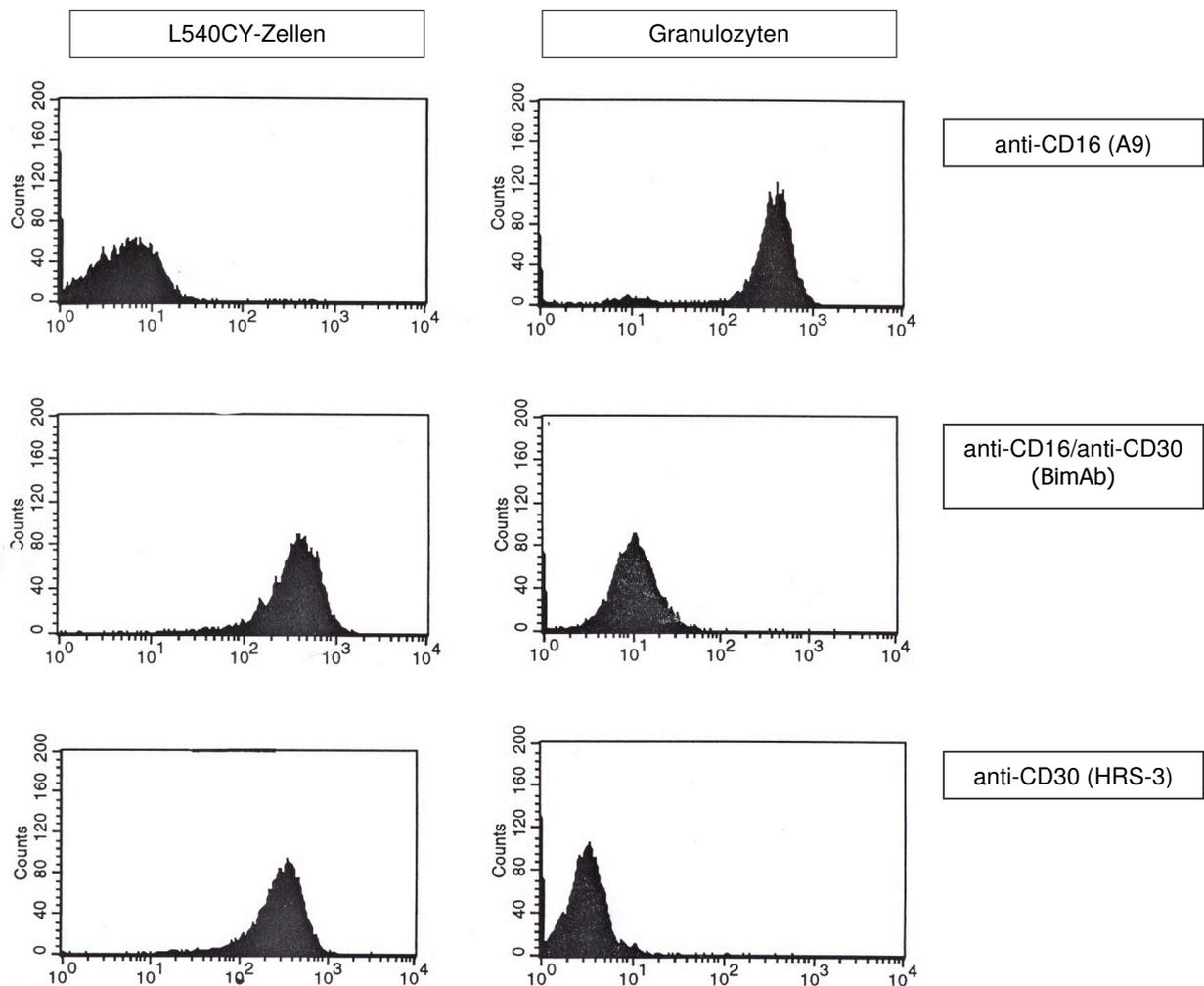


## 5. Ergebnisse

### 5.1 FACS-Untersuchungen

Die Untersuchungen der verwendeten Antikörper und der ausgewählten Zelllinien mittels FACS-Analysen dienten der Überprüfung ihrer Funktionalität und Affinität. Jeweils  $10^6$  CD30-positive L540CY-Zellen, A33-positive SW1222-Zellen und CD16-positive Granulozyten wurden mit jeweils 1  $\mu\text{g}$  Antikörper inkubiert. Als primäre Antikörper wurden die Antikörper HRS-3 (anti-CD30), A9 (anti-CD16), BimAb (anti-CD16/anti-CD30) oder A33 eingesetzt. Für die FACS-Analysen wurde ein sekundärer FITC-Antikörper zur Markierung benutzt.



**Abb. 1:**

FACS-Analysen mit L540CY-Zellen oder Granulozyten, die mit den Antikörpern A9, BimAb oder HRS-3 inkubiert wurden. Die Bilder zeigen eine starke Affinität des HRS-3 und des BimAb zu CD30-positiven L540CY-Zellen und eine starke Affinität des A9 und eine schwache Affinität des BimAb zu Granulozyten.

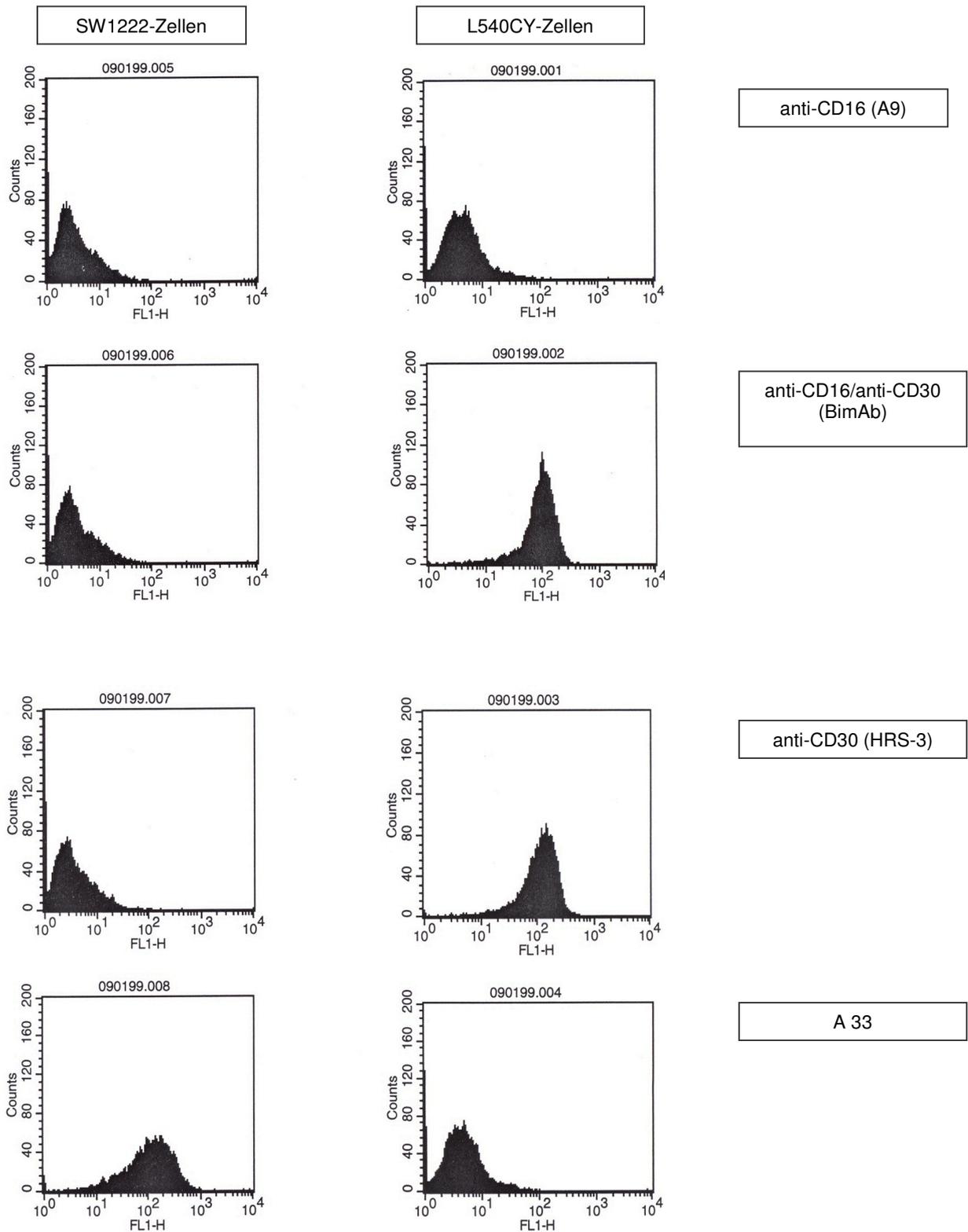


Abb. 2:

FACS-Analysen mit SW1222-Zellen oder L540CY-Zellen, die mit den Antikörpern A9, BimAb, HRS-3 oder A33 inkubiert wurden. Die Bilder zeigen eine starke Affinität des BimAb und des HRS-3 zu CD30-positiven L540CY-Zellen und keine Affinität zu SW1222-Zellen. Der A33 zeigt nur eine Affinität zu SW1222-Zellen.

Tabellarische Darstellung der gemessenen Affinitäten:

	SW1222-Zellen	L540CY-Zellen	Granulozyten
A9	-	-	++
BimAb	-	++	+
HRS-3	-	++	-
A33	++	-	n.d.

**Tabelle 1:**

Darstellung der gemessenen Affinitäten.

- : keine Bindung

+ : Bindung

++ : starke Bindung

n.d. : nicht durchgeführt

Die FACS-Analysen bestätigten die Affinitäten der einzelnen Antikörper gegenüber den ausgewählten antigenpräsentierenden Zellen.

## 5.2 Affinitätsbestimmung der Antikörper mittels BIAcore

Mit der BIAcore-Technik wurden die Affinitäten des Antikörpers HRS-3 (anti-CD30) gegen das CD30-Antigen, des Antikörpers A9 (anti-CD16) gegen das CD16-Antigen und die Affinität des BimAb (anti-CD16/anti-CD30) gegen das CD16- und das CD30-Antigen untersucht. Hierfür wurde das entsprechende Antigen auf einem Sensorchip chemisch gebunden. Der zu untersuchende Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen über das fixierte Antigen geleitet und durch einen Spülvorgang jeweils wieder gelöst. Die Änderung eines optischen Signals durch das Binden und Lösen des Antikörpers wurde abgeleitet und gemessen. Die Messkurven, die durch die unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Antikörpers entstehen, wurden zur besseren Darstellung übereinander projiziert. Aus diesen Daten konnten unter Verwendung des BIAcor-Rechenprogramms die jeweiligen Affinitätskonstanten berechnet werden.

Für die Affinitätskonstante  $K_D$  der jeweiligen Antikörper wurden folgende Werte ermittelt:

### Bindung am CD30-Antigen:

HRS-3 (anti-CD30)  $4,8 \times 10^{-11}$  M

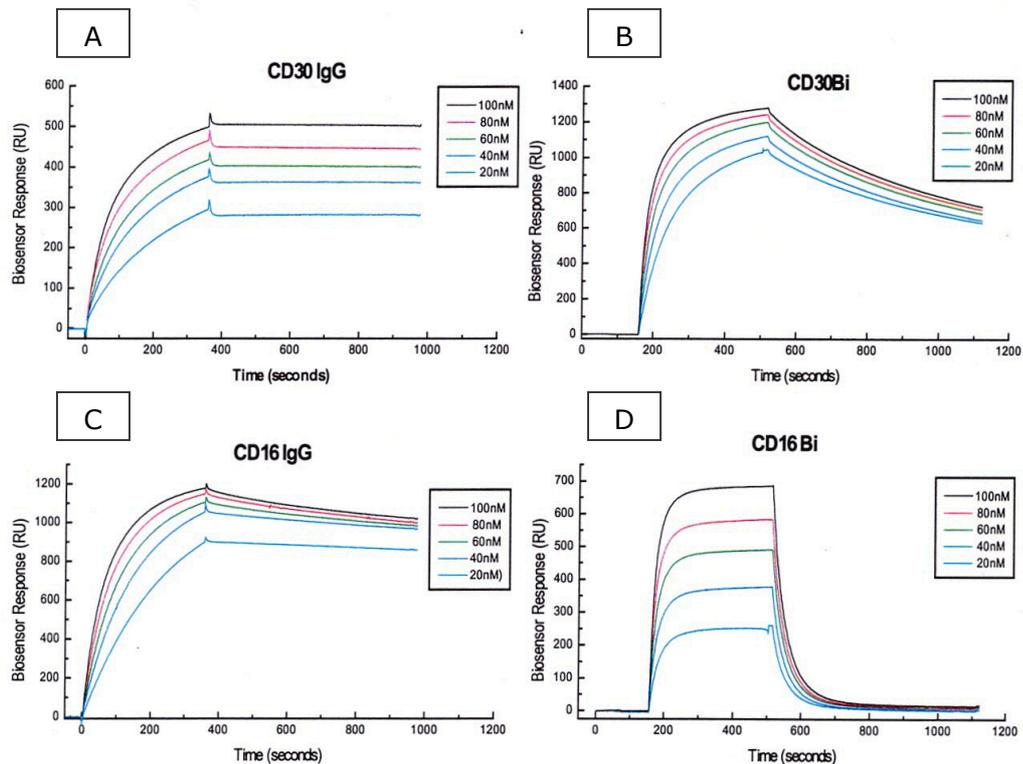
BimAb (anti-CD16/anti-CD30)  $2,6 \times 10^{-9}$  M

### Bindung am CD16-Antigen:

A9 (anti-CD16)  $1,55 \times 10^{-9}$  M

BimAb (anti-CD16/anti-CD30)  $3,77 \times 10^{-8}$  M

Die Daten wurden freundlicherweise mit der Unterstützung von Herrn B. Catimel erstellt.



**Abb.3** Übereinanderprojizierte Bindungskurven der verschiedenen Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen.

A: Bivalenter anti-CD30-Antikörper (HRS-3) gegenüber fixiertem CD30-Antigen

B: Bispezifischer anti-CD16/anti-CD30-Antikörper (BimAb) gegenüber fixiertem CD30-Antigen

C: Bivalenter anti-CD16-Antikörper (A9) gegenüber fixiertem CD16-Antigen

D: Bispezifischer anti-CD16/anti-CD30-Antikörper (BimAb) gegenüber fixiertem CD16-Antigen

Der elterliche Antikörper HRS-3 (anti-CD30) zeigte eine starke Bindung zum CD30-Antigen. Im Vergleich hierzu band der Antikörper A9 (anti-CD16) mit einer geringeren Affinität an sein Zielantigen.

Ein signifikanter Verlust der Affinität zeigte der BimAb mit seiner monovalenten Bindung zum jeweiligen Antigen. So verliert der anti-CD30-Arm des BimAb gegenüber dem bivalent-bindenden HRS-3 um den Faktor 54 an Affinität. Der anti-CD16-Arm des BimAb verliert gegenüber dem bivalent-bindenden A9 um den Faktor 24 an Affinität.

### 5.3 Qualitätskontrollen markierter Antikörper

Der elterlichen Antikörper HRS-3 (anti-CD30) und der bispezifische Antikörper BimAb (anti-CD16/anti-CD30) wurden mit  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  oder  $^{111}\text{In}$  radioaktiv markiert.

Die Herstellung der radioaktiv markierten Antikörper wurde mittels der im Material- und Methodenteil beschriebenen Techniken durchgeführt. Die Stabilität und die Bindungseigenschaften der Antikörper nach der radioaktiven Markierung wurden durch FPLC-Analysen, Dünnschichtchromatographien, Lindmo- und Scatchard-Analysen bestätigt. Der Antikörper A9 wurde nur für eine Versuchsreihe radioaktiv markiert. Weitere Untersuchungen der Bindungseigenschaften des radioaktiv markierten A9 wurden nicht durchgeführt, da im SCID-Maus-Modell primär keine CD16-positiven Granulozyten existieren.

### 5.3.1 Integrität der markierten Antikörper

Suspensionen der radioaktiv markierten Antikörper wurden mittels FPLC untersucht. Es zeigte sich, dass die markierten Antikörper während der radioaktiven Markierung nicht dissoziierten und keine Aggregate bildeten. Die Aufschlüsselung durch den FPLC zeigte jeweils ein deutliches Signal an der erwarteten Position von 160.000 kD (Daten nicht gezeigt).

### 5.3.2 ITLC

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie lässt sich das nicht gebundene radioaktive Material von den radioaktiven Antikörpern trennen. Während der Auftrennungszeit bewegen sich die kleinen nicht gebundenen Nuklide mit dem Lösungsmittel nach oben. Die radioaktiv markierten Antikörper verbleiben im unteren Teil des Papierstreifens.

In Tabelle 2 ist die Auswertung beispielhaft für  $^{125}\text{I}$  markierte Antikörper dargestellt.

	<b>Unten</b> [ccpm]	<b>Oben</b> [ccpm]	<b>% Unten</b>
$^{125}\text{I}$ -A9	373.395,0	7.818,4	97,90
$^{125}\text{I}$ -BimAb	41.768,6	956,6	97,76
$^{125}\text{I}$ -HRS-3	20.1703,0	2.730,6	98,66

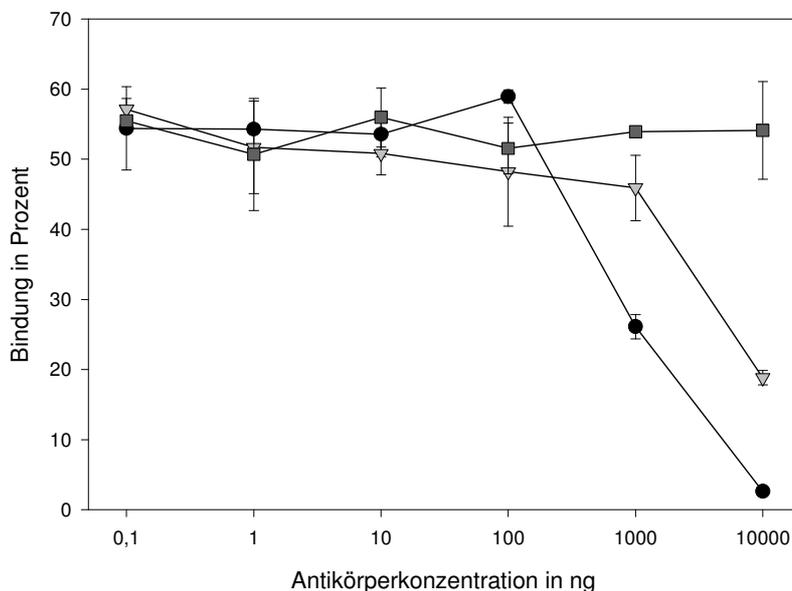
Tabelle 2:

Messwerte der chromatographischen Reinheitsprüfung. **Unten** bezeichnet die untere Hälfte des Papierstreifens. Hier befindet sich der Antikörper. **Oben** bezeichnet die obere Hälfte des Streifens mit den nicht gebundenen Anteilen. Die Angabe in Prozent bezieht sich auf die gesamte Menge der eingesetzten Aktivität.

In allen Kontrollen nach der radioaktiven Markierung zeigte sich, dass zwischen 95,5% und 98,8% der Radioaktivität am Protein gebunden war.

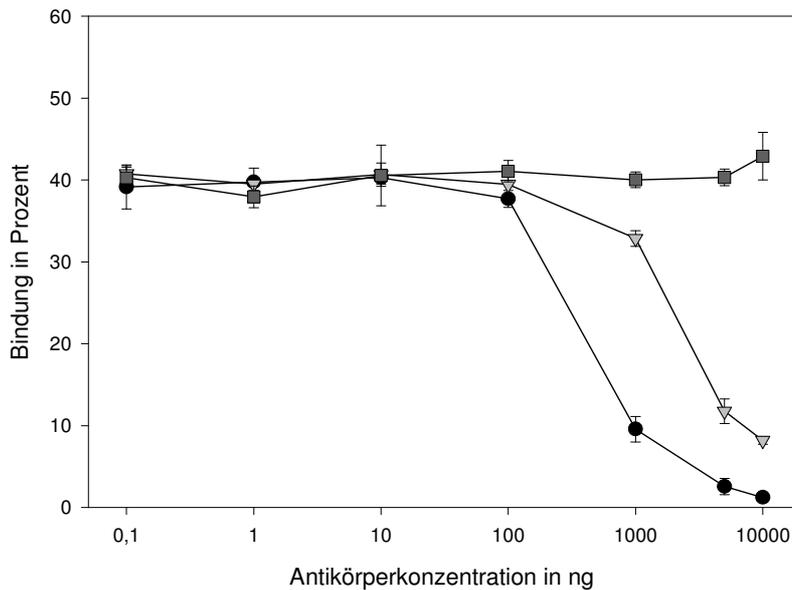
### 5.3.3 Inhibitionstests und Darstellung nach Lindmo

Zum direkten Vergleich der unterschiedlichen Affinitäten der beiden radioaktiv markierten Antikörper HRS-3 und BimAb wurden Inhibitionstests durchgeführt. Für die Inhibitionstests wurde jeweils eine konstante Menge an radioaktiv markiertem  $^{125}\text{I}$ -HRS-3 oder  $^{125}\text{I}$ -BimAb mit steigenden Konzentrationen an HRS-3, BimAb oder A9 inhibiert. Die Inhibitionsversuche bestätigten, dass die Affinität des radioaktiv markierten bivalenten HRS-3 Antikörpers für das membranständig exprimierte CD30-Antigen höher ist als die Affinität des bispezifischen Antikörpers BimAb (Abb. 4 und 5). Der  $^{125}\text{I}$ -BimAb war mit geringeren Konzentrationen des unmarkierten elterlichen Antikörpers HRS-3 zu inhibieren und der radioaktiv markierte elterliche Antikörper  $^{125}\text{I}$ -HRS-3 war nur durch höhere Mengen an unmarkiertem BimAb im Vergleich zum HRS-3 zu blockieren. Der bivalente Antikörper A9 zeigte wie erwartet keine inhibitorischen Eigenschaften. Somit wurde zum einen die Affinität des HRS-3 und des BimAb gegenüber dem CD30-Antigen nach der radioaktiven Markierung bestätigt, zum anderen konnte der deutliche Affinitätsunterschied der beiden Antikörper HRS-3 und BimAb nach der Markierung dargestellt werden.



**Abb. 4:**

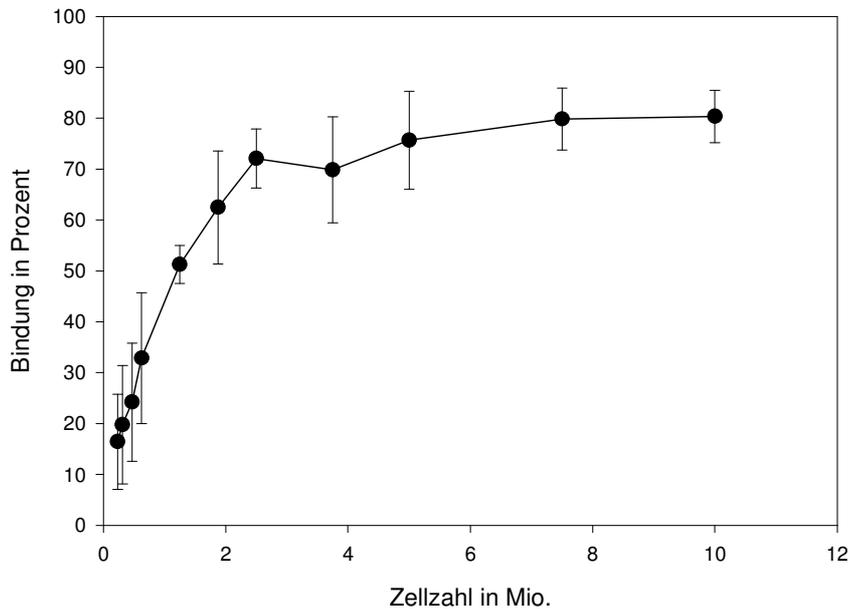
Inhibition radioaktiv markierter Antikörper durch steigende Konzentrationen unmarkierter Antikörper. Jeweils 20 ng  $^{125}\text{I}$ -HRS-3 werden mit steigenden Konzentrationen an HRS-3 (**Kreise**), BimAb (**Dreiecke**) und A9 (**Quadrate**) inhibiert. Pro Ansatz wurden 1 Mio. L540CY-Zellen verwendet.



**Abb. 5:**

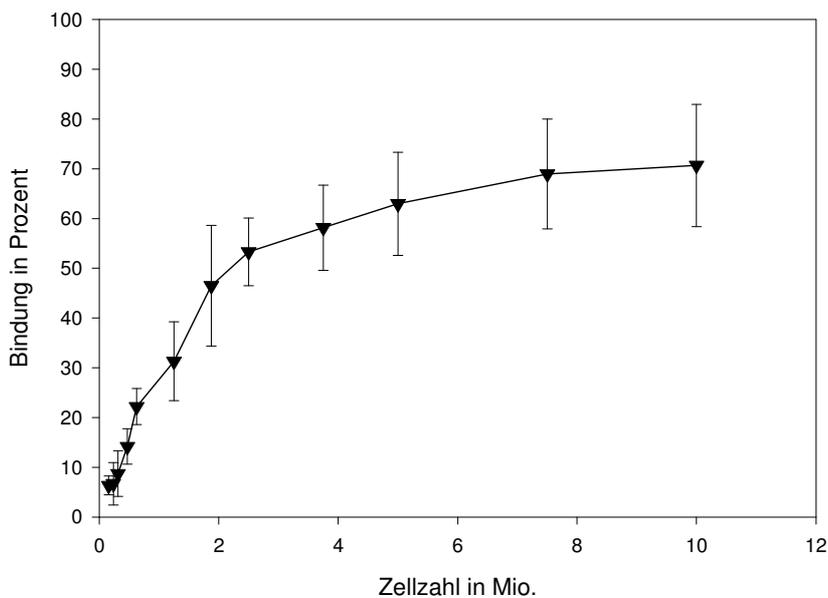
Inhibition radioaktiv markierter Antikörper durch steigende Konzentrationen unmarkierter Antikörper. Jeweils 20 ng  $^{125}\text{I}$ -BimAb werden mit steigenden Konzentrationen an HRS-3 (**Kreise**), BimAb (**Dreiecke**) und A9 (**Quadrate**) inhibiert. Pro Ansatz wurden 1,6 Mio. L540CY-Zellen verwendet.

Da durch die chemischen Prozesse der radioaktiven Markierung die Bindungseigenschaften der Antikörper verändert werden können, wurden zur Bestimmung des immunologisch aktiven Anteils Untersuchungen nach Lindmo durchgeführt. In der Literatur wird dieser Anteil als Immunreaktivität (IR) bezeichnet. Hierbei wird das Bindungsverhalten einer konstanten Menge an radioaktiv markierten Antikörpern gegenüber einer steigenden Zahl an antigenpräsentierenden Zellen, und damit einer steigenden Menge Antigen, untersucht. Durch entsprechende grafische Darstellung lässt sich der immunologisch reaktive Anteil (IR) als Schnittpunkt mit der Ordinate ermitteln.



**Abb. 6:**

Bindungstest nach Lindmo zur Bestimmung des immunologisch reaktiven Anteils (IR). Eine steigende Anzahl an L540CY-Zellen wurde jeweils mit 20 ng  $^{125}\text{I-HRS-3}$  inkubiert. Die Angabe der Bindung erfolgte im Bezug auf die jeweils eingesetzte gesamte Antikörpermenge.



**Abb. 7:**

Bindungstest nach Lindmo zur Bestimmung des immunologisch aktiven Anteils (IR). Eine steigende Anzahl an L540CY-Zellen wurden jeweils mit 20 ng  $^{125}\text{I-BimAb}$  inkubiert. Die Angabe der Bindung erfolgte im Bezug auf die jeweils eingesetzte gesamte Antikörpermenge.

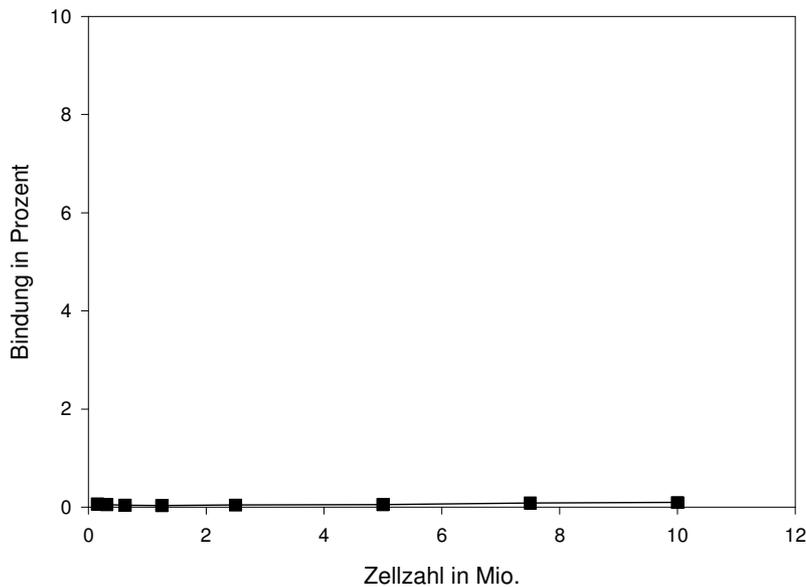


Abb. 8:  
Bindungstest nach Lindmo. L540CY-Zellen wurden jeweils mit 20 ng  $^{125}\text{I}$ -A9 inkubiert. Der anti-CD16-Antikörper A9 bindet nicht an CD30-positiven Zellen.

Die Bindung des radioaktiv markierten HRS-3 gegenüber den CD30-präsentierenden Zellen zeigt im Vergleich zum radioaktiv markierten BimAb eine früher auftretende Plateauphase. Dies ist Ausdruck einer höheren Affinität des  $^{125}\text{I}$ -HRS-3 gegenüber dem  $^{125}\text{I}$ -BimAb. Nach Lindmo liegen die Ursachen einer Plateaubildung unterhalb von 100% zum einem am Auftreten freier Isotope in der Präparation und zum anderen an den radioaktiv markierten Antikörpern, die nicht mehr immunologisch aktiv sind [Lindmo T et al. 1984].

Wie erwartet zeigte der radioaktiv markierte A9 keine Bindung gegenüber den CD30-positiven Zellen.

Zur Bestimmung der immunologisch reaktiven Fraktion (IR) wurden die Messwerte aus dem Lindmo-Test doppelt-invers aufgetragen.

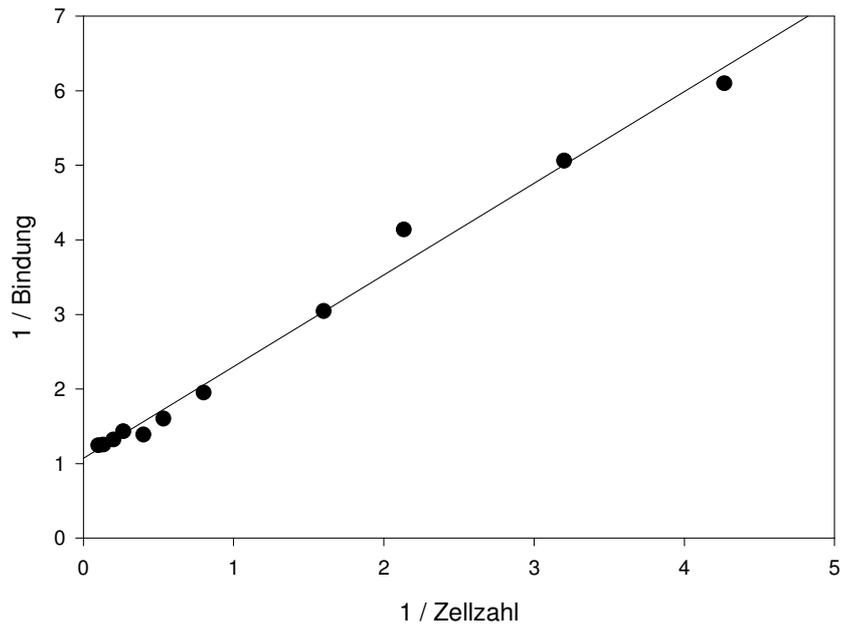


Abb. 9:  
Doppelt-inverse Darstellung nach Lindmo des  $^{125}\text{I-HRS-3}$  zur Bestimmung des immunologisch reaktiven Anteils (IR).

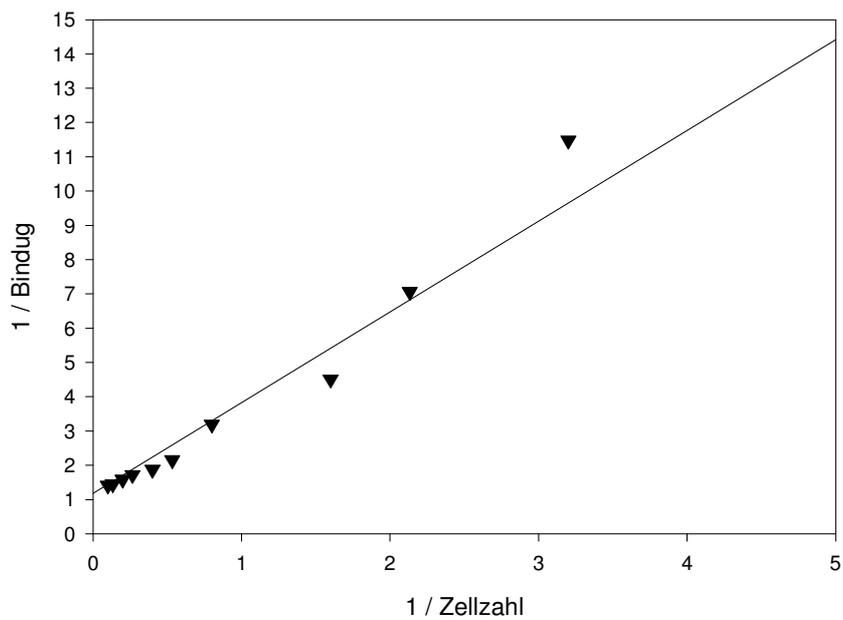


Abb. 10:  
Doppelt-inverse Darstellung nach Lindmo des  $^{125}\text{I-BimAb}$  zur Bestimmung des immunologisch reaktiven Anteils (IR).

Die IR-Werte der einzelnen Antikörper betragen:

$$^{125}\text{I-BimAb}: 1/1,176 = 0,8503$$

$$^{125}\text{I-HRS-3}: 1/1,074 = 0,931$$

Der IR-Wert kann als Maß des Bindungsverlustes nach der chemischen Markierung angesehen werden. Die IR-Werte lagen für alle Antikörper im Bereich zwischen 0,93 und 0,78.

#### 5.4 Scatchard-Test

Mit der Scatchard-Methode kann die Affinitätskonstante von radioaktiv markierten Antikörpern bestimmt werden. Hierzu wurde zu einer festen Anzahl an antigenpräsentierenden Zellen eine steigende Menge an Antikörpern zugesetzt. Nach Bestimmung des Anteils der gebundenen und nicht gebundenen, also freien Menge an Antikörpern, kann eine Scatchard-Graphik erstellt werden. Dabei wird die Konzentration der spezifisch gebundenen Antikörper auf der Abszisse und das Verhältnis zwischen spezifisch gebundenen und nicht-gebundenen Antikörpern auf der Ordinate aufgetragen. Durch die sich ergebenden Punkte wird eine Regressionsgerade gefällt. Die Steigung dieser Geraden entspricht dem negativen Wert der Assoziationskonstanten.

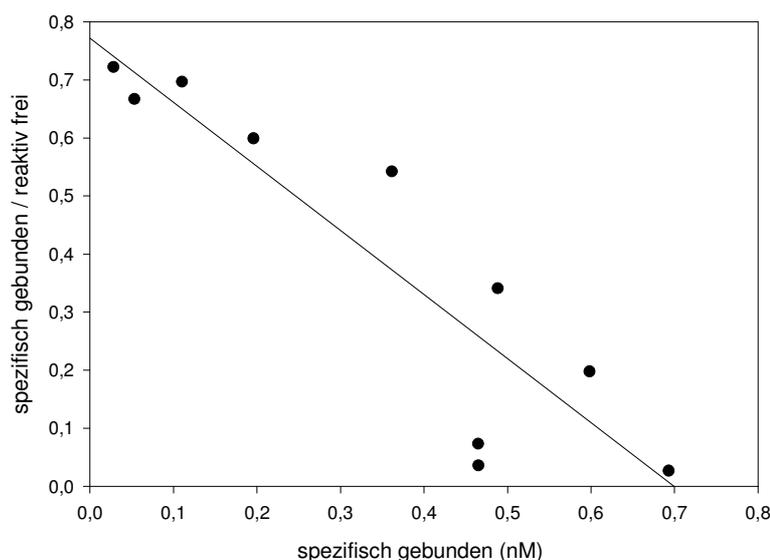


Abb. 11:

Darstellung nach Scatchard des  $^{125}\text{I-HRS-3}$  zur Bestimmung der  $K_A$ .

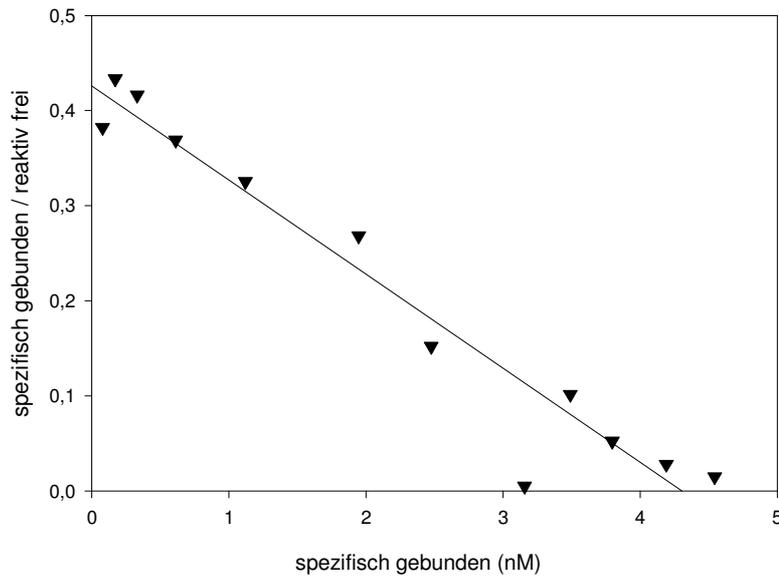


Abb. 12:

Darstellung nach Scatchard des  $^{125}\text{I}$ -BimAb zur Bestimmung der  $K_A$ .

Aus diesen Graphiken lässt sich die jeweilige  $K_A$  als Steigung der Geraden berechnen.

Die  $K_A$  beträgt für

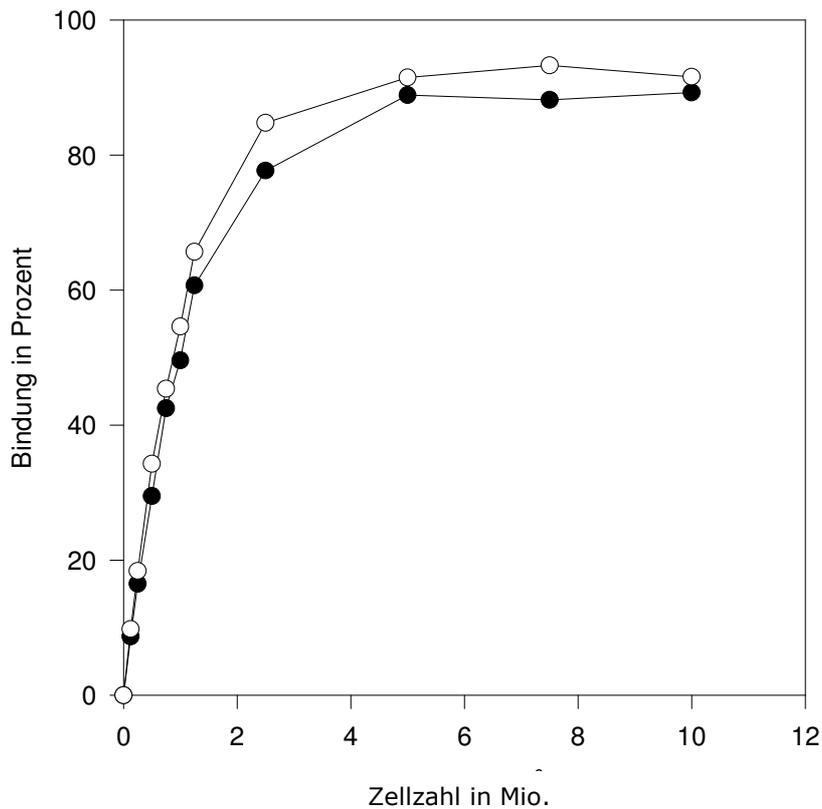
$$^{125}\text{I-HRS-3: } 1,08 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$$^{125}\text{I-BimAb: } 9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}.$$

Der  $^{125}\text{I-HRS-3}$  Antikörper ist 12fach affiner als der  $^{125}\text{I-BimAb}$  Antikörper.

### 5.5 Vergleich zwischen Jod- und Indium-markierten Antikörpern

Der Vergleich zwischen Jod- und Indium-markierten Antikörpern zeigte ein vergleichbares Verhalten und eine vergleichbare Affinität. Beispielhaft zeigt Abbildung 13 das nahezu identische Bindungsverhalten des  $^{125}\text{I-HRS-3}$  und des  $^{111}\text{In-HRS-3}$ . Sie stellt das Verhältnis der spezifisch gebundenen Antikörper im Bezug auf die eingesetzte Gesamtmenge als Funktion der steigenden Antigenmenge dar.



**Abb. 13:** Bindungsverhalten einer konstanten Menge  $^{125}\text{I}$ -HRS-3 (*schwarze Kreise*) oder  $^{111}\text{In}$ -HRS-3 (*weiße Kreise*) gegenüber einer steigenden Antigenmenge im direkten Vergleich. Grafik nach Lindmo.

### 5.6 Biodistribution der $^{125}\text{I}$ - und $^{111}\text{In}$ -markierten Antikörper *in-vivo*

In einem SCID-Maus-Modell wurde ein solitärer CD30-positiver Tumor und ein CD30-negativer Kontrolltumor etabliert. Für die erste Versuchsreihe der Biodistribution wurden die beiden Antikörper HRS-3 und BimAb initial mit  $^{125}\text{I}$  oder  $^{131}\text{I}$  markiert und in insgesamt 25 Versuchstiere injiziert. Zu den Zeitpunkten 4 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Injektion wurden jeweils 5 Tiere zur Untersuchung verwendet. In dieser ersten Versuchsreihe zeigte sich für beide Antikörper nur ein sehr geringer Tumoruptake. Die Daten dieser ersten Versuchsreihe werden nicht weiter dargestellt. Als Folge der ersten Versuchsreihe wurden die beiden Antikörper mit  $^{111}\text{In}$  markiert. Zur Kontrolle wurde jedem Tier zusätzlich  $^{125}\text{I}$ -markierter Antikörper appliziert. So bekamen 25 Tiere den jeweils  $^{111}\text{In}$ - und  $^{125}\text{I}$ -HRS-3 und 25 Tiere  $^{111}\text{In}$ - und  $^{125}\text{I}$ -BimAb injiziert. Zu den Zeitpunkten 4 h, 24 h, 48 h, 72 h und 144 h wurden jeweils 5 Tiere aus jeder Gruppe zur Untersuchung entnommen. Die Verlängerung von 96 Stunden auf 144 Stunden wurde aufgrund der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe vorgenommen.

In der 4h  $^{111}\text{In}/^{125}\text{I}$ -HRS-3 Gruppe verstarb eine Maus innerhalb der ersten Stunden, so dass zur Auswertung dieser Gruppe nur 4 Mäuse zur Verfügung standen. In der 144 h  $^{111}\text{In}/^{125}\text{I}$ -HRS-3 Gruppe bildete sich in einer Maus kein abgrenzbarer L540-Tumor. Alle anderen Gewebe dieser Maus konnten in die Auswertung genommen werden. Zu allen anderen Zeitpunkten konnten wie geplant 5 Mäuse ausgewertet werden.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Tiere narkotisiert und getötet. Die Organe wurden entnommen, gewogen und die Aktivität gemessen. Zur Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls wurde jede Probe mit einer Referenzprobe verglichen. Die Angabe der Werte erfolgte in Prozent der injizierten Dosis (ID) pro Gramm Gewebe (= % ID / g).

Die Ergebnisse der Biodistribution der  $^{111}\text{In}$ - /  $^{125}\text{I}$ -markierten Antikörper sind in den folgenden Abbildungen graphisch dargestellt.

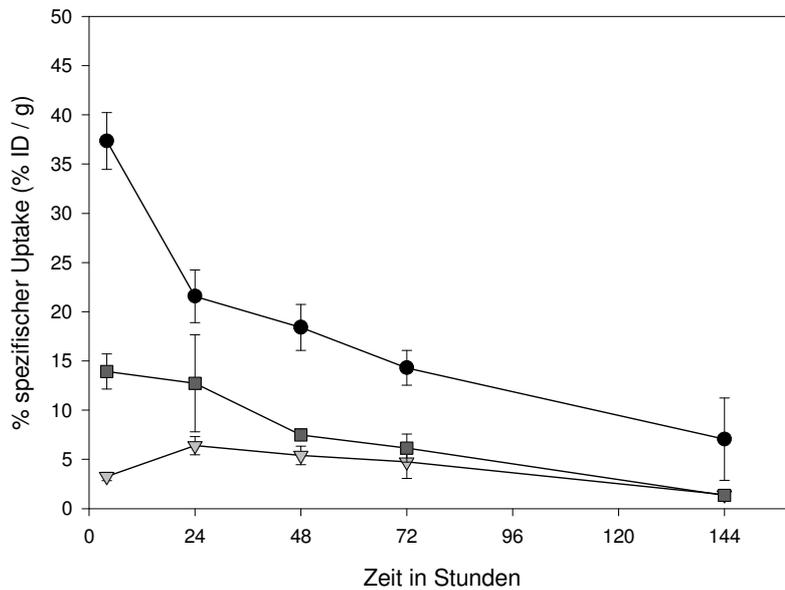


Abb. 14:  
Konzentration des  $^{125}\text{I}$ -HRS im Blut (**schwarze Kreise**), im L540CY-Tumor (**hellgraue Dreiecke**) und im SW1222-Tumor (**dunkelgraue Quadrate**) über dem Zeitraum von insgesamt 144 Stunden.

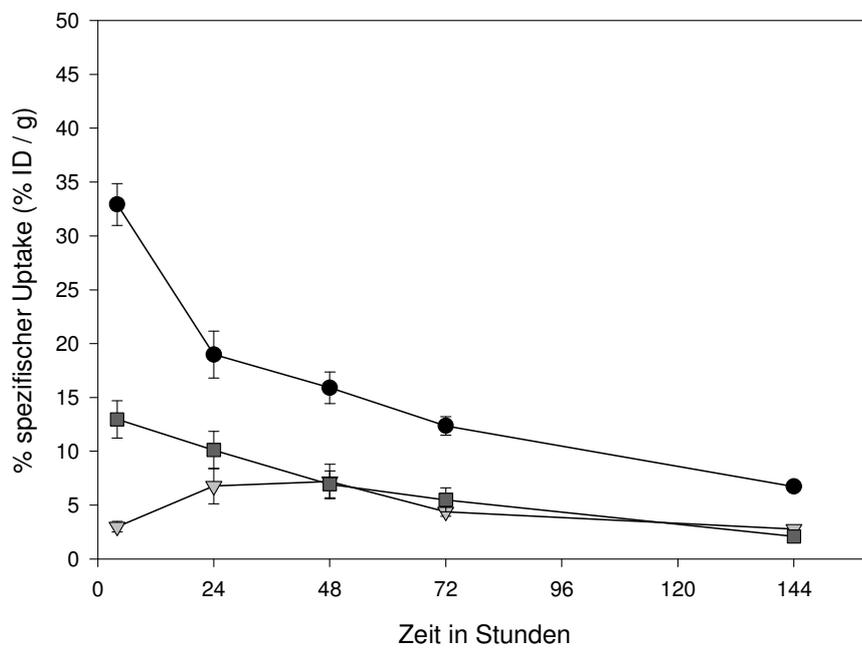


Abb. 15:  
Konzentration des  $^{125}\text{I}$ -BimAb im Blut (**schwarze Kreise**), im L540CY-Tumor (**hellgraue Dreiecke**) und im SW1222-Tumor (**dunkelgraue Quadrate**) über dem Zeitraum von 144 Stunden.

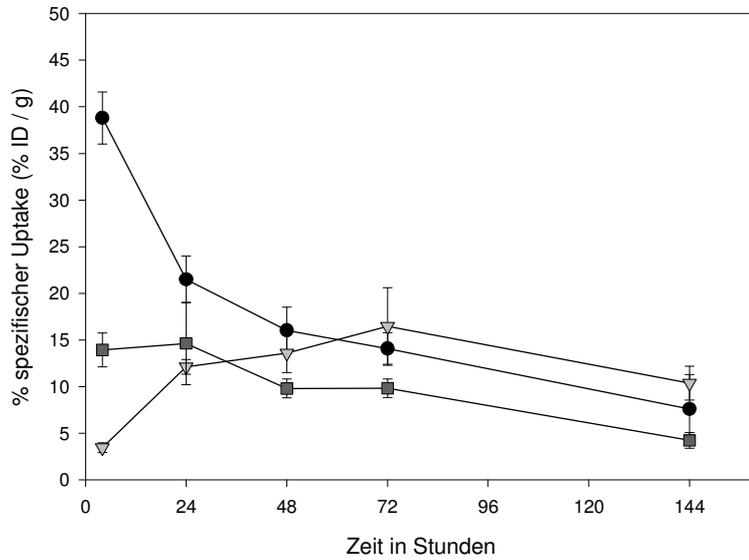


Abb. 16: Konzentration des <sup>111</sup>In-HRS-3 im Blut (**schwarze Kreise**), im L540CY-Tumor (**hellgraue Dreiecke**) und im SW1222-Tumor (**dunkelgraue Quadrate**) über dem Zeitraum von 144 Stunden.

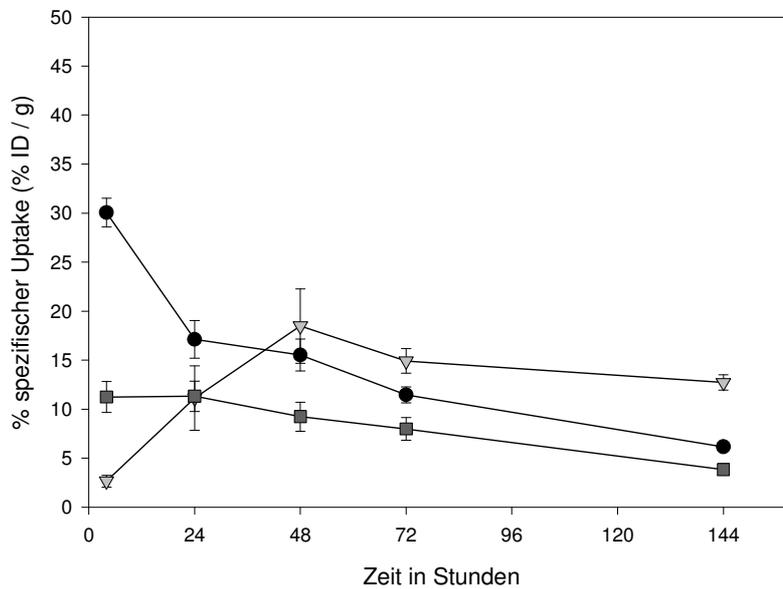


Abb. 17: Konzentration des <sup>111</sup>In-BimAb im Blut (**schwarze Kreise**), im L540CY-Tumor (**hellgraue Dreiecke**) und im SW1222-Tumor (**dunkelgraue Quadrate**) über dem Zeitraum von 144 Stunden.

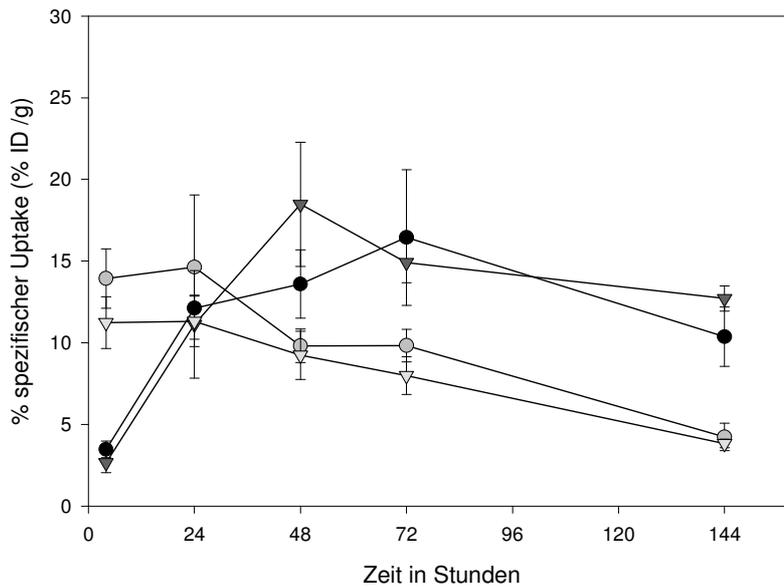


Abb. 18:

Vergleich des Antikörperuptakes im L540CY-Tumor und im SW1222-Tumor über 144 Stunden der Antikörper <sup>111</sup>In-HRS-3 und <sup>111</sup>In-BimAb.

<sup>111</sup>In-HRS-3 im L540CY-Tumor (**schwarze Kreise**), <sup>111</sup>In-BimAb im L540CY-Tumor (**dunkelgraue Dreiecke**), <sup>111</sup>In-HRS-3 im SW1222-Tumor (**graue Kreise**), <sup>111</sup>In-BimAb im SW1222-Tumor (**hellgraue Dreiecke**).

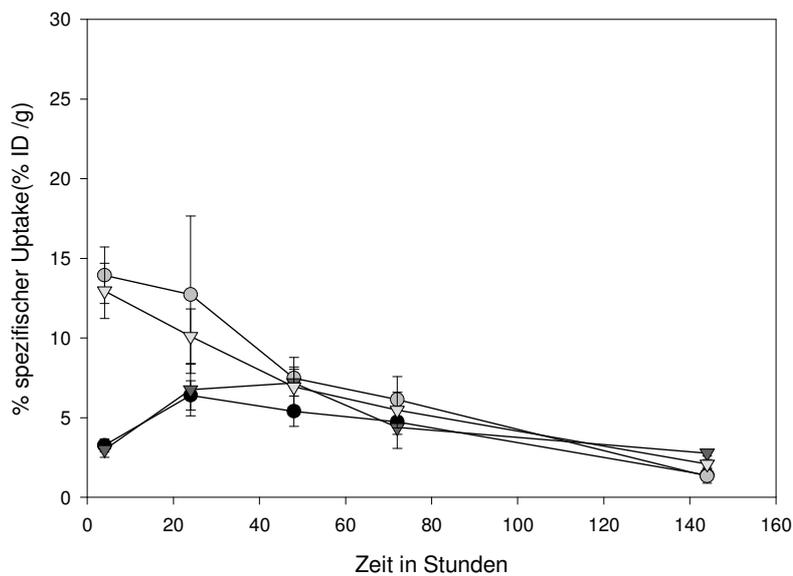
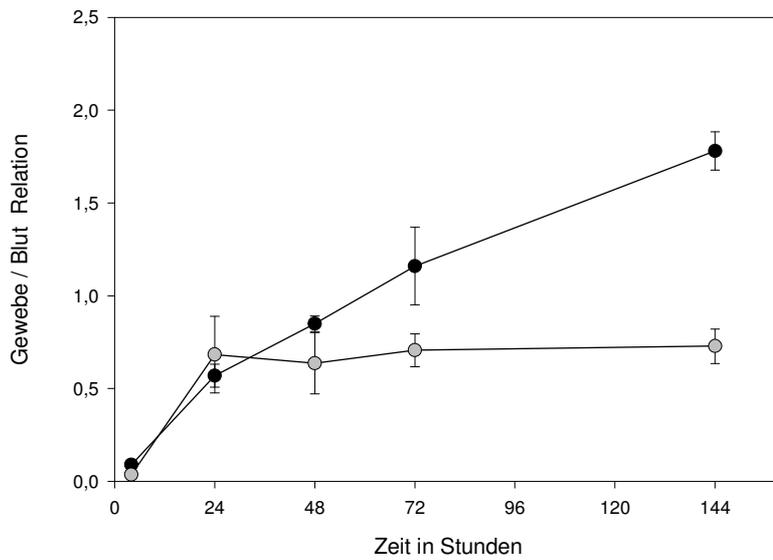


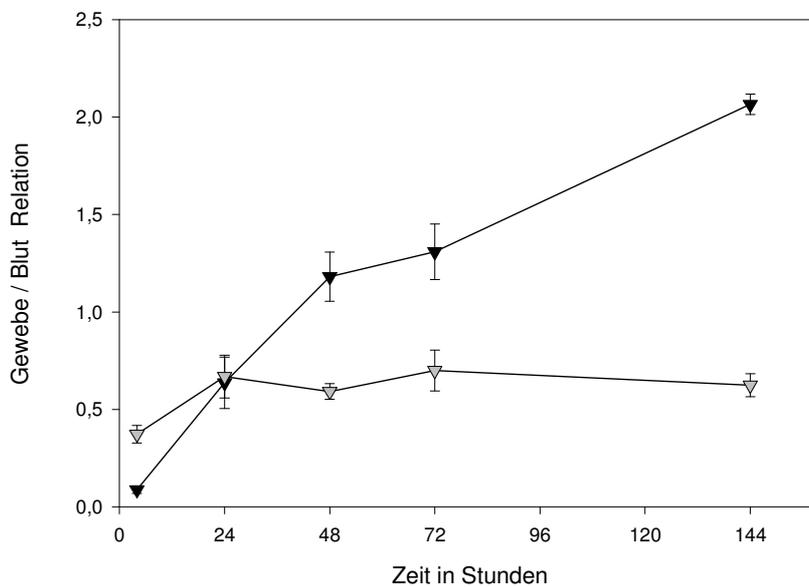
Abb. 19:

Vergleich des Antikörperuptakes im L540-Tumor und im SW1222-Tumor über 144 Stunden der Antikörper <sup>125</sup>I-HRS-3 und <sup>125</sup>I-BimAb.

<sup>125</sup>I-HRS-3 im L540CY-Tumor (**schwarze Kreise**), <sup>125</sup>I-BimAb im L540CY-Tumor (**dunkelgraue Dreiecke**), <sup>125</sup>I-HRS-3 im SW1222-Tumor (**graue Kreise**), <sup>125</sup>I-BimAb im SW1222-Tumor (**hellgraue Dreiecke**).



**Abb. 20:** Darstellung der relativen Verteilung des  $^{111}\text{In-HRS-3}$  im Blut und im Tumorgewebe. Verteilung im L540CY-Tumorgewebe (**schwarze Kreise**) und SW1222-Tumorgewebe (**graue Kreise**) über 144 Stunden.



**Abb. 21:** Darstellung der relativen Verteilung des  $^{111}\text{In-BimAb}$  im Blut und im Tumorgewebe. Verteilung im L540CY-Tumorgewebe (**schwarze Kreise**) und SW1222-Tumorgewebe (**graue Kreise**) über 144 Stunden.

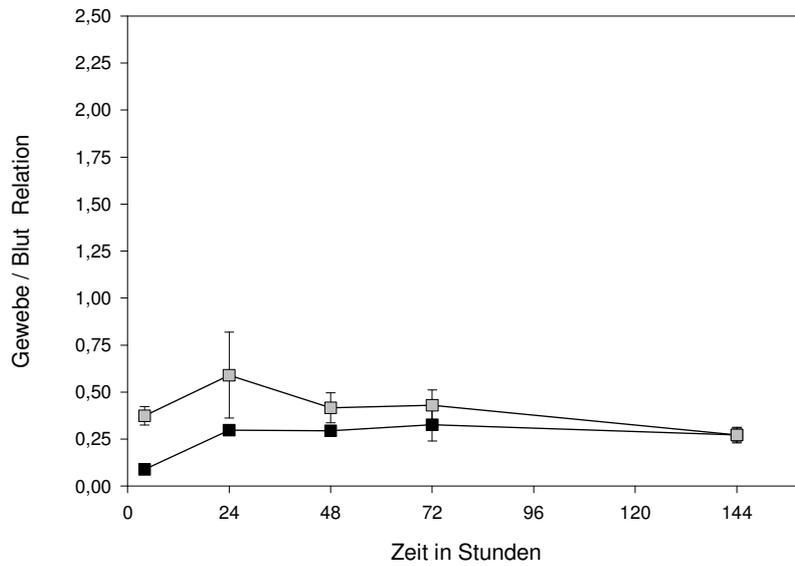


Abb. 22:  
Darstellung der relativen Verteilung des  $^{125}\text{I-HRS-3}$  im Blut und im Tumorgewebe. Verteilung im L540CY-Tumorgewebe (**schwarze Kreise**) und SW1222-Tumorgewebe (**graue Kreise**) über 144 Stunden.

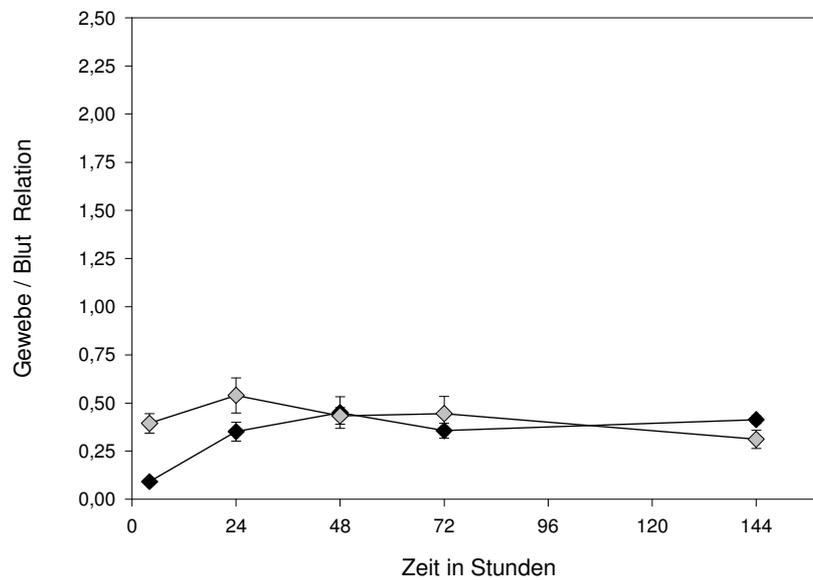
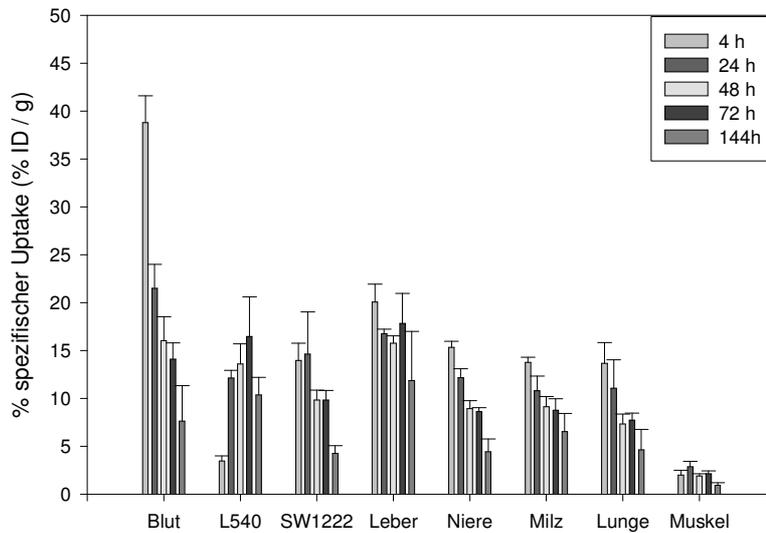
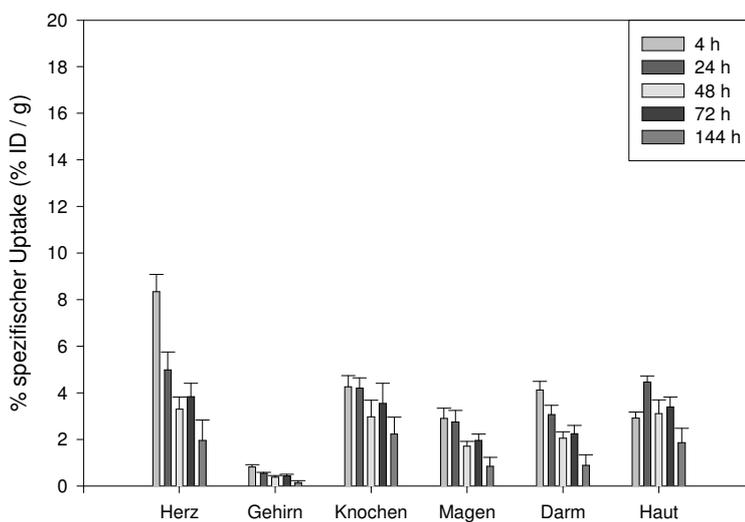


Abb. 23:  
Darstellung der relativen Verteilung des  $^{125}\text{I-BimAb}$  im Blut und im Tumorgewebe. Verteilung im L540CY-Tumorgewebe (**schwarze Kreise**) und SW1222-Tumorgewebe (**graue Kreise**) über 144 Stunden.



**Abb. 24a:**

Darstellung der Verteilung des  $^{111}\text{In-HRS-3}$  in den verschiedenen Geweben. L540 bezeichnet den CD30-positiven-Tumor, SW1222 bezeichnet den CD30-negativen-Kontrolltumor. Für jedes Gewebe wurde der spezifische Uptake für die Zeitpunkte 4h, 24h, 48h, 72h und 144h einzeln als Säule dargestellt.



**Abb. 24b:**

Darstellung der Verteilung des  $^{111}\text{In-HRS-3}$  in den verschiedenen Geweben. Für jedes Gewebe wurde der spezifische Uptake für die Zeitpunkte 4h, 24h, 48h, 72h und 144h einzeln als Säule dargestellt.

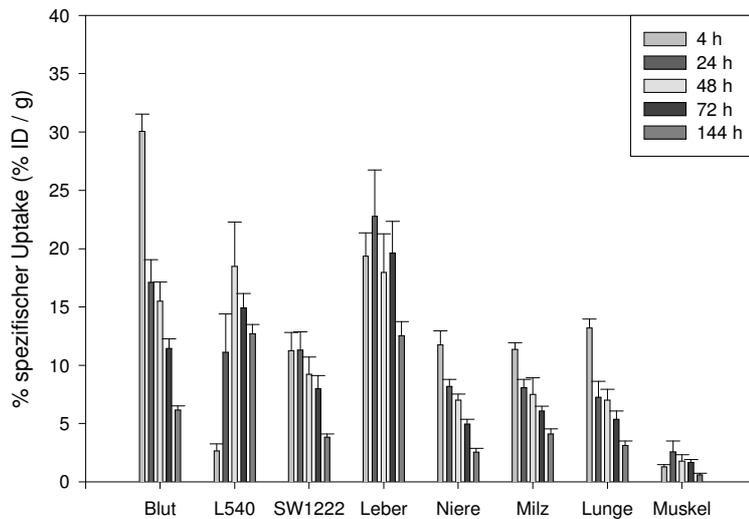


Abb. 25a:

Darstellung der Verteilung des  $^{111}\text{In-BimAb}$  in den verschiedenen Geweben. L540 bezeichnet den CD30-positiven Tumor, SW1222 bezeichnet den CD30-negativen-Kontrolltumor. Für jedes Gewebe wurde der spezifische Uptake für die Zeitpunkte 4h, 24h, 48h, 72h und 144h einzeln als Säule dargestellt.

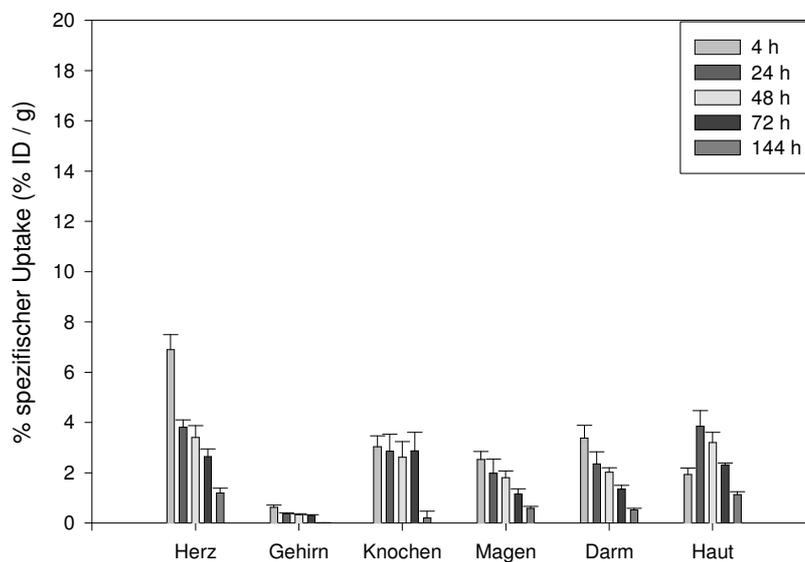


Abb. 25b:

Darstellung der Verteilung des  $^{111}\text{In-BimAb}$  in den verschiedenen Geweben. Für jedes Gewebe wurde der spezifische Uptake für die Zeitpunkte 4h, 24h, 48h, 72h und 144h einzeln als Säule dargestellt.

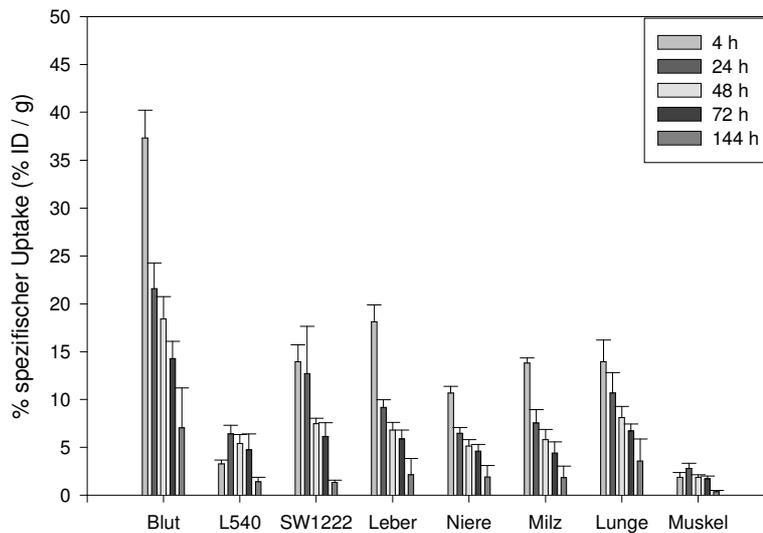


Abb. 26a:

Darstellung der Verteilung des  $^{125}\text{I-HRS-3}$  in den verschiedenen Geweben. L540 bezeichnet den CD30-positiven-Tumor, SW1222 bezeichnet den CD30-negativen-Kontrolltumor. Für jedes Gewebe wurde der spezifische Uptake für die Zeitpunkte 4h, 24h, 48h, 72h und 144h einzeln als Säule dargestellt.

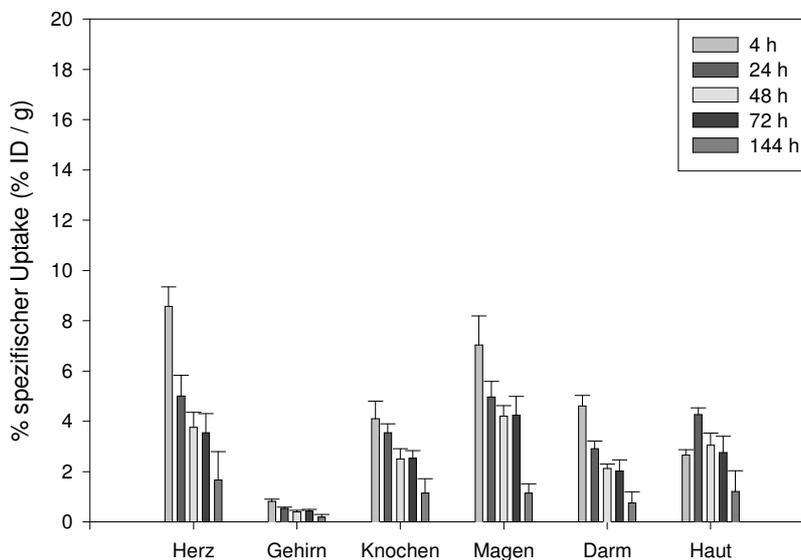


Abb. 26b:

Darstellung der Verteilung des  $^{125}\text{I-HRS-3}$  in den verschiedenen Geweben. Für jedes Gewebe wurde der spezifische Uptake für die Zeitpunkte 4h, 24h, 48h, 72h und 144h einzeln als Säule dargestellt.

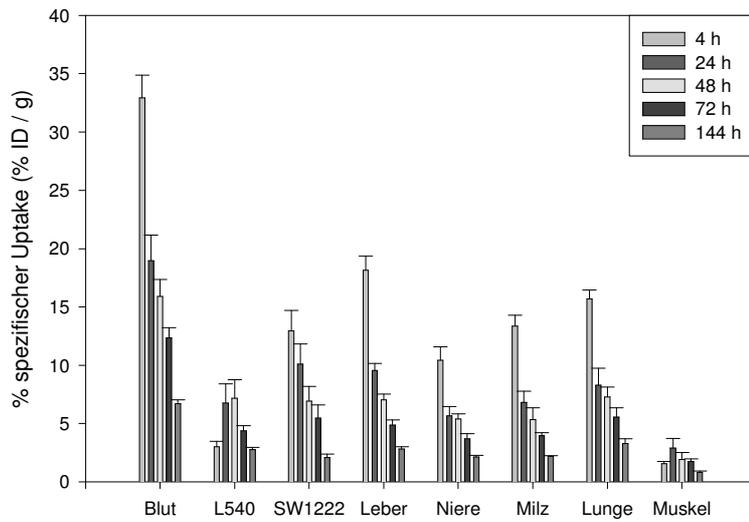


Abb. 27a:

Darstellung der Verteilung des  $^{125}\text{I}$ -BimAb in den verschiedenen Geweben. L540 bezeichnet den CD30-positiven Tumor, SW1222 bezeichnet den CD30-negativen Kontrolltumor. Für jedes Gewebe wurde der spezifische Uptake für die Zeitpunkte 4h, 24h, 48h, 72h und 144h einzeln als Säule dargestellt.

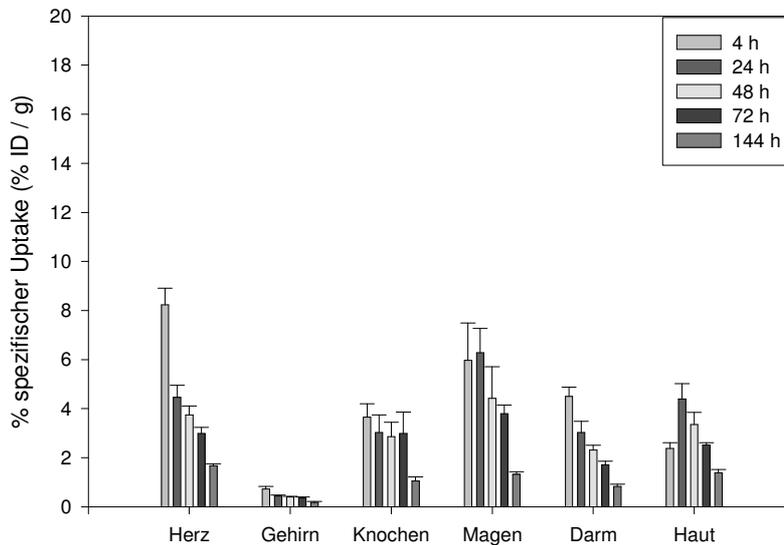


Abb. 27b:

Darstellung der Verteilung des  $^{125}\text{I}$ -BimAb in den verschiedenen Geweben. Für jedes Gewebe wurde der spezifische Uptake für die Zeitpunkte 4h, 24h, 48h, 72h und 144h einzeln als Säule dargestellt.

Die Kinetiken der Antikörper  $^{125}\text{I}$ -HRS-3 und  $^{125}\text{I}$ -BimAb im Blut, im CD30-positiven L540CY-Tumor und im CD30-negativen SW1222-Tumor werden in den Abbildungen 14 und 15 beschrieben. Innerhalb der ersten 24 bzw. 48 Stunden zeigten beide Antikörper eine geringe Zunahme im Gewebe des CD30-positiven L540CY-Tumors bis auf maximal  $7,18 \pm 1,58$  % ID/g (HRS 48 h) bzw.  $6,39 \pm 0,93$  % ID/g (BimAb 24 h). Der Uptake beider  $^{125}\text{I}$ -Antikörper war zu keinem Zeitpunkt höher als im SW1222 Tumor (Abb. 19).

Die  $^{111}\text{In}$ -markierten Antikörper zeigten gegenüber den  $^{125}\text{I}$ -markierten Antikörpern einen deutlichen Uptake im CD30-positiven L540CY-Tumor. Der Peak für den elterlichen anti-CD30  $^{111}\text{In}$ -HRS-3 liegt mit  $16,44 \pm 4,14$  % ID/g nach 72 Stunden; der Peak für den bispezifischen antiCD16/antiCD30  $^{111}\text{In}$ -BimAb liegt mit  $18,47 \pm 3,81$  % ID/g nach 48 Stunden. Der Unterschied ist nicht signifikant. Zu keinem Zeitpunkt ergab sich ein signifikanter Unterschied des Tumouruptakes für den  $^{111}\text{In}$ -HRS-3 gegenüber dem  $^{111}\text{In}$ -BimAb im CD30-positiven L540CY-Tumor.

Der Uptake der  $^{111}\text{In}$ -markierten Antikörpern im CD30-positiven L540CY-Tumor lag zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden signifikant über dem Uptake im CD30-negativen SW1222-Tumor, wie dies in Abbildung 18 zur Darstellung kommt. Zum Zeitpunkt 144 Stunden verfehlte der  $^{111}\text{In}$ -HRS-3 nur knapp das Signifikanzniveau. Zu diesem Zeitpunkt standen nur vier L540CY-Tumore und fünf SW1222-Tumore zur Verfügung. Der Uptake im L540-Tumor des  $^{111}\text{In}$ -BimAb lag auch bei 144 Stunden signifikant über dem Uptake im SW1222-Tumor. Die Kinetik des Antikörperuptakes in den SW1222-Kontrolltumoren war vergleichbar mit der Kinetik in den Organen.

Der Uptake an  $^{111}\text{In}$ -markierten Antikörper war bis zu 3 mal höher als der für  $^{125}\text{I}$ -markierte und erreichte eine statistische Signifikanz von  $p = < 0,01$ . Als wichtigstes Ergebnis stellte sich kein signifikanter Unterschied in der Biodistribution des  $^{111}\text{In}$ -bispezifischen Antikörpers BimAb im Vergleich zum elterlichen  $^{111}\text{In}$ -anti-CD30-Antikörper HRS-3 dar.

Das Verhältnis zwischen Blut und Tumorgewebe für den elterlichen  $^{111}\text{In}$ -HRS-3 Antikörper und den  $^{111}\text{In}$ -BimAb Antikörper stieg für beide Antikörper bis zum letzten Messzeitpunkt am sechsten Tag kontinuierlich an. Für den  $^{111}\text{In}$ -HRS-3 lag das Verhältnis bei  $1,78 \pm 0,104$  % ID/g, für den  $^{111}\text{In}$ -BimAb lag es bei  $2,065 \pm 0,052$  % ID/g. Das Verhältnis zwischen SW1222-Tumorgewebe und Blut erreichte nach 24 Stunden einen nahezu konstanten Wert mit etwa 0,7 für beide Antikörper. Im Detail betrug das Verhältnis  $0,683 \pm 0,21$  % ID/g für den  $^{111}\text{In}$ -HRS-3 und  $0,668 \pm 0,11$  % ID/g für den  $^{111}\text{In}$ -BimAb nach 24 Stunden. In den Abbildungen 22 und 23 wurden zur Vervollständigung das Tumor/Blut-Verhältnis für die  $^{125}\text{I}$ -markierten Antikörper dargestellt. Die Abbildungen 24a bis 27b beschreiben detailliert den Uptake der  $^{111}\text{In}$ - und  $^{125}\text{I}$ -markierten Antikörper im Blut und in den Geweben CD30-positiver L540CY-

Tumor, CD30-negativer SW-1222 Tumor sowie Leber, Niere, Milz, Lunge, Muskel, Herz, Gehirn, Magen, Darm und Haut.

Der Anteil der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) betrug in allen Normalgeweben weniger als 23%. Wie aus den Abbildungen 24a und 25a zu entnehmen ist, zeigt sich für beide <sup>111</sup>In-markierte Antikörper schon nach 4 Stunden ein relativ hoher Uptake in der Leber, der erst nach 72 Stunden deutlich abnahm. Zudem zeigte sich für die Verteilung des Indium im Knochen ein insgesamt niedrigerer Uptake mit etwa 4 % ID/g, der auf diesem Niveau bis zu 72 Stunden relativ stabil blieb. In den anderen Organen zeigte sich eine Reduktion des Uptakes spätestens nach 24 Stunden über die weitere Beobachtungszeit.

### **5.7 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse**

Die Antikörper HRS-3 (bivalenter monoklonaler elterlicher anti-CD30-Antikörper) und BimAb (monovalenter bispezifischer anti-CD16/antiCD30-Antikörper) lassen sich effizient mit <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I und <sup>111</sup>In markieren. Die Antikörper HRS-3 und BimAb zeigten sowohl vor als auch nach der radioaktiven Markierung einen deutlichen Affinitätsunterschied gegenüber dem CD30-Antigen. <sup>111</sup>In-markierte Antikörper zeigen überlegene Targeting-Eigenschaften in einem standardisierten SCID-Mausmodell. Beide Antikörper zeigten einen ausgezeichneten Uptake in CD30-positiven Tumoren. Trotz des Affinitätsunterschiedes der beiden Antikörper zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Tumoruptake der beiden Antikörper (max. Uptake 16,5 % ± 4,2 % versus 18,4 % ± 3,8 % injizierte Dosis/Gramm Gewebe).