>I-labeled MAB 1H10, the radiolabeling yields at different temperatures showed the least free iodide release when stored at -70°C (Fig. 1). The bound radioiodine remained more than 90% from Day 1 to Day 8. The percentage, however, dropped slightly more during a comparable period in the -20°C group. A greater decrease in the percentage of bound radioiodide was found in samples stored at 4°C. A similar trend in the dissociation curves also was found in the <sup>131</sup>I-labeled MAB 1H10, but the percentages of decrease were amplified compared to the corresponding <sup>125</sup>I groups (78% versus 64%) (Figs. 1 and 2). Overall, it appears that, for both <sup>125</sup>I- and

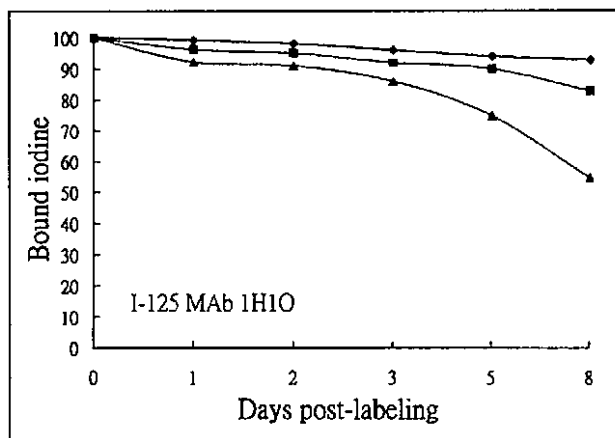


**FIGURE 1.** Radiochemical assay results. The percentage of bound <sup>125</sup>I, as measured by thin-layer chromatography, for <sup>125</sup>I-MAB 1H10 after storage at -70°C (◆), -20°C (■), or 4°C (▲) for various days (the x-axis) after radiolabeling. Each value plotted is the average of 3 measurements.

<sup>131</sup>I-labeled 1H10, storage at -20 or -70°C can preserve the radiochemical purity above 90% for 3 d.

Both <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-labeled MABs showed a progressive decrease of immunoreactivity after labeling. However, the changes of indices in various storage periods revealed that binding was more stable in the <sup>125</sup>I-labeled groups than those in the corresponding <sup>131</sup>I-labeled groups. Storage at -70°C or -20°C preserved more immunoreactivity than storage at 4°C in both <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-labeled groups. (Figs. 3 and 4).

### DISCUSSION

Our data further demonstrate the usefulness of freezing in preventing autoradiolysis and in preserving the immunoreactivity of radioiodinated MAB. The results are consistent with observations reported by Wahl et al. (18). MAB 1H10 labeled with <sup>125</sup>I had better radiochemical purity and immunoreactivity than with <sup>131</sup>I-labeled MAB 1H10 at various temperatures and storage periods. Hinkle et al. suggested that both radioiodinated

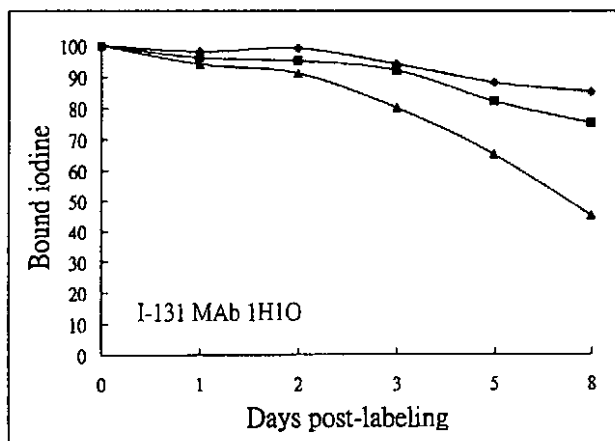


**FIGURE 2.** Radiochemical assay results for <sup>131</sup>I-labeled MAB 1H10 after storage at -70°C (◆), -20°C (■), or 4°C (▲) for various days (the x-axis) after radiolabeling. Each value plotted is the average of 3 measurements.

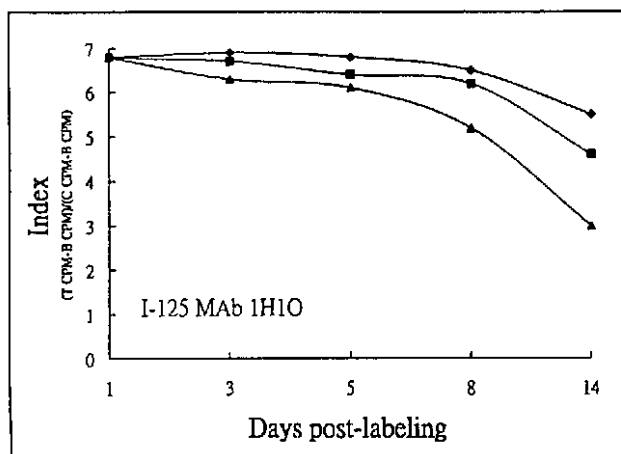


**FIGURE 3.** Immunoreactivity assay results for  $^{125}\text{I}$ -labeled MAb 1H10 after storage at  $-70^\circ\text{C}$  (♦),  $-20^\circ\text{C}$  (■), or  $4^\circ\text{C}$  (▲) for various days (the x-axis) after radiolabeling. Each value plotted is the average of 3 measurements. The index was calculated as:  $\text{T CPM} - \text{B CPM} / \text{C CPM} - \text{B CPM}$ , where T CPM = tumor counts per minute, B CPM = background counts per minute, and C CPM = control counts per minute.

antibodies can be used for biologic studies only when the radiochemical purity is more than 90% (19). Storage of the labeled MAb 1H10, either  $^{125}\text{I}$  or  $^{131}\text{I}$ , at a temperature of  $-20^\circ\text{C}$  or below can fulfill this requirement for at least 3 d.

Radioiodine is attached covalently to tyrosine residues of the antibody molecule. Although antibodies can be labeled easily with iodine isotopes by the chloramine-T procedure (14), problems remain for optimal recognition of antigens by the iodinated antibodies (1,20). Alteration of the biological activity is one of the major problems.

Changes in biological activity can be caused by either direct contact of the protein with iodine (1) or by exposure to oxidizing and reducing agents during iodination, both of which can damage the other functional groups of the protein, such as tryptophan, sulfhydryl, and hydroxy groups (1,8). Moreover,

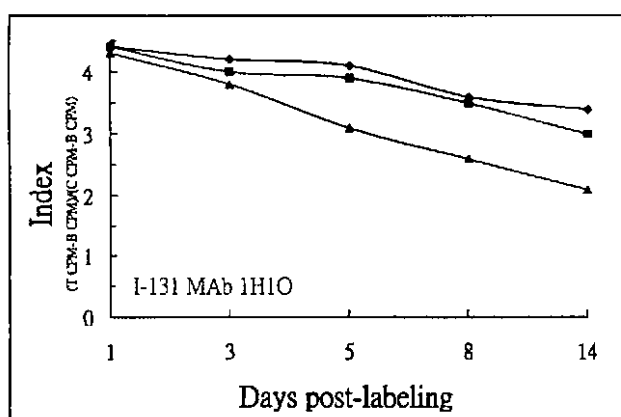


**FIGURE 4.** Immunoreactivity assay results for  $^{131}\text{I}$ -labeled MAb 1H10 after storage at  $-70^\circ\text{C}$  (♦),  $-20^\circ\text{C}$  (■), or  $4^\circ\text{C}$  (▲) for various days (the x-axis) after radiolabeling. Each value plotted is the average of 3 measurements. The index was calculated as:  $\text{T CPM} - \text{B CPM} / \text{C CPM} - \text{B CPM}$ , where T CPM = tumor counts per minute, B CPM = background counts per minute, and C CPM = control counts per minute.

radiation can cause the release of free radicals and disturb the molecular integrity of antibodies (18) due to the abundance of water in the radioiodinated MAb solution. Irradiation by ionizing radiation leads to radiolysis of water and results in the formation of free radicals such as  $\text{H}^\bullet$ ,  $\text{HO}^\bullet$ , and highly active ionic and molecular species such as  $\text{H}_2\text{O}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}^-$ , and  $\text{H}_2\text{O}_2$  are produced (6). These species can cause conformational changes in proteins and produce specific protein fragments or oxidative products (damaged products (21,22)).

Applying this to radiolabeled MABs, it is assumed that these biological consequences may result in a decrease of the immunoreactivity of the MABs. Larson et al. (23) reported that the higher the specific activity achieved in iodination, the greater the loss of immunoreactivity.

Freezing has been used widely to preserve biological samples and may keep labeled MABs from further dissociation and degradation. Wahl et al. (18), using high-performance liquid chromatography, demonstrated that the products of autoradiolysis also were decreased by freezing. This suggests that cryopreservation of radiolabeled MAB may be due to decreases in the notorious effects of peroxide substances on antibodies by immobilization of radioisotope decay-induced free radicals in the ice crystal lattice (18). While freezing antibodies is thought to diminish their immunoreactivity, this did not appear prominent in this study. Our data indicated that a single freeze-and-thaw cycle had little adverse effect on the immunoreactivity of the frozen MABs (18).

The specific activities of  $^{125}\text{I}$ - or  $^{131}\text{I}$ -labeled antibody are moderate (2–6 mCi/mg). The radioactivity in the final stock solution was only about 1 mCi/mL. It is not known to what extent such radioactivity levels induce radiolysis. Obviously, the effect of this radiation level on the immunoreactivity is far lower than the 10 mCi/mg reported by Wahl et al. (18). More quantitative measurements of radiation effects on radiolabeled MABs are needed. Our data indicated no apparent changes in either radiochemical purity or immunoreactivity of either  $^{125}\text{I}$ - or  $^{131}\text{I}$ -labeled MAB 1H10 when stored at  $-20^\circ\text{C}$  or  $-70^\circ\text{C}$  for 3 d. The results imply that the labeling efficiency and biologic activity of radioiodinated MAB could be sufficiently preserved at temperatures of  $-20^\circ\text{C}$  or below, allowing biologic studies during this period. The reason labeling with  $^{125}\text{I}$  seemed to preserve more bound radioiodine and binding immunity than that of  $^{131}\text{I}$  is not fully known. Iodine-125 may exert a lower radiation effect on the antibody molecule than  $^{131}\text{I}$ , and this may be responsible in part for the difference.

Using our indices to express immunoreactivity of both  $^{125}\text{I}$ - and  $^{131}\text{I}$ -labeled antibodies was an attempt to avoid the error of traditional enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA) (4). Although ELISAs are effective, they fail to differentiate the immunoreactivity between labeled and unlabeled antibodies. The indices we used represent only the binding changes of the radiolabeled antibody, and may thus reflect more about the actual immunoreactivity of the labeled antibody. Since immunoreactivity of radioiodinated antibody is expressed as an arbitrary unit, the indices shown in this study do not necessarily represent the authentic immunologic response in vivo.

MAb 1H10 has been characterized initially (13). While its

relatively high  $K_d$  value ( $4 \times 10^8$  M) makes it a potential carrier for radioimmunodetection or perhaps radioimmunotherapy (23), many hinderances to clinical application still need to be resolved. Freezing appears to be a rational alternative to the preservation of radiochemical purity and immunoreactivity, however. Due to the immunologic heterogeneity of different subclasses of MAbs, the effect of cryopreservation presented may not be true for the other subclasses of radiolabeled antibodies. Available data indicate that the addition of human albumin at a concentration of 2%–5% weight/volume or the addition of a free radical scavenger also may slow radiolysis of radioantibody (18,21).

### CONCLUSION

Our initial results show that freezing at  $-70^\circ\text{C}$  results in a reduction of radiolysis and the preservation of more immunoreactivity of radioiodinated MAb 1H10 than freezing at  $4^\circ\text{C}$  or  $-20^\circ\text{C}$ . Iodine-125-labeled MAb had more stable immunoreactivity and less free iodide dissociation than  $^{131}\text{I}$ -labeled MAb at the same conditions. Freezing may provide an alternative for stabilizing the radiochemical purity and immunoreactivity of radioiodinated MAbs.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. C.H. Perng and Ms. L.M. Wang for their invaluable assistance with the radioiodination and binding assays. This work was supported, in part, by the National Science Council, ROC Grant NSC 85-2331-B-016-134. This work was presented at the Society of Nuclear Medicine's 45th Annual Meeting in Toronto, Ontario in June 1998.

### REFERENCES

- Bhargava KK, Acharya SA. Labeling of monoclonal antibodies with radionuclides. *Semin Nucl Med*. 1989;19:187–201.
- Goldenberg DM. Monoclonal antibodies in cancer detection and therapy. *Am J Med*. 1993;94:297–312.
- Larson SM, Divgi CR, Scott A, et al. Current status of radioimmunotherapy. *Nucl Med Biol*. 1994;21:785–792.
- Grossman ZD, Rosebrough SF. Problems in radioimmunoinaging and radioimmunotherapy. In: Grossman ZD, Rosebrough SF, eds. *Clinical Radioimmunoinaging*. New York, NY: Grune & Stratton; 1988:120–133.
- Gobuty AH, Kim EE, Weiner RE. Radiolabeled monoclonal antibodies: radiochemical pharmacokinetic and clinical challenges. *J Nucl Med*. 1985;26:546–548.
- Kishore R, Eary JF, Krohn KA, et al. Autoradiolysis of iodinated monoclonal antibody preparations. *Int J of Radiat Appl Instrument, Part B, Nucl Med and Biol*. 1986;13:457–459.
- Sakahara H, Endo K, Kozumi M, et al. Relationship between in vitro binding activity and in vivo tumor accumulation of radiolabeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med*. 1988;29:235–240.
- Wilbur DS, Hadley SW, Hylarides MD, et al. Development of a stable radioiodinating reagent to label monoclonal antibodies for radiotherapy of cancer. *J Nucl Med*. 1989;30:216–226.
- Paik CH, Yokoyama K, Reynolds JC, et al. Reduction of background activities by introduction of a diester linkage between antibody and a chelate in radioimmunodetection of tumor. *J Nucl Med*. 1989;30:1693–1701.
- Wahl RL, Liebert M. Improved radiolabeled monoclonal antibody uptake by lavage of intraperitoneal carcinomatosis in mice. *J Nucl Med*. 1989;30:60–65.
- Health and Vital Statistics*. Taipei, Taiwan: Republic of China, Department of Health, Executive Yuan; Sept. 1998: 324.
- Yu MH, Roffler SR, Hwang WS, et al. Localization and therapy of human cervical tumor xenografts with radiolabeled monoclonal antibody 1H10. *Gynecol Oncol*. 1992;47:93–101.
- Roffler SR, Yu MH, Chen MR, et al. New monoclonal antibody against human cervical carcinoma with diagnostic and therapeutic potential. *Chin J Microbiol Immunol*. 1991;24:19–29.
- Greenwood FC, Hunter MM, Glover JS. The preparation of  $^{131}\text{I}$ -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J*. 1963;89:114–123.
- Yu DS, Yeh MY, Chen WL, et al. In vivo localisation of human urinary bladder carcinoma xenograft in nude mice using radiolabelled monoclonal antibody. *Br J Urol*. 1987;59:540–546.
- Chen WL, Huang WS, Yu MS, et al. Imaging of xenografted human cervical carcinoma in nude mice with radiolabeled monoclonal antibody. *Ann Nucl Med*. 1990;3:1–6.
- Antibody quality control (Appendix F). In: *Evaluation of Safety, Dose Tolerance, Pharmacokinetics, and Efficacy in the Detection of Hepatocellular Carcinoma by Diagnostic Imaging of Fab' Fragment of the Anti-AFP Antibody Immun-31 Labeled with Tc-99m*. Protocol No. 1007A. Warren, NJ: Immunomedics, Inc.; 1990:31.
- Wahl RL, Wissing J, del Rosario R, Zasadny KR. Inhibition of autoradiolysis of radiolabeled monoclonal antibodies by cryopreservation. *J Nucl Med*. 1990;31:84–89.
- Hinkle GH, Loesch JA, Hill TL, et al. Indium-111 monoclonal antibodies in radioimmunoscintigraphy. *J Nucl Med Technol*. 1990;18:16–28.
- Hnatowich DJ. Recent developments in the radiolabeling of antibodies with iodine, indium and technetium. *Semin Nucl Med*. 1990;20:80–91.
- Bartolini P, De Assis LM, Fonseca ML. Radiolodination of human growth hormone with characterization and minimization of the commonly define "damaged products." *Clin Chim Acta*. 1981;110:177–185.
- Lubec G. The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *J Invest Med*. 1996;44:324–346.
- Larson SM, Carrasquillo JA, Reynolds JC. Radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *Cancer Invest*. 1984;2:363–381.

# Inhibition of Autoradiolysis of Radiolabeled Monoclonal Antibodies by Cryopreservation

Richard L. Wahl, Joseph Wissing, Renato del Rosario, and Kenneth R. Zasadny

*University of Michigan Medical Center, Department of Internal Medicine, Division of Nuclear Medicine, Ann Arbor, Michigan*

Autoradiolysis of therapeutic doses of monoclonal antibodies can occur rapidly, limits their shelf life and makes on-site radiolabeling a near-necessity. We evaluated freezing of three different  $^{131}\text{I}$ -labeled murine monoclonal antibodies at  $-70^\circ\text{C}$ , immediately following radiolabeling, as a method of diminishing autoradiolysis, and of preserving immunoreactivity. Freezing greatly limits the ability of radiation-induced free radicals to diffuse in solution and thus produce radiolytic damage. By freezing at  $-70^\circ\text{C}$  autoradiolytic damage of immunoreactivity of three different  $^{131}\text{I}$  monoclonal antibodies could be largely eliminated, in contrast to the 80–90% losses in immunoreactivity seen with storage at  $4^\circ\text{C}$  for a period of 1 to 12 days. Reduced in vitro deiodination rates are also seen for frozen antibodies. Limited studies with  $^{125}\text{I}$ -labeled antibodies indicate autoradiolysis does occur, though at a slower rate per mCi than for  $^{131}\text{I}$ , and that this process is also retarded by freezing. Freezing may be valuable while quality control procedures are performed following radiolabeling as well as if temporary storage or shipment of radioantibodies prior to patient dosing is undertaken. While the approach should be validated for each antibody studied, freezing of therapeutic doses of monoclonal antibodies appears to be a simple and effective approach to the problem of autoradiolysis.

**J Nucl Med 1990; 31:84–89**

**R**adiolabeled monoclonal antibodies are increasingly being studied as diagnostic and therapeutic agents (1). The specific delivery of therapeutic doses of radioactivity to tumors by antibodies can result in tumor shrinkage (2,3). Unfortunately, the radioactivity attached to the antibody potentially can also irradiate the antibody molecule in addition to the tumor and can lead to radiolysis with a loss of immunoreactivity (4). While radiolysis may not be a problem with the low radioactivity doses used for antibody imaging, increasing doses of antibody-associated radioactivity are being given for therapy. Thus, the possibility of radiolysis occurring in the interval from radiolabeling to administration to the patient is real, particularly during the

time when quality control procedures such as assays of immunoreactivity and for endotoxin are performed prior to antibody administration to patients. In addition, as antibody therapy grows in utility, it is possible that regional facilities may label the antibodies for transport to other centers for administration, thus increasing the time from radiolabeling to injection and thereby increasing the risk of autoradiolysis. Kishore and colleagues have shown that external beam irradiation of slightly over 300 Gy will result in a 50% drop in immunoreactivity of a solution of anti-melanoma Fab antibody fragments (4). This radiation dose could be self-delivered to antibody in a solution by roughly 80 mCi iodine-131 ( $^{131}\text{I}$ ) in 24 hr so the levels are quite easily achievable in the preparation of compounds for radioimmunotherapy (4).

It is believed that most radiation damage occurring in aqueous solutions subjected to external irradiation is mediated by mobile free-radicals (5). The situation in a vial containing radiolabeled monoclonal antibodies is similar, but additionally involves the fact that the radioactive decay is occurring in immediate contiguity with the antibody molecule due to the attachment of the radiolabel to the antibody molecule. It has been demonstrated that the addition of human albumin to a 2–5% w/v solution level to the vial containing radioantibody or hormones will slow radiolysis (4,6). This approach, while straightforward, does not totally prevent radiolysis and has the potential disadvantage that it does involve the addition of a human blood product derivative to the antibody dose. This manipulation in this era of concern regarding human blood products may be an undesirable addition.

A potential alternate method for diminishing the effects of irradiation on biologic systems is through freezing, which limits the diffusion of these short-lived free radicals (5). While it has traditionally been immunological dogma that the freezing of antibodies diminishes immunoreactivity, especially if there are multiple cycles of freezing and thawing, our experience with several murine monoclonal antibodies has been that a single freeze and thaw cycle generally has little adverse effect (Wahl RL: unpublished data). For these reasons we explored the efficacy of freezing as a means to avoid

Received Jan. 3, 1989; revision accepted Aug. 23, 1989.

For reprints contact: Richard L. Wahl, MD, University of Michigan Medical Center, Div. of Nuclear Medicine, 1500 East Medical Center Dr., Ann Arbor, MI 48109-0028.

or reduce the autoradiolysis occurring following antibody labeling with radioiodine.

## METHODS

Three monoclonal antibodies were evaluated in this study: 5G6.4, a murine IgG2a monoclonal reactive with ovarian and many other carcinomas (7), 763.24T, a murine IgG1 reactive with a high molecular weight antigen present on the vast majority of melanomas, and 225.28S a murine IgG2a, reactive with a different epitope of the high molecular weight melanoma antigen recognized by 763.24T (8,9). All antibodies were grown as ascites in pristane-primed nude mice and were purified by either staphylococcal protein A (225.28S and 5G6.4) or DEAE chromatography 763.24T (10,11). Purity was assessed by S.D.S. polyacrylamide gels performed in the presence or absence of  $\beta$ -mercaptoethanol (12).

Radiolabeling of monoclonal antibodies was by the iodogen method (13). Iodine-131 and iodine-125 ( $^{125}\text{I}$ ) were used for the initial studies, but since  $^{125}\text{I}$  caused less radiolysis/mCi than  $^{131}\text{I}$  (vide infra),  $^{131}\text{I}$  (I.C.N.) was used for most subsequent experiments. Typical, low-level radiolabeling reaction conditions involved 10–15 mCi input  $^{131}\text{I}$  being reacted with 500–

1000  $\mu\text{g}$  of purified antibody, with an iodogen/antibody protein ratio of roughly 1  $\mu\text{g}/5 \mu\text{g}$ . Free iodine following radiolabeling was removed by anion exchange chromatography BioRad AgX-18. Higher level labeling of 5G6.4 involved an input radioactivity of approximately 76.5–80 mCi  $^{131}\text{I}$  reacted with 5 mg of antibody protein. High level  $^{125}\text{I}$  labeling was performed with 125 mCi of input  $^{125}\text{I}$  and 5 mg of 5G6.4.

Immediately following radiolabeling, aliquots of the antibody preparations were divided for storage at either 4° centigrade or at –70° centigrade. The solutions stored were 0.5–1.0 cc in volume (though for the  $^{125}\text{I}$  storage, a 2.0 ml volume was used). Total radioactivity was determined/vial through the use of an ionization chamber dose calibrator (Capintec). Separate aliquots were stored and then analyzed at varying time points including 2, 4, and for low-level labels, at 11–12 days postlabeling. Cell binding assays were conducted using viable human melanoma (HTB-63) for 763.24T or 225.28S or ovarian carcinoma (HTB-77 IP3) for 5G6.4, target cells. These were performed in conditions of antigen excess by addition of 10 or 100 ng of the antibody to  $\sim 5\text{--}10 \times 10^6$  target cells in a test tube at a volume of 0.5–1 cc. Incubation for 1–2 hr at 4°C was followed by washing  $\times 2$  and counting of the cell pellet in a gamma counter. No cells added and excess unlabeled antibody (100  $\mu\text{g}$ ) during incubation (blocked) con-

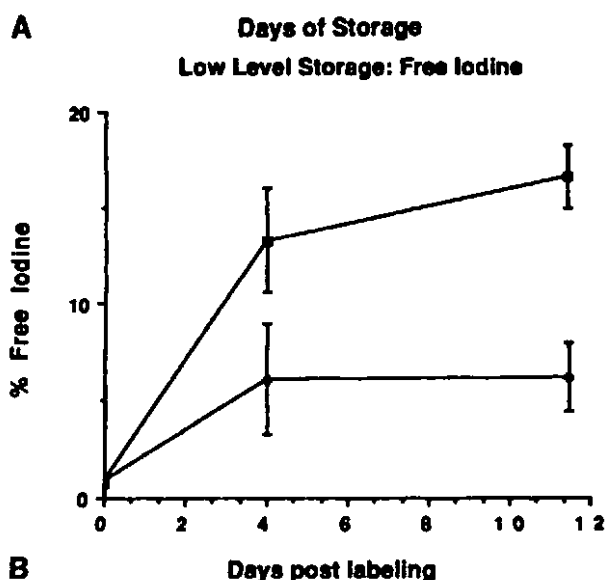
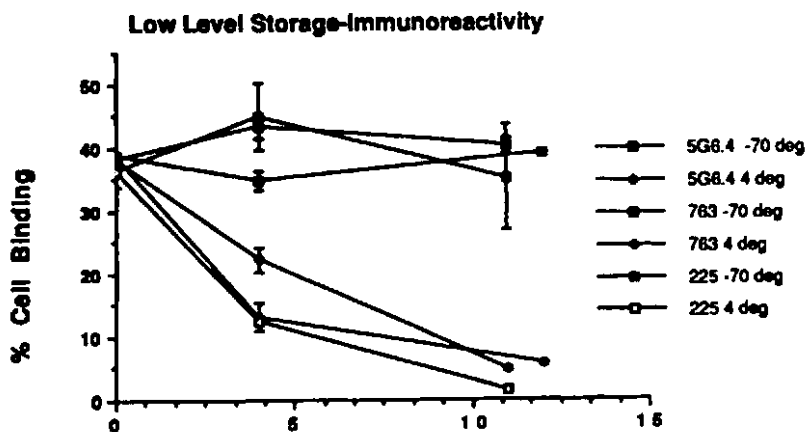


**FIGURE 1**

A: Mean  $\pm$  s.e.m. of immunoreactivity assays following storage at 4°C or –70°C of  $^{131}\text{I}$  5G6.4, 763.24 T, or 225.28 S for varying intervals following radiolabeling. The estimated radiation dose/vial for 5G6.4 is: 4 days, 4°C = 1,185 Gy; 4 days, –70°C = 1,307 Gy; 12 days, 4°C = 3,041 Gy; 12 days, –70°C = 2,621 Gy. The estimated  $^{131}\text{I}$  radiation dose for 225.28S is: 4 days, 4°C = 2,194 Gy; 4 days, –70°C = 2,100 Gy; 11 days, 4°C = 5,350 Gy; 11 days, –70°C = 5,236 Gy. The estimated  $^{131}\text{I}$  radiation dose for 763.24T is: 4 days, 4°C = 2,012 Gy; 4 days, –70°C = 2,100 Gy; 11 days, 4°C = 4,625 Gy; 11 days, –70°C = 4,753 Gy. All –70°C storage immunoreactivity values are significantly superior to those obtained with storage at 4°C [ $p < (0.025 - 0.0005)$ ]. B: Graphic display of thin layer chromatographic data  $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$  of  $^{131}\text{I}$  liberation from  $^{131}\text{I}$ -labeled antibody preparations during storage under conditions described for Figure 1A. Free iodine liberation is significantly less at –70°C than at 4°C for early (4 day) and late (11–12 day) time points ( $p < 0.025$  and  $p < 0.0005$ , respectively).

trols were also included. The immunoreactive fraction is:

= 100 ×  $\frac{\text{Total counts bound-background}}{\text{Total counts added-background}}$  -  $\frac{\text{Blocked counts bound-background}}{\text{Blocked counts added-background}}$

Thin layer chromatography (TLC) was performed using a Gelman ITLC-SG (silica gel) system, with 50% ethanol and 50% saline as the solvent system. Radiochromatograms were counted and analyzed using an automated scanner (BioScan). Free iodine migrates with the solvent front and antibody-bound radioactivity remains at or near the origin. The percentage of free/total iodine activity was computer-determined and recorded. The cell binding assays and TLC studies were performed immediately post-radiolabeling and immediately after removal of aliquots of radioactivity from storage at the selected time points. Sizing HPLC was performed on aliquots from the high-level <sup>131</sup>I and <sup>125</sup>I studies using a Pharmacia FPLC system with a flow rate of 0.5 cc/min and a Superose 12 size-exclusion column. No vials were frozen or thawed more than once. Radiation dose/vial was determined using the MIRD formalism for spheres of .5-2 cc volume. For a 1 cc sphere for <sup>131</sup>I, it was estimated that 97.8% of the radiation dose was due to electrons with the remainder from photons. The <sup>125</sup>I self dose for a 1 cc sphere assumes 78.4% of the self dose to be due to electrons with a 21.6% photon contribution. The values of Δ<sub>i</sub> and the absorbed fraction data for photons from <sup>131</sup>I and <sup>125</sup>I were derived from published MIRD data (14,15).

RESULTS

Low-Level Storage

Studies of immunoreactivity of the 763.24T, 225.28S, and 5G6.4 antibodies following radiolabeling and storage are shown graphically in Figure 1A. In these studies, a clear decrease in immunoreactivity from base-

line was seen at 4 days postlabeling, and in particular at 11-12 days postlabeling if storage at 4°C was undertaken. This loss of immunoreactivity was essentially abrogated when storage was conducted at -70°C. These decrements in immunoreactivity occurred with just 1.75 mCi to 3.68 mCi added/vial which over 4 days represents an approximate radiation dose of 1185-2194 Gy and by 11-12 days of 2621-5500 Gy (4). There is also significantly less free iodine in the antibody aliquots stored at -70°C than in those stored at 4°C, though the differences are somewhat less marked than those in immunoreactivity, though still significant (Fig. 1B).

*Higher level labeling.* In the first study, 60 mCi of <sup>131</sup>I 5G6.4 was divided into two nearly equal aliquots of 1 cc each. One aliquot (31 mCi) was stored at -70°C and one (27 mCi) at 4°C for 24 hr. Cell binding and ITLC assay results from before and after storage are shown in Table 1. There is a major drop in immunoreactivity in just 24 hr of storage at 4°C, while at -70°C there is a more modest decrement in immunoreactivity. The radiation dose in this 24-hr time period is estimated at 2592-2976 Gy. In a second study, storage was carried to 48 hr. In this study, 5G6.4 with a specific activity of 15.3 μCi/μg was divided into aliquots of 19.8 and 20.5 mCi/ml for storage at 4°C and -70°C, respectively, for radiation doses of 3645 to 3774 Gy. All binding data are shown in Table 1 with Radio FPLC shown in Figures 2A and B. Note the major loss in immunoreactivity with the 4°C storage, but the excellent preservation of immunoreactivity in the -70°C storage conditions. FPLC, Figure 2A, shows the appearance of low to intermediate molecular weight (autoradiolytic breakdown) species when storage at 4°C was undertaken, but little change in FPLC profile if -70°C storage was performed. To evaluate the effect of the <sup>125</sup>I label on

TABLE 1  
5G6.4 Higher Level Storage Experiments

| Experiment 1<br>( <sup>131</sup> I) | Immunoreactivity<br>free iodine | Baseline      | 24 hr at 4° C <sup>1</sup> | 24 hr at -70° C <sup>1</sup> |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------|----------------------------|------------------------------|
|                                     |                                 | 54.1%<br>1.6% | 28.0%<br>14.5%             | 40.3%<br>4.3%                |
| Experiment 2<br>( <sup>131</sup> I) | Immunoreactivity                | Baseline      | 48 hr at 4° C <sup>2</sup> | 48 hr at -70° C <sup>2</sup> |
|                                     |                                 | 55.9 ± 1.2%   | 5.6 ± .9%                  | 58.2 ± 2.1%                  |
| Experiment 3<br>( <sup>125</sup> I) | Immunoreactivity                | Baseline      | 48 hr at 4° C <sup>3</sup> | 48 hr at -70° C <sup>3</sup> |
|                                     |                                 | 65.1 ± 2.3%   | 48.3 ± 4.6%                | 65.5 ± 5.2%                  |

<sup>1</sup> 27 mCi <sup>131</sup>I 5G6.4, specific activity 12 μCi/μg stored—~2,592 Gy Self-irradiation in 24 hr.  
<sup>2</sup> 31 mCi <sup>131</sup>I 5G6.4, specific activity 12 μCi/μg stored—~2,976 Gy Self-irradiation in 24 hr.  
<sup>3</sup> 19.8 mCi <sup>131</sup>I 5G6.4, specific activity 15.3 μCi/μg stored—~3,645 Gy Self-irradiation in 48 hr.  
<sup>4</sup> 20.5 mCi <sup>131</sup>I 5G6.4, specific activity 15.3 μCi/μg stored—~3,774 Gy Self-irradiation in 48 hr.  
<sup>5</sup> 44 mCi <sup>125</sup>I 5G6.4, specific activity 25.0 μCi/μg stored—~567 Gy of Self-irradiation in 48 hr.

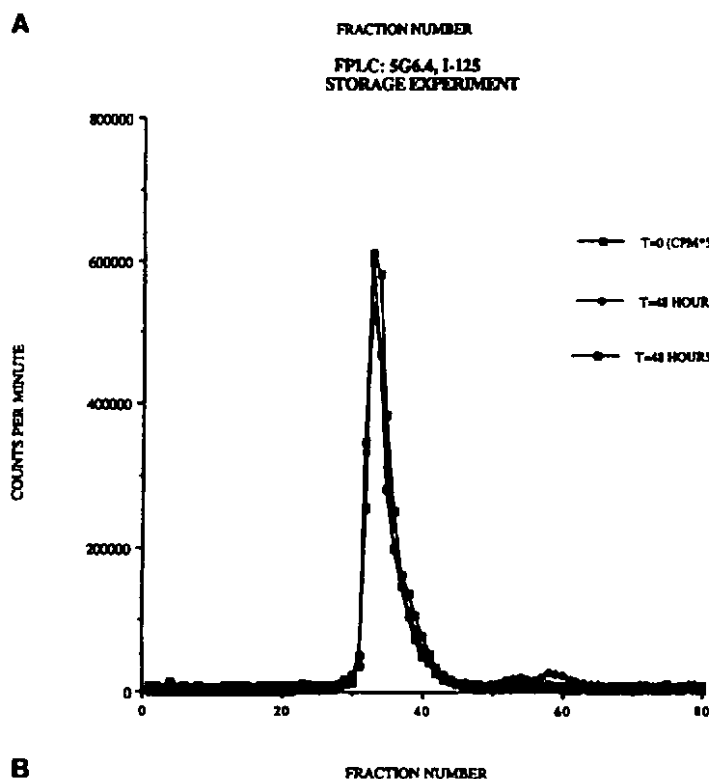
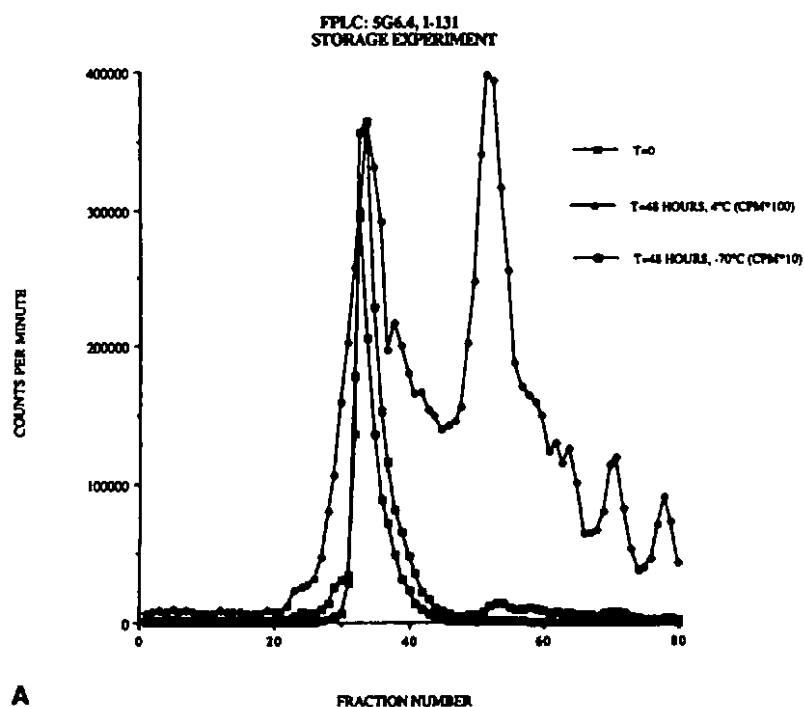


**FIGURE 2**  
A: Sizing FPLC of  $^{125}\text{I}$  5G6.4 antibody from experiment 2 (high level label). Note the single peak of the native 5G6.4 antibody ( $t = 0$  hr). At 48 hr with storage at  $-70^\circ\text{C}$ , there is little change in the FPLC profile. By contrast, with storage at  $4^\circ\text{C}$ , a marked broadening of the FPLC elution profile is seen with a small quantity of a high molecular weight species and considerable amounts of lower molecular weight species (fx 40-55), (which are higher in weight than free iodine which elutes at fx 58). B: FPLC profiles from high level  $^{125}\text{I}$  labeling of 5G6.4 and storage. Note that the tracing  $t = 0$  hr and  $t = 48$  hr at  $-70^\circ\text{C}$  are virtually identical, while for the storage at  $4^\circ\text{C}$ , there is mild liberation of free iodine (fx 58). Overall, the  $^{125}\text{I}$  preparation shows much less decomposition than the  $^{131}\text{I}$ /mCi.

immunoreactivity with storage, 5G6.4 was iodinated with  $^{125}\text{I}$  to a specific activity of  $25 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ . Forty-four millicuries were stored at  $4^\circ\text{C}$ , while an additional 44 mCi were stored at  $-70^\circ\text{C}$  in 2 ml. The calculated  $^{125}\text{I}$  irradiation self dose is but 567 Gy. The more modest loss in immunoreactivity at  $4^\circ\text{C}$  versus comparable mCi  $^{131}\text{I}$  preparations (Table 1) as well as the superiority of the storage at  $-70^\circ\text{C}$  versus  $4^\circ\text{C}$  is apparent for  $^{125}\text{I}$ . FPLC tracings of the various  $^{125}\text{I}$  preparations demon-

strate the more modest quantity of breakdown products (mainly free iodine) seen at  $4^\circ\text{C}$  and the lack of such breakdown at  $-70^\circ\text{C}$  (Fig. 2B). The more minimal appearance of  $^{125}\text{I}$  breakdown products at  $4^\circ\text{C}$  is particularly apparent when contrasted with the FPLC profile of the  $^{131}\text{I}$  preparations of comparable mCi added, as is shown in Figure 2A. Note that the MIRD calculated dose for  $^{125}\text{I}$  is much lower than for a similar quantity of  $^{131}\text{I}$ .

## DISCUSSION

This report illustrates that decrements in immunoreactivity of antibodies and increases in the liberation of free iodine and lower molecular weight protein breakdown products occur over a relatively short-time period when low therapeutic levels of  $^{131}\text{I}$  are attached to monoclonal antibodies. Similar phenomena also occur over a longer storage time course when lower  $^{131}\text{I}$  doses are used. The degree of radiolysis is impressive given the relatively low amount of radioactivity used. The HPLC studies clearly demonstrate that the products of autoradiolysis are of low molecular weight and that their formation is retarded by freezing. By contrast, while radiolysis does occur with  $^{125}\text{I}$ , it is more modest/mCi as shown by HPLC and immunoreactivity data. The use of freezing at  $-70^\circ\text{C}$  also slows  $^{125}\text{I}$  autoradiolysis.

Decreasing the storage temperature to  $-70^\circ\text{C}$  drastically reduced the radiolysis-induced drop in immunoreactivity and considerably slowed the appearance of free iodine versus storage at  $4^\circ\text{C}$ . The beneficial effect of low temperature on immunoreactivity is presumed due to the immobilization of  $^{131}\text{I}$  decay-induced free radicals in the ice crystal lattice preventing the hydrogen peroxide and perhydroxyl radical from damaging antibodies (5). The radioprotective effect of the  $-70^\circ\text{C}$  appears analogous to that reported for human serum albumin used when antibodies are externally irradiated, but is achieved without adding human blood products to the antibody injection mixture (4). The combination of the two approaches, cryopreservation and albumin or a free radical scavenger might be even more effective than  $-70^\circ\text{C}$  alone and may warrant further study (16). It should also be noted that freezing of hormones decreases radiolysis, and that the possibility of freezing antibodies for storage has been previously suggested (6, 17). Simple absorbed dose calculations indicate that storage at larger, rather than smaller volumes, may also be beneficial and suggest that a combination of these approaches may ultimately be most useful.

The more modest effects of  $^{125}\text{I}$  on autoradiolysis despite the presence of low-energy, low range, high L.E.T.,  $^{125}\text{I}$  Auger electrons suggests that the free-radical effect may be predominant and the extent of autoradiolysis parallels the low estimated radiation dose by MIRD for  $^{125}\text{I}$ . While we have observed the benefits of cryopreservation with each antibody, the radiolytic effect of varying radiolabel and storage conditions likely should be determined for each antibody and label, as it has been reported that some yttrium-90-labeled antibodies experience relatively little autoradiolysis when stored over days at a 2 mCi/ml concentration (18).

In summary, for the three monoclonal antibodies studied, freezing at  $-70^\circ\text{C}$  radioiodinated monoclonal antibodies preserves their immunoreactivity and molecular integrity much better than storage at  $4^\circ$ . These data

suggest that for high-dose radioimmunotherapy with monoclonal antibodies, freezing at  $-70^\circ\text{C}$  might rationally be performed immediately after radiolabeling, while quality control procedures are performed on a small aliquot of the antibody. If the quality control results are satisfactory, the frozen product, which could have been transported to another site, might then be thawed and infused to the patient. Obviously, such an approach will need to be tailored to the individual antibody and label being studied, but it appears that for therapeutic doses of radioantibody, cryopreservation immediately after labeling may be a generally useful approach to maintain the immunological viability of a variety of antibodies and radiolabels.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CA 41531, CA 33802, CA 40497, and POI CA 42768-04 awarded by NCI/PHS. The technical assistance of Anaira Clavo, Gayle Jackson, Pam Sullivan, Patricia Scott, Steve Kronberg, and Andrew Kucharski is greatly appreciated. The secretarial expertise of Michele Curro, Mary Miller, and Lisa Donahue is recognized.

## REFERENCES

1. Goldenberg DM. Targeting of cancer with radiolabeled antibodies. Prospects for imaging and therapy. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:580-587.
2. Sitzmann JV, Order SE, Klein JL, Lechner PK, Fishman EK, Smith GW. Conversion by new treatment modalities of nonresectable to resectable hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 1987;5:1566-1573.
3. DeNardo SJ, DeNardo GL, O'Grady LF, et al. Treatment of a patient with B cell lymphoma by I-131 LYM-1 monoclonal antibodies. *Int J Biol Markers* 1987;2:49-53.
4. Kishore R, Early JF, Krohn KA, et al. Autoradiolysis of iodinated monoclonal antibody preparations. *Int J of Radiat Appl Instrum Part B, Nucl Med and Biol* 1986;4:457-459.
5. Pizzarello DJ. Direct and indirect action. In: Pizzarello DJ, Witcofski RL. *Basic radiation biology*. Second edition. Philadelphia: Lea & Febiger; 1975:20-29.
6. Bartolini P, De Assiss LM, Fonseca MLQ. Radioiodination of human growth hormone with characterization and minimization of the commonly defined "damaged products." *Clin Chim Acta* 1981;110:177-185.
7. Wahl RL, Liebert M, Roberts J, Jackson G, Kronberg S, Laino L. Production and characterization of a murine monoclonal antibody reactive with ovarian and other epithelial carcinomas. *Proceedings of AACR* 1986;27:355.
8. Wilson BS, Giacomini P, Imai K, et al. Human melanoma-associated antigens identified with monoclonal antibodies. *La Ricerca in Clinica e in Laboratorio* 1982;12:517-538.
9. Wilson BS, Imai K, Natali PG, Ferrone S. Distribution and molecular characterization of a cell surface and cytoplasmic antigen detectable in human melanoma cells with monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1981;28:293.
10. Ey P, Prowse S, Jenkins C. Isolation of pure IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, and IgG<sub>2b</sub> from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochimistry* 1987;15:429-436.
11. Wahl RL, Parker CW, Philpott GW. Improved radioimaging and tumor localization with monoclonal F(ab')<sub>2</sub>. *J Nucl Med* 1983;24:316-325.

12. Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 1970;222:680.
13. Fraker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 80:849-857.
14. MIRD Pamphlet 10, Society of Nuclear Medicine, 1975.
15. MIRD Pamphlet 8. *J Nucl Med* 1971;25:(suppl 5).
16. Yalow RS, Berson SA. Labeling of proteins-problems and practices. *Trans New York Acad Sci* 1966;28:1033-1044.
17. Saha GB. Radioiodination of Antibodies for Tumor Imaging. In: Burchiel SW, Rhodes BA, eds. *Radioimmunimaging and Radioimmunotherapy* New York: Elsevier, 1983:171-184.
18. Frincke JM, Halpern SE, Hagan PL, et al. The effect of radioautolysis on <sup>90</sup>Y antibody (Ab) preparations. *J Nucl Med* 1987;28:711.

| La 138,9055                         | La 120 2.8 s                        | La 121 5.3 s                      | La 122 9 s                        | La 123 16.3 s                     | La 124 29 s                       | La 125 65 s                       | La 126 1.0 m                      | La 127 3.8 m                      | La 128 4.9 m                      | La 129 11.6 m                     | La 130 8.7 m                      | La 131 59 m                       | La 132 24.3 m                     | La 133 3.91 h                     | La 134 6.67 m                     | La 135 19.4 h                     | La 136 9.9 m                      | La 137 6 · 10 <sup>4</sup> a      | La 138 0.0002                     | La 139 99.9098                    |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 9.0                                 | B <sup>+</sup> 86.21-5.8<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 |
| Ba 118 5.2 s                        | Ba 119 5.4 s                        | Ba 120 24 s                       | Ba 121 29.7 s                     | Ba 122 117 s                      | Ba 123 27.6 m                     | Ba 124 11.9 m                     | Ba 125 3.5 m                      | Ba 126 100 m                      | Ba 128 2.43 d                     | Ba 129 2.15 m                     | Ba 130 2.20 m                     | Ba 131 0.106                      | Ba 132 14.5 m                     | Ba 133 0.101                      | Ba 134 26.9 h                     | Ba 135 2.417                      | Ba 136 2873 s                     | Ba 137 7.854                      | Ba 138 251 m                      | Ba 139 71.70                      |
| B <sup>+</sup> 86.21-5.8<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34   | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 |
| Cs 117 6.5 s                        | Cs 118 17 s                         | Cs 119 30.5 s                     | Cs 120 2.0 m                      | Cs 121 2.0 m                      | Cs 122 1.8 s                      | Cs 123 1.8 s                      | Cs 124 5.3 s                      | Cs 125 4.5 m                      | Cs 126 1.6 m                      | Cs 127 6.25 h                     | Cs 128 3.8 m                      | Cs 129 32.06 h                    | Cs 130 3.8 m                      | Cs 131 9.69 d                     | Cs 132 5.47 d                     | Cs 133 100                        | Cs 134 2.90 h                     | Cs 135 5.0 m                      | Cs 136 13.0 s                     | Cs 137 30.17 s                    |
| B <sup>+</sup> 86.21-5.8<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34   | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 |
| Xe 116 57 s                         | Xe 117 61 s                         | Xe 118 3.8 m                      | Xe 119 5.8 m                      | Xe 120 4.0 m                      | Xe 121 38.8 m                     | Xe 122 20.1 h                     | Xe 123 2.08 h                     | Xe 124 0.10                       | Xe 125 1.6 m                      | Xe 126 0.09                       | Xe 127 34.4 d                     | Xe 128 1.91                       | Xe 129 8.89 d                     | Xe 130 4.1                        | Xe 131 11.9 s                     | Xe 132 26.9                       | Xe 133 21.9 s                     | Xe 134 10.4                       | Xe 135 153 m                      | Xe 136 8.9                        |
| B <sup>+</sup> 86.21-5.8<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34   | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 |
| I 115 1.3 m                         | I 116 2.9 s                         | I 117 2.2 m                       | I 118 1.9 m                       | I 119 1.9 m                       | I 120 1.21 h                      | I 121 2.12 h                      | I 122 3.6 m                       | I 123 13.2 h                      | I 124 4.15 d                      | I 125 59.4 d                      | I 126 13.11 d                     | I 127 100                         | I 128 25.0 m                      | I 129 1.57 · 10 <sup>4</sup> a    | I 130 5.8 m                       | I 131 8.3 m                       | I 132 8.3 m                       | I 133 9.5 s                       | I 134 3.8 m                       | I 135 6.61 h                      |
| B <sup>+</sup> 86.21-5.8<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34   | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 |
| Te 114 15.2 m                       | Te 115 5.7 m                        | Te 116 2.5 h                      | Te 117 1.1 h                      | Te 118 6.0 d                      | Te 119 4.7 d                      | Te 120 0.096                      | Te 121 15.4 d                     | Te 122 2.603                      | Te 123 0.908                      | Te 124 4.816                      | Te 125 57.4 d                     | Te 126 18.95                      | Te 127 109 d                      | Te 128 31.69 a                    | Te 129 33.6 d                     | Te 130 38.80 a                    | Te 131 30 h                       | Te 132 76.3 h                     | Te 133 55.4 m                     | Te 134 41.8 m                     |
| B <sup>+</sup> 86.21-5.8<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34   | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 |
| Sb 114 6.57 m                       | Sb 115 3.5 m                        | Sb 116 32.1 m                     | Sb 117 2.8 h                      | Sb 118 5.9 h                      | Sb 119 36.5 h                     | Sb 120 15.9 m                     | Sb 121 57.36                      | Sb 122 42.64                      | Sb 123 42.64                      | Sb 124 2.77 a                     | Sb 125 0.3 · 10 <sup>4</sup> a    | Sb 126 0.3 · 10 <sup>4</sup> a    | Sb 127 0.3 · 10 <sup>4</sup> a    | Sb 128 0.3 · 10 <sup>4</sup> a    | Sb 129 0.3 · 10 <sup>4</sup> a    | Sb 130 0.3 · 10 <sup>4</sup> a    | Sb 131 0.3 · 10 <sup>4</sup> a    | Sb 132 0.3 · 10 <sup>4</sup> a    | Sb 133 0.3 · 10 <sup>4</sup> a    | Sb 134 0.3 · 10 <sup>4</sup> a    |
| B <sup>+</sup> 86.21-5.8<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34   | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 |
| Sn 112 0.97                         | Sn 113 21.4 m                       | Sn 114 0.65                       | Sn 115 0.34                       | Sn 116 14.53                      | Sn 117 13.6 d                     | Sn 118 24.23                      | Sn 119 293 d                      | Sn 120 32.59                      | Sn 121 12.1                       | Sn 122 4.83                       | Sn 123 40.1 m                     | Sn 124 5.79                       | Sn 125 9.5 m                      | Sn 126 10 <sup>-4</sup> a         | Sn 127 4.1 m                      | Sn 128 2.29                       | Sn 129 1.7 m                      | Sn 130 3.7 m                      | Sn 131 3.7 m                      | Sn 132 39.7 s                     |
| B <sup>+</sup> 86.21-5.8<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34   | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 | B <sup>+</sup> 1320.34<br>1320.34 |
| 0.15 ± 0.40                         | 0.15 ± 0.40                         | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       | 0.15 ± 0.40                       |