



MD 1374 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1374<sup>(13)</sup> G2

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 07 K 16/28;  
C 12 N 5/20;  
A 61 K 39/395;  
C 07 K 14/705;  
A 61 P 35/00

(12)

BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: 96-0296 (22) Data depozit: 1995.01.30 (31) Nr.: 108501 (32) Data: 1994.01.31 (33) Țara: IL</p>	<p>(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 1999.12.31, BOPI nr. 12/99 (85) 1996.07.29 (86) PCT/US95/01137, 1995.01.30 (87) WO 95/20605, 1995.08.03</p>
<p>(71) Solicitant: MOR RESEARCH APPLICATION LTD, IL (72) Inventatori: HARDY, Britta, IL; NOVOGRODSKY, Avraham, IL (73) Titular: MOR RESEARCH APPLICATION LTD, IL (74) Mandatar: Socolova Sofia, MD</p>	

(54) Anticorpi monoclonali imunostimulatori, procedeu de obținere a acestora, linii celulare, metodă de tratare a maladiilor și compoziție farmaceutică

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la medicină și anume la imunoterapie.

Esența invenției constă în aceea că anticorpus monoclonal imunostimulator sau fragmentul lui legand un antigen, carea legandu-se cu celulele B limfoblastoide, induce proliferarea și activarea limfocitelor sângelui periferic, asigură efectul anti-tumoral. Anticorpus propus se obține prin imunizarea animalului cu un imunogen selectat din grupul constituit din celule B limfoblastoide, celule B limfoblastoide lizate sau preparate membranoase din ele, dezvoltarea ulterioară a reacției imune la animalul imunizat, extragerea limfocitelor B, creșterea, imortalizarea și selectarea liniilor celulare, care secretează anticorpus revendicat. De

2

asemenea, se declară linia celulară a hibridomului, depozitat în CNCM sub nr. 1-1397. Se propune o metodă de tratare a maladiilor, care include administrarea unei cantități eficiente de anticorpus monoclonal propus. Se revendică o compoziție farmaceutică, ce include în calitate de ingredient activ anticorpus monoclonal imunostimulator indicat. În plus, compoziția farmaceutică poate suplimentar să conțină un agent care sporește activitatea limfocitelor citotoxice.

Rezultatul este proliferarea și activarea limfocitelor, asigurând efectul antitumoral.

Revendicări: 18

Figuri: 10

5

MD 1374 G2

## MD 1374 G2

3

### Descriere:

Invenția se referă la medicină și anume la imunoterapie și este destinată tratării tumorilor.

5 In tratamentul tumorilor cel mai frecvent se aplică intervenția chirurgicală, radioterapia și chimioterapia. În ultimii ani a fost propus un alt tratament terapeutic care are la bază folosirea modificatorilor răspunsului biologic (BRM). Folosirea BRM include citokine principale (interleukin-2 (IL-2) și interferon- $\alpha$  (INF-  $\alpha$ ), celule mononucleare active (celulele killer activate cu limfokin (LAK)) și anticorpi. BRM acționează în două direcții: direct, asupra tumorilor, și indirect, prin creșterea mecanismelor citotoxice și imunologice specifice sau nespecifice.

10 Se cunoaște că diverși anticorpi monoclonali (mAbs), capabili a se lega cu determinanții de pe suprafața celulelor T, produc proliferarea, activarea și diferențierea acestor celule [1]. Legarea mAbs orientați contra complexului CD3/TCR, pe celule T [2-4], legarea mAbs orientați la receptorii CD2 ai antigenului pe celule T [5], cum și legarea ambelor tipuri de anticorpi la celulele T, a fost demonstrată prin proliferarea celulelor T, expresia IL-2 a receptorului și producerea IL-2 în celulele T rezultată în creșterea proceselor citolitice în aceste celule. Anticorpii monoclonali anti CD3 s-a văzut că inițiază o activitate antitumorală *in vivo* în modelul animal [6-7].

15 Mai sunt cunoscuți alți diverși anticorpi monoclonali orientați contra antigenilor limfocitelor T, care după legarea cu celulele produc o astfel de activare ca cea a mAbs orientați contra CD5 [8], CD69 [9] și CD28 [10, 11]. Anticorpii monoclonali anti-CD28 diminuează creșterea melanomului murin, deși eliminarea completă a tumorilor la șoareci nu a avut succes [12].

20 Anticorpii monoclonali orientați contra liniei de celule B limfoblastoide umane numite Daudi stimulează limfocitele murine și celulele T periferice umane [13].

Actualmente folosirea BRM nu a atins un succes clinic substanțial din cauza toxicității și efectelor adverse. De asemenea, a fost efectuată imunizarea activă anticancer, dar s-a constatat a fi neeficientă. Unii anticorpi monoclonali (mAbs) au fost evaluați pentru utilizare în diagnosticul și tratamentul cancerului, dar eficacitatea lor deocamdată nu a fost confirmată la nivelul procedurilor curative tradiționale la pacienți cu cancer.

25 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea unui efect antitumoral stabil și elaborarea preparatelor antitumorale.

30 Această problemă se rezolvă prin faptul că este propus un anticorp monoclonal imunostimulator sau fragmentul lui legand un antigen, care, legandu-se cu celulele B limfoblastoide, induce proliferarea și activarea limfocitelor sângelui periferic, asigură efectul antitumoral. Anticorpii imunostimulatori propus sau fragmentul lui, legând antigenul, este obținut prin imunizarea animalului cu un imunogen din grupul de celule B limfoblastoide, celule B limfoblastoide lizate sau preparate membranoase din acestea, dezvoltarea ulterioară a reacției imune la animalul imunizat, extragerea limfocitelor B, creșterea, imortalizarea și selectarea liniilor celulare care secreteză anticorpii solicitați. De asemenea, se solicită linia celulară a hibridomului, depozitat în CNCM sub nr. 1-1397 și anticorpii monoclonali imunostimulatori secretați de acesta și anticorpii monoclonali imunostimulatori secretați de linia indicată a hibridomului. Este propusă o metodă de tratare a proceselor tumorale, care include administrarea unei cantități eficiente de anticorpi monoclonali imunostimulatori propus. Se solicită o compoziție farmaceutică, ce include în calitate de ingredient activ anticorpii monoclonali imunostimulatori, care legandu-se cu celulele B limfoblastoide induce proliferarea și activarea limfocitelor sângelui periferic și asigură un efect antitumoral, precum și o umplutură fiziologic acceptabilă. În calitate de ingredient activ compoziția farmaceutică poate conține și un anticorp monoclonal imunostimulator, posedând caracteristicile anticorpii monoclonali secretați de linia celulară a hibridomului, depozitat în CNCM sub nr. 1-1397. În plus, compoziția farmaceutică poate conține suplimentar un agent care sporește activitatea limfocitelor citotoxice aditiv sau sinergic.

40 Pentru obținerea mAbs, conform invenției, anticorpii selectați prin metoda descrisă, se supun selecției ulterioare pentru alegerea anticorpilor cu efect antitumoral. Pentru selectarea acestora poate fi folosit un model tipic de animal cu cancer. Mai mult ca atât, efectul antitumoral poate fi studiat în diferite modele *in vitro*. Ca model, de exemplu, poate fi folosit orice animal de laborator, la care poate fi indus cancerul, și anume șoarecii, care sunt preferabili, întrucât aceste modele permit dezvoltarea tumorilor de origine umană. Exemple de modele animale tip murin sunt șoarecii imunizați, de exemplu, șoarecii SCID sau șoarecii golași cărora li s-a injectat sau implantat celule tumorale sau țesut obținut de la pacienți cu cancer. În această selecție, proprietatea anticorpii monoclonali mAb sau tratat cu mAb de a reduce mărimile tumorii, de a prolunga timpul vieții etc., se determină în comparație cu martorul (animal care a fost infectat cu celule tumorale, dar netratat cu mAb sau tratat cu mAb nesensibil).

## MD 1374 G2

4

5 Selecția poate include testarea capacității mAbs de a preveni cancerul la modelul corespunzător. De exemplu, animalele predispuse genetic la dezvoltarea cancerului, pot fi injectate cu mAbs, apoi incidența tumorii și mortalitatea la lotul tratat cu mAbs poate fi comparat cu lotul martor. Fiind preferabilă folosirea animalelor predispuse genetic, capacitatea mAbs de a preveni cancerul poate fi testată și la diverse alte animale tratate cu mAbs până la administrarea celulelor maligne.

10 Pentru obținerea acestui efect antitumoral, se administrează o doză eficientă de mAbs, conform invenției. Termenul “doză eficientă” reprezintă o cantitate de anticorpi monoclonali, după administrarea căreia se va obține efectul terapeutic. Doza eficientă este necesară pentru obținerea efectului terapeutic, iar rezultatul depinde și de alți factori: tipul tumorii, gravitatea stării bolnavului (stadiul cancerului), combinarea mAbs cu alți agenți, cu care ei acționează aditiv sau sinergetic (vezi în continuare).

15 Obținerea unei linii celulare imortalizate, secretând mAbs, conform invenției, poate fi efectuată prin procedee cunoscute *per se*, așa ca: conjugarea liniei imortalizate cu o cultură de hibridom; transformarea EBV; construirea liniei celulare cu ajutorul ingineriei genetice, adică linia celulară CHO, care poate fi obținută prin diferite procedee cunoscute; *per se* etc. În general, procedeul de obținere a unor linii celulare imortalizate secretând anticorpi monoclonali, actualmente prezintă o procedură de rutină cunoscută specialiștilor și descrierea ei este dată după prezentul studiu.

20 Folosirea imunogenului de origine umană în procesul sintezei mAbs pentru tratarea omului este specifică. Însă, uneori este o reactivitate încrucișată între specii și, ocazional, este posibilă folosirea la oameni a mAbs obținuți prin imunizarea cu imunogen de derivație neumană (de la primat).

25 Anticorpul, conform invenției, prezintă anticorpi monoclonali, care pot fi anticorpi IgG sau IgM, fragmente Fab ale acestor anticorpi, fragmente F(ab')<sub>2</sub>, anticorpi într-un singur lanț etc. Mai mult decât atât, anticorpul de origine neumană, adică murină, pot fi “umanizați” prin diferite metode ale ingineriei genetice (anticorp “umanizat” e un anticorp, ale cărui porțiuni majore au fost înlocuite cu porțiuni de origine umană).

Anticorpul, conform invenției, fiind folosiți pentru diferite indicații terapeutice, în varianta preferabilă a invenției au fost folosiți pentru tratarea cancerului. Anticorpul monoclonal, conform invenției, sunt activi în reducerea oncogenității varietăților de tumoare.

30 Conform prezentei invenții, linia celulară a hibridomului a fost depozitată în Colecția Națională de Culturi de Microorganisme (CNCM), (Institutul Pasteur, 25, Rue de Doctor Roux, 75724, Paris, Codex 15) sub nr. depozit 1-1397 (28 ianuarie 1994).

Celulele acestei linii sunt numite uneori celule BAT-1 și anticorpul monoclonal mAbs BAT-1.

35 Folosirea anticorpilor monoclonali cu caracteristici de mAb BAT-1, în special a mAbs BAT-1 propriu-zis constituie varianta preferențială a invenției.

40 Anticorpul monoclonal BAT-1 au fost selectați pe baza legării lor cu celulele B limfoblastoide umane ale liniei Daudi. S-a determinat că anticorpul monoclonal BAT-1 se pot lega cu substanțe proteice (liant de proteină BAT-1), care are greutate moleculară de cca 48-50 K Dalton, calculată conform SDS-PAGE.

45 Liantul de proteină BAT-1 constituie un alt aspect al invenției prezente. Liantul de proteină BAT-1 poate fi izolat prin diferite metode cunoscute *per se* cu folosirea mAb, conform invenției. Liantul de proteină BAT-1 mai poate fi utilizat și pentru imunizarea animalelor, de la care pot fi obținuți mAbs, conform invenției.

Prezenta invenție, de asemenea, prevede o compoziție farmaceutică ce include în calitate de ingredient activ o cantitate eficientă de mAbs, conform invenției, și o umplutură fiziologic acceptabilă.

50 Următorul aspect al invenției este o metodă de tratare a bolilor sau dereglărilor, în special a cancerului, prin administrarea unei cantități eficiente de mAbs, conform invenției. Administrarea de mAbs se efectuează, de regulă, pe cale parenterală, anume intravenos (i.v.), intraperitoneal (i.p.) sau intramuscular (i.m.). Umplutura fiziologic acceptabilă pentru administrare, poate constitui o soluție cunoscută *per se*, cum este o soluție salină sau soluție fiziologică.

55 Anticorpul monoclonal, conform invenției, după cum s-a indicat mai sus, s-au manifestat activ în reducerea oncogenității diferitelor tumori. Eficacitatea anticorpilor monoclonali, conform invenției, în reducerea oncogenității se corelează cu abilitatea lor de a induce activitatea citotoxică a limfocitelor. În scopul ridicării acestei activități, se recomandă administrarea mAbs cu alți agenți, care împreună cu mAbs pot avea efect aditiv sau sinergetic. Exemplele includ diferite citokinine așa ca: IL-1 (interleukin-1), IL-2, IL-6 și IFN- $\alpha$  (Interferon- $\alpha$ ).

Anticorpul monoclonal, conform invenției, pot fi folosiți în tratamentul diferitelor boli, altele decât cancerul, în care ridicarea activității citotoxice a sistemului imun poate fi stimulată cu mAbs,

## MD 1374 G2

5

de ex., în stările primare ale infecției HIV (SIDA), în diferite dereglări autoimune, sau în unele cazuri de imunodeficiențe genetice sau acute.

5 În tratarea cancerului anticorpilor pot fi administrați după determinarea tumorii primare sau secundare, ori în calitate de terapie preventivă pacienților cu risc înalt de dezvoltare a cancerului, adică persoanelor expuse radiației sau predispuși genetic, de asemenea pacienților cu SIDA, mAbs pot fi administrați acelorora, la care încă nu s-au dezvoltat simptomele bolii sau acelorora, la care procesul infecțios HIV este în stadiul primar.

10 Efectul antitumoral este un efect biologic, care se manifestă prin micșorarea mărimilor tumorii, reducerea metastazelor, prolongarea sau ameliorarea vieții în diferite stări fiziologice, asociate cu prezența cancerului. Anticorpilor solicitați, prin posibilitatea de a preveni apariția tumorii în localizarea primară, manifestă efectul antitumoral și astfel pot fi folosiți atât în tratamentul cancerului acut, cât și în prevenirea cancerului.

Rezultatul prezintă proliferarea și activarea limfocitelor sângelui periferic asigurând efectul antitumoral.

15 Invenția se explică prin desenele din fig. 1-10 care reprezintă:

fig. 1, analiza citometrică a legării anticorpilor monoclonali BAT (mAbs) cu limfocitele T umane purificate. Legarea anticorpilor BAT a fost evaluată cu ajutorul unui anticorp purtător al markerului fluorescent, anticorp FITC anti-murin de țap;

20 fig. 1a, vederea fondului fără anticorpilor BAT;

fig. 1b, anticorpilor anti-CD3;

fig. 1c, BAT-1;

fig. 1d, BAT-5;

fig. 1e, BAT-2;

fig. 1f, BAT-4.

25 Fig. 2, analiza citometrică a monocitelor umane ale sângelui periferic (PBM) (în stânga) și celulelor T Jurkat (în dreapta) marcate dublu cu anticorpi primari, ei fiind mAbs BAT sau mAbs anti-CD3 și anticorp IgG anti-murin secundar FITC conjugat;

Fig. 2A, celulele necernute;

Fig. 2A(a), celulele PBM tratate cu mAbs BAT;

30 Fig. 2A(b), celulele PBM tratate cu mAbs anti-CD3;

Fig. 2A(c), celulele T Jurkat tratate cu mAbs BAT;

Fig. 2A(d), celulele T Jurkat tratate cu mAbs anti-CD3;

Fig. 2B, celulele cernute;

Fig. 2B(a), celulele PBM cernute (celule mici R1 și mari R2);

35 Fig. 2B(b), celulele (R1) tratate cu mAbs BAT;

Fig. 2B(c), celulele (R1) tratate cu anti-CD3;

Fig. 2B(d), celulele (R2) tratate cu mAbs BAT;

Fig. 2B(e), celulele (R2) tratate cu anti-CD3;

40 Fig. 3, analiza citometrică a expresiei de suprafață a liantului de proteină BAT și CD3 în PBM umane marcate dublu cu mAbs BAT FITC conjugate și anti-CD3 PE conjugate;

Fig. 3A, celulele necernute;

Fig. 3A(a), test control după Bector-Diskinson, se folosește ca control negativ;

Fig. 3A(b), anti-CD3 PE;

Fig. 3A(c), mAbs BAT FITC; marcarea dublă mAbs BAT FITC și anticorpi anti-CD3 PE;

45 Fig. 3B, celulele cernute;

Fig. 3B(a), celulele PBM cernute (celule mici (R1) și mari (R2));

Fig. 3B(b), celulele (R1) marcate dublu cu mAbs BAT FITC și anti-CD3 PE;

Fig. 3B(c), celulele (R2) marcate dublu cu mAbs BAT FITC și anti-CD3 PE;

50 Fig. 4, analiza legării anticorpilor BAT-1 cu diferite lizate ale celulelor Daudi prin metoda Western Blot;

Fig. 4(1), lizatele celulelor Daudi (netratate);

Fig. 4(2), lizatele tratate cu neuraminidază (0,2 u/ml);

Fig. 4(3), lizatele tratate cu neuraminidază (0,4 u/ml);

Fig. 4(4), lizatele tratate cu Endo Hf (100 u/mg);

55 Fig. 5, reprezentarea grafică a rezultatelor încorporării [<sup>3</sup>H]Timidinei în celule, cultivate pentru 6 zile în mediu cu concentrație ascendentă de mAbs BAT; BAT-1 (-⊗-), BAT-2 (-X-), BAT-3 (-⊗-), BAT-5 (-★-), BAT-6 (-↓-), BAT-7 (-⊗-).

## MD 1374 G2

6

Fig. 6, reprezentarea grafică a experimentului în care inducerea activității citotoxice a fost testată în PBM cultivate în intervale diferite de timp cu 2,5 mg/ml de mAbs BAT. Celulele HT-29 (în stanga) și RC 29 (în dreapta) au fost utilizate ca celule-țintă.

5 Fig. 7, plămâni șoarecelui C57BL căruia i-au fost administrate celule de melanom B-16. Rândul de sus prezintă plămâni șoarecilor peste 24 de zile după infectare; rândul de jos plămâni șoarecilor infectați cu celulele B-16 după 24 de zile, dar cărora peste 14 zile după infectare li s-a făcut injecția i.v. de 10 mg de BAT-1.

10 Fig. 8, reprezentarea grafică a sumarului experimentelor de același tip ca în fig. 7, care prezintă cantitatea de metastaze în plămâni șoarecelui, căruia i-au fost introduse celulele tumorale B-16 de melanom, carcinom pulmonar 3LL Lewis sau celulele de fibrosarcom MCA 105, peste o lună după inoculare. Sumarul conține rezultatele a 3-4 experimente, efectuate cu diferite tipuri de tumori. Șoareci netratați (-) sau tratați (+) cu BAT-1 (10 mg/șoarece) peste 2 săptămâni după administrarea celulelor tumorale. Metastaza este (●), metastaza lipsește (○).

15 Fig. 9, plămâni șoarecilor la care au fost introduse celulele carcinomului pulmonar 3LL Lewis. La fel ca în fig. 7, rândul de sus arată plămâni infectați numai cu celulele tumorale, dar rândul de jos - plămâni șoarecilor, la care peste 14 zile au fost introduse mAbs BAT-1 în cantitate de 10 mg.

Fig. 10, același experiment ca la fig. 9, dar celulele cancerului sunt celulele fibroblastomului MCA 105.

### 20 Metode și materiale

#### *Producerea anticorpilor monoclonali*

25 Șoarecii BALB/c au fost imunizați cu preparat membranos de celule Daudi. Membranele celulelor Daudi au fost preparate prin metoda șocului hipotonic, cu glicerol [1].  $50-80 \times 10^6$  celule suspendate în PBS și incubate la temperatura de 37°C au fost saturate treptat cu glicerol, de 30%.  
30 Peste 5 min de incubare pe gheață, ele au fost centrifugate și resuspendate în lizatul-tampon Tris (care conține: 10 mM de Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> cu pH 7.4), amestecate 5 min la 4°C și centrifugate la 700 g. Supernatantul a fost extras și centrifugat la 3300 g (10 min la 4°C). Precipitatul a fost spălat încă o dată și ambii supernatanți, conținând fracții de membrane, au fost îmbinați. 260 ml de preparat membranos (3 mg/ml) au fost emulsionate cu 260 ml de adjuvant complet Freund și injectate i.p. șoarecilor BALB/c. Peste trei săptămâni de la șoareci au fost extrase splinele. Splenocitele au fost introduse în linia NS-0 celulară de mielom în raportul 10:1. Fuziunea a fost efectuată cu folosirea polietilenglicolului și hibridoamele au fost crescute în mediu selectiv după Kohler și Milstein [2].

35 Pentru screeningul supernatanților din hibridoamele în creștere a fost folosită celula legată prin analiza imunosorbentă enzimatică (ELISA), care se leagă cu celulele Daudi. Supernatanții hibridomului pozitiv au fost selectați prin proprietatea lor de a induce proliferarea PBM umane utilizând proba de capturare a [<sup>3</sup>H]Timidinei. Liniile pozitive au fost subclonate prin diluare limitată, testate repetat, extinse și crescute în cultură. Anticorpii monoclonali au fost purificați din mediul cultural prin precipitare cu sulfat de amoniu 50% și cu dializa extensivă împotriva PBS.  
40 Purificarea ulterioară a fost efectuată prin cromatografia afinității la sefaroză (marcă înregistrată a firmei Pharmacia, Suedia) legată cu coloanele anticorpilor antimurini.

#### *Mediul cultural*

45 Toate celulele au fost suspendate în mediul RPMI 1640, completat cu ser fetal de vițel 10% (FCS) Na-piruvat (1,1 mg/ml), L-glutamină (0,3 mg/ml) și antibiotice (penicilină 200 u/ml și streptomycină 10 mg/ml), și incubate în incubator umed cu CO<sub>2</sub> 5%.

Unitățile folosite pentru IL-2 sunt unitățile Cetus (1 unitate Cetus este egală cu 3 UI).

#### *Prepararea celulelor*

50 Celulele mononucleare ale sangelui periferic uman (PBM) au fost obținute de la donatori maturi sănătoși prin centrifugare de densitate cu ficolhipac (Histopaque, marcă înregistrată, Sigma, St. Louis, Missouri, SUA).

PBM au fost purificate de monocite cu coloane de sefadex G10 (Sephadex, marcă înregistrată, Pharmacia, Suedia). Celulele T au fost separate prin metoda rozetelor SRBC (eritrocite de berbec).  
55 Purificarea celulelor CD3 pozitive și Leu19 pozitive a fost efectuată prin tehnologie imunomagnetică. Culturile de PBM, incubate pentru 5-6 zile cu mAbs BAT sau cu mAb CD3 și spălate de trei ori cu PBS. Anticorpii neconjugați la CD3 sau Leu19 (CD56) au fost adăugați la celule în mediul complet RPMI și incubate timp de o oră la 4°C. Pentru 30 min au fost adăugate

## MD 1374 G2

7

globule magnetice, acoperite cu anticorpi antimurini. Celulele alipite la globule, au fost înlăturate cu un magnet și celulele nealipite au fost analizate la activitate citotoxică și marcate prin citometrie curgătoare.

### 5 *Analiza citotoxicității*

Analizele citotoxicității au fost efectuate în următorul mod:  $2-4 \times 10^6$  de celule-țintă au fost amestecate cu 200 mC de  $^{51}\text{Cr}$ -cromat timp de o oră în mediu fără ser. Ele au fost spălate de trei ori cu mediul complet și în fine resuspendate în RPMI - 10% FCS și plasate în godeuri câte  $10^4$  celule. Celulele efectoare au fost cultivate, limfocitele au fost preparate din sange periferic normal, incubat în diferite perioade de timp cu diferiți mAbs, martorul izotipic IgG sau cu IL-2. Până la analiză celulele au fost spălate de trei ori în mediul RPMI, vopsite pentru viabilitatea celulelor cu tripan albastru 1%, amestecate cu celulele-țintă în diferite proporții efector-țintă în plăci pentru microtitrare cu fund rotund și incubate timp de 3 ore la  $37^\circ\text{C}$  în  $\text{CO}_2$  5%. Supernatanții cultivați au fost colectați și estimați în scintilatorului  $\beta$ . Eliberarea maximă de izotop (MR) a fost produsă prin incubarea celulelor-țintă cu triton x-100 (marcă înregistrată, Sigma, St. Louis, Missouri, SUA). Eliberarea spontană (SR) a fost înregistrată prin incubarea celulelor-țintă în mediu curat. Procentajul lizei celulare se calculează prin formula  $(\text{ER}-\text{SR}/\text{MR}-\text{SR}) \times 100$ , în care ER este eliberarea experimentală a efectorului.

### 20 *Inducerea citotoxicității la subpopulațiile limfocitelor umane*

Celulele PBM ( $4 \times 10^6$  ml) au fost cultivate timp de 6 zile în prezența mAbs BAT. Apoi celulele au fost spălate de trei ori și purificate de celulele CD3 și Leu19 cu folosirea globulelor magnetice acoperite cu  $\text{f(ab}')_2$  antimurini și testate la citotoxicitate împotriva celulelor K562 și Daudi.

### 25 *Citometrie curgătoare*

Antigenii de suprafață ai celulelor au fost observați prin citometrie curgătoare folosind FACS 440 (Becton - Dickinson). Pentru fiecare analiză au fost folosite câte  $10^6$  celule. Celulele au fost vopsite prin incubare consecventă cu o concentrație optimă de mAb murin în CD3 umane, receptorii de IL-2 sau mAb BAT 1-9, care au fost produse. În această vopsire indirectă,  $\text{F(ab}')_2$  antimurin de țap FITC-conjugat a fost anticorpusul a doilea. Fiecare incubare a fost menținută în PBS cu pH 7.4, conținând BSA 1% și azotură de Na 0.5% la  $4^\circ\text{C}$  timp de 30 min, și apoi a fost spălată de trei ori în același tampon. Au fost analizate  $10^4$  celule vopsite.

### 35 *Determinarea saiturilor de legare a mAb BAT*

Determinarea saiturilor de legare pe lizatele celulelor B limfoblastoide de tip Daudi a fost efectuată cu folosirea tehnicii Western Blot. În scurt,  $50 \times 10^6$  celule/ml suspendate în PBS au fost treptat saturate cu glicerol 30% și membranele au fost separate prin centrifugări consecvente.

Probele preparatelor membranoase au fost separate prin SDS-PAGE (12%) și apoi transferate în pete de nitroceluloză, care au fost scufundate în lapte cu grăsimea mică de 1%, în PBS. Determinarea proteinei de legătură a mAb BAT, în petele de nitroceluloză a fost efectuată prin incubarea petelor cu mAb BAT în timp de 2 ore la temperatura camerei cu incubarea ulterioară timp de 30 min cu anticorpusul 70 antimurin IgG ( $\text{Fab}')_2$  conjugat cu peroxidază din hrean. Apoi celulele au fost spălate și zonele au fost determinate cu substratul de O-dianizidină.

45

### *Modele de tumori la șoareci*

Au fost folosite trei modele de tumori la șoareci: B16 melanom, carcinom pulmonar Lewis (3LL) și fibrosarcom indus cu metilcolantren (MCA 105).  $50 - 200 \times 10^6$  de celule au fost injectate i.v. la șoareci C57BL (în vârstă de 8 săptămâni). Peste două săptămâni a fost injectat (i.v.) BAT-1 1-10 mg/șoarece și peste 10 zile șoarecii au fost sacrificați și s-au calculat metastazele pulmonare depistate.

50

### **Exemple**

#### *Exemplul 1*

55

#### **a. Caracteristicile legării**

Nouă anticorpi monoclonali (mAbs), semnați BAT 1-9, obținuți prin imunizarea celulelor B limfoblastoide, au fost selectați după legarea cu celulele Daudi și apoi după inducerea proliferării limfocitelor umane ale sângelui periferic. Izotipurile mAbs BAT au fost determinate ca și analizele

## MD 1374 G2

8

ELISA și Ochterlony. A fost depistat că: BAT 1, 2, 3, 6, 7 și 9 sunt de clasa IgG1, dar BAT 4 și 5 de clasa IgM. BAT 8 a fost IgG2a.

Legarea mAbs cu celulele T umane purificate a fost analizată prin analiza FACS folosind vopsirea imunofluorescentă indirectă. Fig. 1 - analiza FACS a experimentului. Cum se vede, mAbs BAT legau cu DC3 plus celulele T ale sangelui periferic. Intensitatea legării variază de la BAT-2 44%, BAT-5 38% până la legarea cea mai slabă BAT-4 13%. Limfocitele B purificate ale sangelui periferic de la aceiași donatori, n-au legat acești mAbs (datele nu-s arătate).

### b. Legarea mAb BAT-1 cu subpopulațiile limfocitelor umane

Cum este arătat pe Fig. 2, analiza FACS următoare, s-a depistat legarea BAT-1 cu PBM umane CD3 plus celulele T ale liniei Jurcat. Depistarea legării BAT-1 cu celulele CD3+PBM a fost confirmată prin analiza FACS a celulelor marcate dublu (Fig. 3).

Cum este arătat în tabelul 1 mai jos, BAT-1, suplimentar la legarea celulelor CD3, leagă și celulele Leu 19/NK.

Tabelul 1

Legarea mAb BAT-1 cu subpopulații limfoide umane

mAb	Celule pozitive (%)	
	Subpopulație a celulelor crescute pentru	
	CD3+	Leu19+
CD3	66.4 (100%)	-
Leu 19	-	59.5 (100%)
BAT-1	19.8 (30%)	42.2 (70%)

### c. Legarea mAbs BAT cu diferite tipuri de celule

A fost depistată legarea mAbs BAT cu diferite tipuri de celule. Cum este arătat mai jos în tabelul 2, mAbs BAT se leagă cu linia celulară a eritroleucemiei K562 și carcinomului mamar uman MCF7 așa ca și cu celule T PBL, Daudi și Jurcat. Intensitatea legării variază între mAbs BAT și tipurile celulelor testate, mAbs 2-9 se leagă cu carcinomul renal al șoarecilor (MR28) numai cu intensitate slabă. Numai BAT-8 se leagă cu celulele MEL (eritroleucemia murină) tot cu intensitate slabă.

Tabelul 2

Legarea mAbs BAT-1 cu diferite tipuri de celule

Celule umane	mAbs BAT					
	1	2	4	5	8	9
Daudi	+++	++	++	+++	±	+++
Jurcat	+	±	+++	+++	-	+++
PBL	+++	±	+	+	±	±
K562	+++	+	+	+++	±	+++
MCF7	±	++	+++	+++	+	+++
Celule de șoareci						
MR28	-	±	+	+	±	±
MEL	-	±	-	-	±	-

### Exemplul 2

#### Analiza saiturilor de legare a mAb BAT și purificarea liantului de proteină BAT-1

Cu scopul determinării masei moleculare a proteinei membranoase, care interacționează cu mAbs BAT-1, preparatul membranelor celulelor Daudi a fost dizolvat și proteina a fost separată folosind SDS-PAGE. Părțile nitrocelulozei au fost incubate cu mAbs BAT-1 și zonele au fost depistate prin incubarea ulterioară cu anticorpii antimurini IgG (Fab')<sub>2</sub> conjugat cu peroxidază din hrean și folosind substratul O-dianizidin. Masa moleculară a proteinei liante BAT-1 a fost determinată fiind egală cu 48-50 kDa (Fig. 4).

Proteina liantă mAb BAT a fost purificată folosind mAb BAT conjugată cu șefarosă (marcă înregistrată Pharmacia, Suedia). Această proteină liantă poate fi preparată și prin clonare folosind tehnicile biologice moleculare. Administrarea BAT-1 *in vivo* la șoareci cauzează inducerea BAT a anticorpilor.

## MD 1374 G2

9

### Exemplul 3

#### Caracteristicile funcționale ale mAbs BAT

##### a. Încorporarea timidinei indusă cu mAbs BAT

5 Celulele sângelui periferic uman au fost cultivate timp de 6 zile în prezența concentrațiilor ascendente ale panourilor de mAbs BAT și au fost pulsate cu [<sup>3</sup>H]Timidină timp de 20 ore înainte de extragere.

Cum este arătat în Fig. 5, mărirea treptată a concentrației de mAbs BAT rezultă o creștere moderată, dar considerabilă a încorporării [<sup>3</sup>H]Timidinei în celulele PBM. O doză mare de anticorpi a cauzat descreșterea capturării. În experimentele de control, anticorpii izotipic marcați n-au ridicat cantitatea [<sup>3</sup>H]Timidinei în celulele PBL, ceea ce indică că efectul agonistic al lui mAbs BAT depinde de proprietăți specifice ale legării. De exemplu, mAb al izotipului IgG1, care a fost indus în laboratorul nostru contra celulelor carcinomului ovarian, n-a cauzat acapararea [<sup>3</sup>H]Timidinei spre deosebire de mAbs BAT-1, 2, 3, 6, 7 și 9 care tot aparțineau clasei IgG1.

##### b. Citotoxicitatea indusă cu mAbs BAT la PBM umane.

15 Culturile celulelor mononucleare ale sângelui periferic uman incubate cu mAbs BAT în diferite perioade de timp, au fost testate la capacitatea de a liza liniile celulelor tumorale. Cum este arătat în tabelul 3 mai jos, celulele umane PBM incubate timp de o săptămână cu panou de mAbs BAT, au fost citotoxice contra K562, eritroleucemiei umane (NK senzitivă) și RC-29, liniei celulelor carcinomului renal (NK rezistent), celulelor.

20 A fost investigată cinetica ridicării activității citotoxice la PBM umane, care a fost stimulată cu mAbs BAT. Cum este arătat în Fig. 6, citotoxicitatea maximală împotriva celulelor carcinomului liniei (HT-29) și carcinomului renal (RC-29) a fost obținută peste 7 zile de incubare a PBM uman cu mAbs BAT.

Tabelul 3

25 Sporirea citotoxicității la PBM uman de către mAbs BAT

mAb	Eliberarea 51Cr specifică (%)	
	K562	RC-29
Lipsește	11.0*	9.1
BAT-1	25.1	45.4
2	29.0	23.2
3	26.3	32.3
4	30.6	40.7
5	32.3	34.3
6	15.2	13.8
7	17.8	16.7
8	17.8	19.2
IL-2 100 u/ml	57.6	36.9

\*Procentul lizării celulelor-țintă cu relație efector:țintă 5:1

##### c. Caracterizarea subpopulației limfocitelor, citotoxicitatea căreia a fost indusă cu BAT

30 Pentru a determina dacă creșterea activității citotoxice a PBM umane induse cu mAbs BAT este cuvenită la activarea celulelor NK, celulelor T sau ambelor tipuri, celulele T și NK au fost purificate și citotoxicitatea lor indusă cu BAT a fost determinată. Pentru purificarea NK și celulelor T, anticorpii monoclonali Leu19 și CD3 au fost incubati cu celule umane PBM, dar apoi cu globuri magnetice acoperite cu IgG antimurin. Cum este arătat în tabelul 4 mai jos, cantitatea unităților lizate a crescut în culturile eliberate de CD3 și Leu19. În aceste experimente au fost folosite BAT-6 și 8 și în rol de ținte eritroleucemia umană (K562) și limfomul uman (Daudi).

Tabelul 4

Inducerea citotoxicității la subpopulațiile limfocitelor umane cu mAbs BAT

	Unități litice			
	Celule-țintă			
	K562		Daudi	
	Celule-efectori eliberate de:			
	CD3	Leu 19	CD3	Leu 19
Martor	8	4	10	3.8
BAT 6	25	10	20	13
BAT 8	28	12.5	26	20

## MD 1374 G2

10

### *Exemplul 4*

#### **Rolul sinergismului dintre mAb BAT și IL-2 în inducerea citotoxicității**

- 5 Inducerea citotoxicității în PBM umane a fost studiată prin incubarea celulelor PBM cu mAb BAT în combinație cu IL-2. IL-2 a fost adăugat în concentrații suboptimale (1 U/mL) împreună cu concentrații ascendente de mAb BAT-2. Citotoxicitatea culturii împotriva liniilor celulelor tumorale K562 și HT29 a fost testată peste o săptămână. Astfel cum este arătat în tabelul 5 mai jos, concentrațiile mici de BAT-2 se asociază cu IL-2 în inducerea citotoxicității la celulele PBM împotriva ambelor tipuri de celule-țintă.
- 10 Anterior a fost depistat că  $\text{Inf-}\alpha$  mărește expresia antigenilor de clasa MHC-1. Apoi a fost determinat că administrarea  $\text{Inf-}\alpha$  potențază efectul antitumoral al BAT, care a fost condiționat de celulele citotoxice direcționate contra diverselor celule tumorale (care au MHC antigeni de clasa I).

## MD 1374 G2

11

Tabelul 5

Efectul sinergetic al mAbs BAT-2 și IL-2 la inducerea citotoxicității la PBL uman

BAT (mg/ml)	Eliberarea 51Cr specifică (%)			
	Celule-țintă			
	HT29		K562	
	IL-2 (1 u/ml)			
	-	+	-	+
0	5.8±0.1	7.5±0.3	3.7±0.1	6.9±0.4
2	14.8±1.3	37.6±2.0	12.0±0.4	29.6±1.6
4	16.7±0.6	27.3±1.0	13.3±0.6	18.5±1.2
8	22.6±1.0	15.1±0.6	19.9±0.7	12.5±0.4

5 **Exemplul 5**  
**Efecte imunostimulatoare ale BAT-1 murin:**

a. Studii *in vitro*

mAb BAT-1 demonstrează proprietăți stimulative la splenocite murine ca și la PLB umane.

Ele conțin:

10 (1) Creșterea proliferării splenocitelor *in vitro*, cum este măsurat prin încorporarea <sup>3</sup>H-Timidinei (Tabelul 6);

(2) Efectul stimulator sinergetic al incubăției splenocitelor în combinația BAT-1 și IL-2 (Tabelul 6).

Tabelul 6

BAT-1 (mg/ml)	cpm [ <sup>3</sup> H]Timidină x 10 <sup>3</sup>		
	IL-2		
	-	1 u/ml	10 u/ml
-	1.5±0.07	16.0±0.9	67.5±1.5
10	11.0±0.4	32.1±1.5	241.6±17.1
1	12.9±0.8	35.9±3.3	247.8±1.9
0.1	18.1±0.9	51.0±7.3	255.1±18.0
0.0001	10.5±0.1	34.1±0.5	215.1±20.8

15

Splenocitele murine C57BL au fost incubate timp de 5 zile *in vitro* în prezența variatelor concentrații de BAT-1 în combinație cu interleukin-2 (1 u și 10 u/ml).

Creșterea citotoxicității la culturile splenocitelor murine în prezența BAT-1 și creșterea ulterioară a citotoxicității după incubare în prezența IL-2 (Tabelul 7).

20

Tabelul 7

BAT-1 (mg/ml)	Eliberarea 51 Cr specifică (%)		
	Interleukin-2		
	-	1 u/ml	10 u/ml
-	7.4	10.0	31.1
100	24.9	31.3	52.4
10	17.4	26.7	52.8
1	12.3	23.9	46.8
0.1	12.2	21.7	45.5

Inducerea citotoxicității la culturile splenocitelor C57BL timp de 5 zile *in vitro* în prezența diferitelor concentrații de BAT-1 în combinație cu dozele mici de IL-2.

25 În calitate de celule-țintă au fost folosite celulele melanomului B-16. Relația efectori:țintă a fost 50:1.

Celulele-țintă tumorale murine, care au fost susceptibile la efectul citotoxic al splenocitelor activate de BAT-1, sunt: melanomul B-16, carcinomul pulmonar Lewis (3LL), fibrosarcomul (MCA 105), carcinomul celulelor rinichiului (MR 28) și limfomul (YAC) (Tabelul 8).

## MD 1374 G2

12

Tabelul 8

Citotoxicitatea BAT-1 indusă la splenocite împotriva celulelor tumorale la șoareci

Genul șoarecelui	Celulele tumorii	Eliberarea 51 Cr specifică (%)	
		BAT-1	
		-	
C57BL	Melanom B16	5.4	13.6
	Carcinom pulmonar Lewis (3LL)	11.2	24.0
	Fibrosarcom (MCA 105)	27.0	45.0
BALB/C	Limfom (YAC)	8	12.2
	Carcinom renal (MR28)	0.1	5.2

5 Splenocitele au fost cultivate *in vitro* timp de 5 zile fără mAb BAT-1 (1 mg/ml). Citotoxicitatea a fost determinată după relația efectori:țintă - 60:1.

### b. Studii *in vivo*

Cum este arătat în tabelul 9 mai jos, BAT-1 manifestă efecte imunostimulatoare și *in vivo*.

10 Stimularea încorporării [<sup>3</sup>H]Timidinei în splenocite de la șoarece, care a fost injectat cu BAT-1 10 zile în urmă (tabelul 9a). Stimularea maximă (volum de 10 ori mai mare) a fost obținută la administrarea BAT în doza de 10 mg/murine.

15 Inducerea citotoxicității la splenocitele șoarecilor injectați cu BAT-1 (tabelul 9b). BAT-1 s-a administrat 10 zile până la analiza citotoxicității, inducând citotoxicitatea împotriva celulelor melanomului murin (B16-F10), carcinomului renal (MR-28) și limfomului (YAC). Efectul maximal a fost obținut la administrarea BAT în cantitate de 10 mg/murine.

Tabelul 9

Proliferarea și citotoxicitatea splenocitelor de la șoareci injectați cu mAb BAT

A		B		
Incorporarea [ <sup>3</sup> H]Timidinei cmp x 10 <sup>-3</sup> ±SEM	BAT (mg/murine)	Eliberarea 51Cr specifică (% ±SEM)		
		Celulă-țintă		
		B16	MR-28	YAC
9.9±1.5 (n=16)	0	3.9±1.4 (n=10)	16.0±2.7 (n=8)	3.3±0.4 (n=6)
15.3±2.3 (n=12) p<0.1	1	13.2±1.4 (n=6) p<0.001	31.7±2.8 (n=8) p<0.01	16.7±1.6 (n=6) p<0.001
20.0±4.0 (n=14) p<0.05	10	14.0±1.2 (n=6) p<0.001	25.2±2.1 (n=8) p<0.02	19.0±2.6 (n=6) p<0.001

20 Șoarecii C57BL și BALB/c au fost injectați i.v. cu diferite concentrații de mAb BAT. Citotoxicitatea și încorporarea [<sup>3</sup>H]Timidinei au fost determinate peste 10 zile la splenocitele izolate. Splenocitele de la șoarecii C57BL au fost testate pe melanom B-16, iar splenocitele de la șoarecii BALB/c au fost testate pe celulele MR-29 și YAC (relație efectori:țintă - 50:1). Fiecare lot conținea 6-16 șoareci în 3-4 experimente separate. Citotoxicitatea și încorporarea [<sup>3</sup>H]Timidinei au fost efectuate de trei ori la fiecare șoarece și a fost calculată media. Rezultatele sunt prezentate în formă de medie±eroare standard la n șoareci, P-rezultate sunt date pentru diferența între martor și animalele tratate cu BAT.

### Exemplul 6

#### Efectul imunoterapeutic al lui BAT-1 împotriva tumorilor șoarecilor

30 Cum este arătat pe Tabelul 10, administrarea BAT-1 peste 14 zile la șoarecii infectați cu melanom, s-a micșorat cantitatea metastazelor pulmonare în plămâni șoarecilor cu tumorile B16, 3LL și MCA.

**a1. Înlăturarea metastazelor pulmonare ale melanomului B-16 la șoarecii infectați folosind modelul metastazelor pulmonare rezistente**

## MD 1374 G2

13

Șoarecii C57BL au fost infectați (i.v.) cu celulele melanomului B-16 în cantitate de  $50 \times 10^3$  (tabelul 10). Peste 24 de zile după injecție în plămâni s-au dezvoltat metastaze multiple (practic confluențe), vezi fig. 7, rândul de sus.

5 Dar, la șoarecii, care peste două săptămâni după infectare au fost injectați cu BAT-1 (10 mg/murin), plămâni practic au fost fără metastaze ale melanomului B-16.

Fig. 8 reprezintă sumarul rezultatelor a șase experimente separate efectuate în aceleași condiții ca și cele de mai sus.

Tabelul 10

Efectul antitumoral al mAbs BAT  
Reducerea metastazelor pulmonare, indusă cu BAT

(c) Numărul metastazelor (c)	Tumorile (a)					
	B16		3LL		MCA	
	Tratarea cu BAT(b)					
	- (n=24)(d)	+ (n=27)	- (n=11)	- (n=11)	- (n=8)	- (n=9)
lipsă	0	25	0	6	0	4
1-10	0	2	0	4	0	5
11-50	8	0	3	1	5	0
>250	16	0	8	0	3	0
Greutatea plămânului (g)	0,803(e) ±0,26	0,315 ±0,66	1,014 ±0,21	0,364 ±0,06	0,836 ±0,31	0,328 ±0,06

a. Tumorile au fost injectate la ziua 0.

b. mAb BAT (10 mg/murin) a fost injectat la ziua 14.

15 c. Metastazele în plămâni au fost calculate folosind stereomicroscopul Zeiss peste 24 de zile după infectare.

d. Numărul șoarecilor.

e. Media±SD greutatea plămânilor de la (n) șoareci.

### a 2. Efectul antitumoral al mAb BAT-1, injectat în diferite timpuri în raport cu infectarea cu tumoarea B16

20 Cum este arătat în Tabelul 11, șoarecii, care au primit injecție din celulele melanomului și au fost tratați cu mAb BAT-1 peste 10-14 zile după infectare, n-au avut metastaze, și greutatea plămânilor lor a fost normală. Micsorarea considerabilă, dar nu completă, a cantității metastazelor în plămâni șoarecilor a fost depistată la șoarecii, care au fost imunizați peste 5 zile după infectare și nu mai târziu de 19 zile după infectare. Injecția cu BAT-1 în aceeași zi cu infectarea n-a avut  
25 efectul terapeutic.

Tabelul 11

Administrarea BAT în timp diferit relativ la infectarea cu melanomul B16

Ziua	Nr. șoarecilor	Nr. metastazelor	Greutatea plămânilor
Lipsește	10	155.0±28	0.892±0.19
6	3	61.0±0.8	0.983±0.1
0	7	148±36	0.425±0.05
5	4	0.8±0.5	0.243±0.07
10	4	0.0±0.0	0.240±0.08
14	7	0.0±0.0	0.286±0.03
19	4	2.2±1.3	0.338±0.01
23	4	75.4±44	0.840±0.240

30 Ziua administrării mAb BAT în raport cu infectarea cu tumoarea (zi 0).

### b. Eliminarea metastazelor pulmonare a carcinomului pulmonar Lewis (3LL) la șoarecii infectați cu folosirea modelului metastazelor rezistente

35 Condițiile experimentale au fost similare și sunt descrise la melanomul B-16 (vezi mai sus), în afară de faptul că au fost injectate cu  $2 \times 10^5$  de celule. În Fig. 9, în rândul de sus sunt arătați plămâni șoarecilor infectați cu 3LL cu metastaze multiple. Rândul de jos în Fig. 9 arată plămâni șoarecilor, la care după infectare a fost administrat tratamentul cu BAT-1, și care, cum se vede, sunt fără metastaze.

## MD 1374 G2

14

### Eliminarea metastazelor pulmonare ale fibrosarcomului (MCA 105) la șoarecii infectați cu folosirea modelului metastazelor rezistente

Condițiile experimentale sunt aceleași ca la carcinomul pulmonar 3LL Lewis (vezi mai sus). În fig. 10, în rândul de sus sunt arătați plămânii șoarecilor infectați cu MCA 105 cu multiple metastaze. Rândul de jos în Fig. 10 arată plămânii șoarecilor, la care după infectare a fost administrat tratamentul cu BAT-1, și care, cum se vede, sunt fără metastaze.

#### Exemplul 7

##### BAT-1 tratarea șoarecilor infectați cu tumorile BAT și 3LL

Șoarecii infectați cu celulele melanomului B16 sau 3LL, după metoda descrisă mai sus, au pierit timp de 25-35 zile după infectare. Dar și acei cărora li s-a injectat BAT-1 (10 mg/murin) la 14 zile după infectare cu tumoare, au supraviețuit mai mult de 100 de zile. Majoritatea animalelor, care au supraviețuit până la 5 luni, n-au prezentat careva semne ale bolii și nu au avut metastaze la momentul examinării patomorfologice.

#### Exemplul 8

##### Transferarea adoptivă a splenocitelor de la șoarecele tratat cu mAb BAT-1 la recipient

Splenocitele șoarecilor, tratați numai cu mAb BAT-1 sau în primul rând infectați cu celulele melanomului B-16 și apoi tratați cu mAb BAT-1, au fost transferate la șoarecii recipienti. Șoarecii recipienti au fost infectați cu celulele tumorale ale melanomului B16 sau 3LL. Cum este arătat în tabelul 12 mai jos, transferarea adoptivă a splenocitelor de la șoarecii imunizați cu BAT-1, s-a indus un regres al tumorilor la șoarecii recipienti. Tratamentul cel mai eficient a fost obținut la transplantarea a  $10^3$  splenocite de la șoarecii infectați cu celulele melanomului B16 și peste 14 zile injectați cu BAT-1 la șoarecii-recipienti cu tumori. Cum se vede în tabelul 12, în acest caz, a fost obținută eliminarea completă a celulelor melanomului B16 și un regres considerabil al tumorii 3LL, care se manifestă în numărul metastazelor și în greutatea plămânilor.

Aceste rezultate au demonstrat că splenocitele șoarecilor infectați cu B16 și tratați cu BAT-1, prezintă un efect antitumoral împotriva B16 și 3LL. Astfel se poate presupune că BAT-1 amplifică mecanismele celulare efectoare nespecifice. Mai mult decât atât, prezența tumorilor a făcut posibilă amplificarea generației celulelor-efectori, induse cu BAT-1.

Tabelul 12

#### Regresul tumorii induse prin transferarea adoptivă (a)

Grupa donatorului	Șoareci infectați cu tumoare (recipienti)							
	B16				3LL			
	Nr. splenocitelor transferate							
	$10^7$		$10^8$		$10^7$		$10^8$	
Nr. Metas.	Greut. plăm.	Nr. Metas.	Greut. plăm.	Nr. Metas.	Greut. plăm.	Nr. Metas.	Greut. plăm.	
A. netratați	>250	1.09±0.9 (e)	>250	1.12±0.04	>250	1.05±0.16	>250	1.12±0.16
B. tratați cu BAT (b)	89±10 (d)	0.67±0.04	28±4.3	0.41±0.19	134±15	0.87±0.29	134±19	0.77±0.31
C. injectați cu B16 și tratați cu BAT (c)	4±4	0.32±0.01	0±0.0	0.31±0.01	3.6±2.9	0.34±0.06	2.6±1.1	0.36±0.03

a. Splenocitele de la trei grupe de șoareci (A, B, C) au fost injectate i.v. la șoarecii-recipienti peste 14 zile după infectare.

b. Splenocitele au fost transferate de la șoareci peste 20 zile după injecție i.v. cu BAT (10 mg/șoarece).

c. Item (b), dar șoarecii au fost infectați cu melanom B16 14 zile înainte de administrarea de BAT.

d. Numărul mediu al metastazelor pulmonare ±SD de la trei șoareci.

e. Cantitatea medie a greutății plămânilor (g) ±SD de la trei șoareci.

## MD 1374 G2

15

### (57) Revendicări:

1. Anticorp monoclonal imunostimulator sau un fragment de acest anticorp ce leagă un antigen, care, legandu-se cu celulele B limfoblastoide, induce proliferarea și activarea limfocitelor sângelui periferic, asigură efectul antitumoral.
2. Anticorp monoclonal imunostimulator sau fragment, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** posedă caracteristicile anticorpului monoclonal secretat de linia celulară a hibridomului, depozitat în Centrul Național de Culturi Microbiologice, FR (CNCM) sub nr. 1-1397.
3. Anticorp monoclonal imunostimulator sau fragment, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** este secretat de linia celulară a hibridomului, depozitat în CNCM sub nr. 1-1397.
4. Procedeu de obținere a anticorpului monoclonal sau a fragmentului indicat în revendicarea 1, care include imunizarea animalului cu un imunogen, dezvoltarea ulterioară a reacției imune la animalul imunizat, extragerea limfocitelor B de la animalul imunizat, creșterea, imortalizarea și selectarea liniilor celulare, **caracterizat prin aceea că** imunogenul se selectează din grupul constituit din celule B limfoblastoide, celule B limfoblastoide lizate sau preparate membranoase din ele și se efectuează selectarea liniilor celulare secretând anticorpi care leagă imunogenul, capabile de a induce proliferarea și activarea limfocitelor sângelui periferic și care produc efect antitumoral la animalele afectate de tumoare.
5. Linie celulară imortalizată care secretează anticorpul indicat în revendicarea 1.
6. Linie celulară imortalizată, conform revendicării 5, care constituie linie celulară de hibridom.
7. Linie celulară, conform revendicării 6, care secretează anticorpul cu caracteristicile anticorpului secretat de linia celulară a hibridomului, depozitat în CNCM sub nr. 1-1397.
8. Linie celulară, conform revendicării 6, care este linia celulară a hibridomului, depozitat în CNCM sub nr. 1-1397, ce secretează anticorpul monoclonal imunostimulator sau fragmentul indicat în revendicarea 1.
9. Metodă de tratare a maladiilor, care include administrarea unei cantități eficiente de anticorp monoclonal, **caracterizată prin aceea că** în calitate de anticorp monoclonal este utilizat anticorpul indicat în revendicarea 1.
10. Metodă, conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** maladiile constituie cancer.
11. Metodă, conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal imunostimulator posedă caracteristicile anticorpului monoclonal secretat de linia celulară a hibridomului, depozitat în CNCM sub nr. 1-1397.
12. Metodă, conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal imunostimulator este secretat de linia celulară a hibridomului, depozitat în CNCM sub nr. 1-1397.
13. Compoziție farmaceutică, ce include în calitate de ingredient activ anticorp monoclonal și umplutură fiziologic acceptabilă, **caracterizată prin aceea că** în calitate de ingredient activ este utilizat anticorpul indicat în revendicarea 1.
14. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** este folosit anticorpul monoclonal imunostimulator, posedând caracteristicile anticorpului secretat de linia celulară a hibridomului, depozitat în CNCM sub nr. 1-1397.
15. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 14, **caracterizată prin aceea că** este utilizat anticorpul monoclonal imunostimulator secretat de linia celulară a hibridomului, depozitat în CNCM sub nr. 1-1397.
16. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** suplimentar conține un agent care sporește activitatea limfocitelor citotoxice, aditiv sau sinergetic față de anticorp.
17. Substanță proteică cu care se leagă specific anticorpul indicat în revendicarea 1.
18. Substanță, conform revendicării 17, care are masă moleculară de 48-50 kDa potrivit datelor electroforezei cu gel.

## MD 1374 G2

16

### (56) Referințe bibliografice:

1. Clark, E. A, and Ledbetter, J.a. Amplification of the immune response by agonistic antibodies, *Immunology Today*. 1986, vol. 7, №9, p. 267-270;
2. Meuer, Stefan C. et al. Triggering of the T3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an interleukin-2 dependent autocrine pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, p. 1509-1513;
3. Van Wauwe, Jean P., et al. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody and potent mitogenic properties. *The Journal of Immunology*. 1980, vol. 124, №6, p. 2708-2713;
4. Jung, Gundram et al. Induction of cytotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells by monoclonal antibody OKT3. *The Journal of Immunology*. 1987, vol.139, №2, p. 639-644;
5. Van Lier, R., et al. Studies on the monocyte dependence of T-cell proliferation induced by monoclonal antibodies directed against region I and II of the CD2 antigen. *Immunology*, 1989, vol. 67, p. 333-338;
6. Ellenhorn, Joshua D. et al. In vivo administration of an anti-CD3 prevents malignant progressor tumor growth. *Science (Washington, D.C.)*. 1988, vol. 242, p. 569-571;
7. Gallinger, Steven et al. Comparison of cellular immunotherapies and anti-CD3 in the treatment of MCA-38-LD experimental hepatic metastases in C57BL/6 mice. *Cancer Research*. 1990, vol. 50, p. 2476-2480;
8. Ledbetter, Jeffrey A. et al. Antibodies to Tp67 andTp44 augment and sustain proliferation responses of activated T cell. *The Journal of Immunology*. 1985, vol. 135, №4, p. 2331-2336;
9. Moretta Alessandro et al. CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti- CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor  $\alpha/\beta$ . *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 174, p.1393-1398;
10. Van Lier, Renee A. W. et al. Signals involved in T cell activation. T cell proliferation induced through the synergistic action of anti-CD28 and anti-CD2 monoclonal antibodies *Eur. J. Immunol*. 1998, vol. 18, p. 167-172;
11. Jenkins, Mars K. et al. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *The Journal of Immunology*. 1991, vol.147, №8, p.2461-2466;
12. Townsend, Sarah E. et al. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science (Washington, D.C.)*. 1993, vol. 259, p.368-370;
13. Hardy, Britta et al. A monoclonal antibody to human B lymphoblastoid cells activates human and murine T lymphocytes. *Cellular Immunology*. 1989, vol. 118, p.22-29

**Șef secție:** EGOROVA Tamara

**Examinator:** TIMONIN Alexandr

**Redactor:** ANDRIUȚĂ Victoria

# MD 1374 G2

17

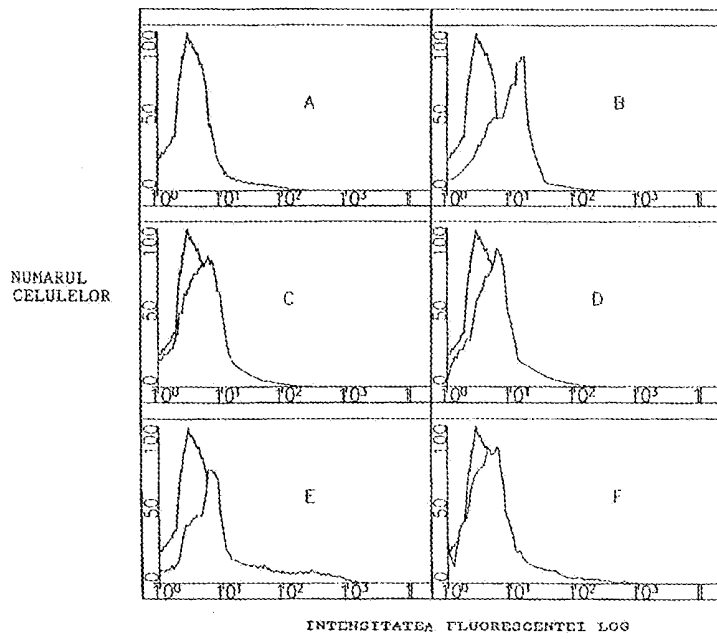


Fig. 1

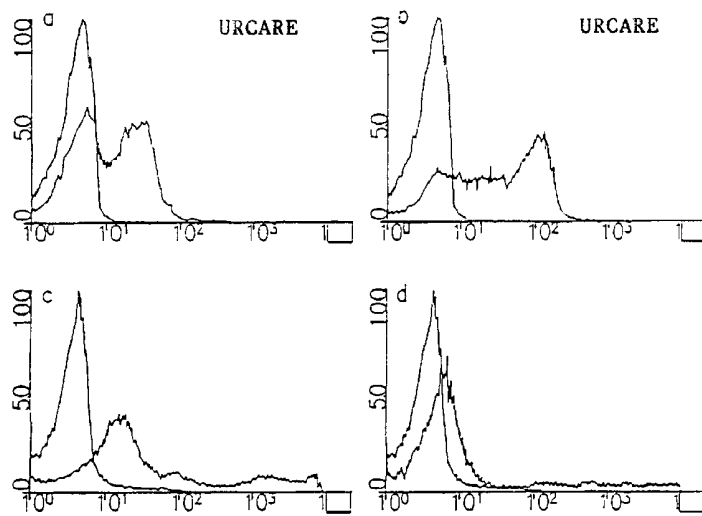


Fig. 2A

# MD 1374 G2

18

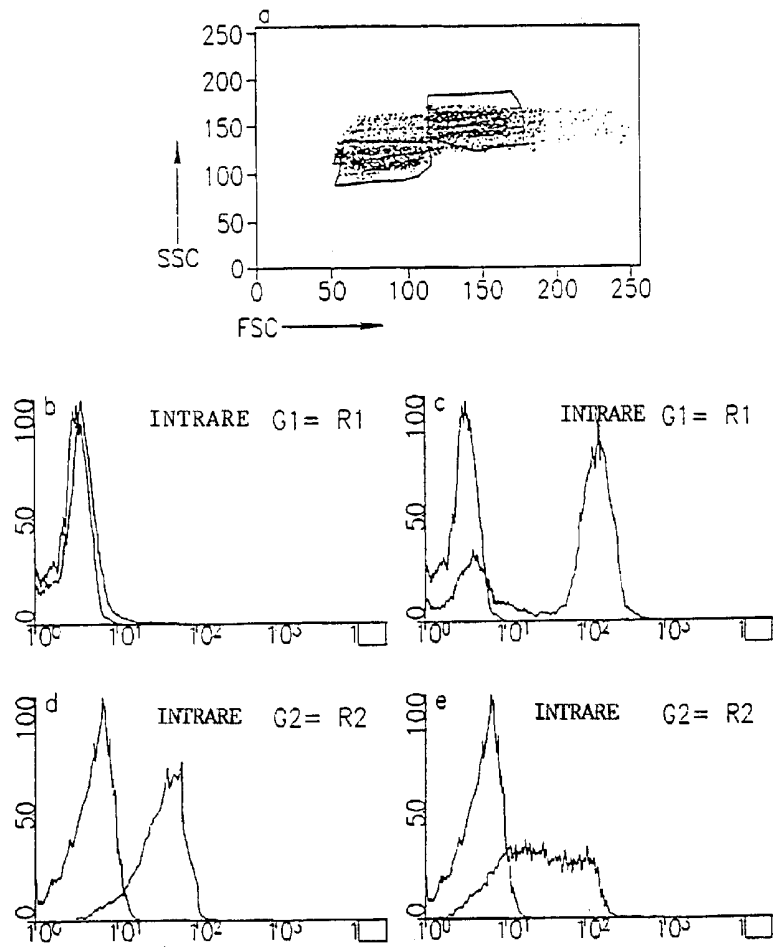


Fig. 2B

# MD 1374 G2

19

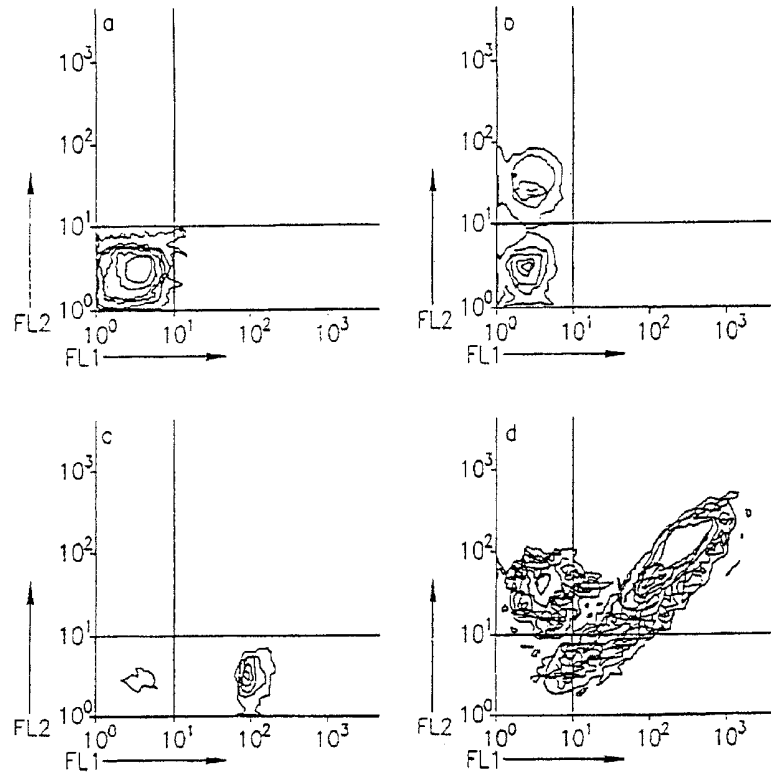


Fig. 3A

# MD 1374 G2

20

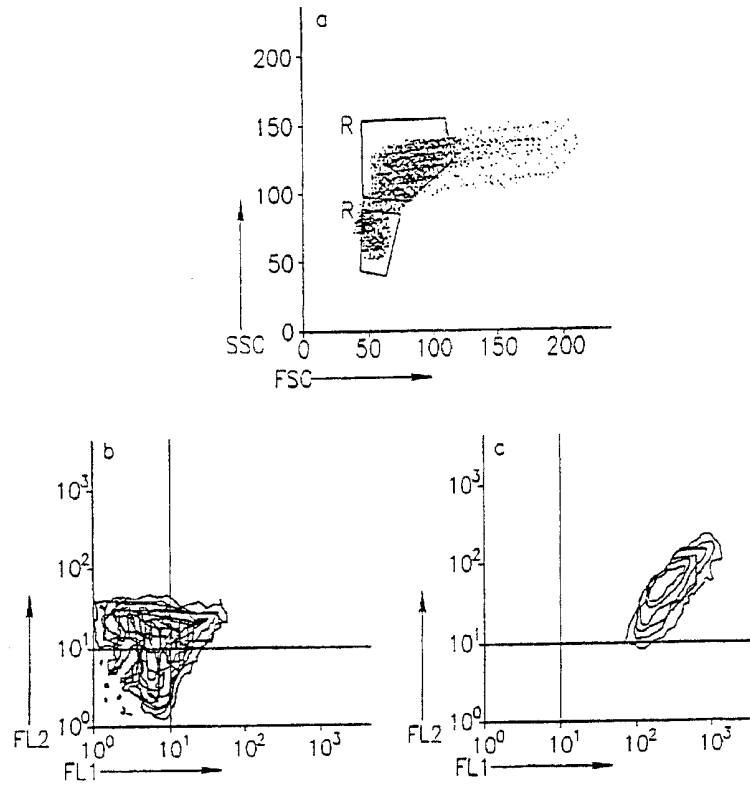


Fig. 3B

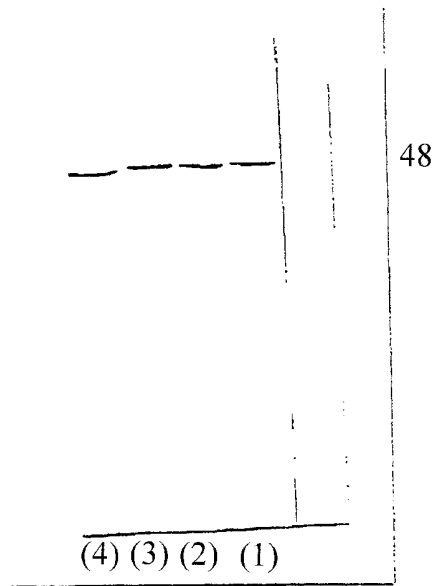


Fig. 4

# MD 1374 G2

21

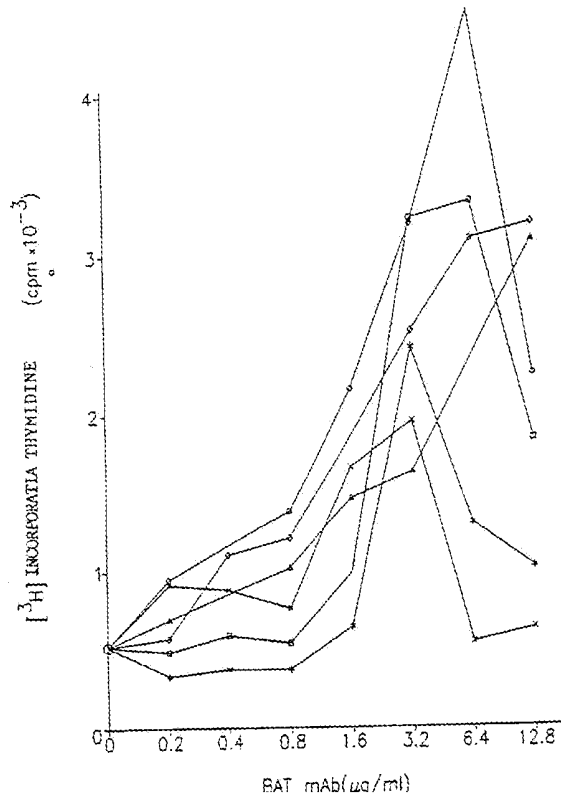


Fig. 5

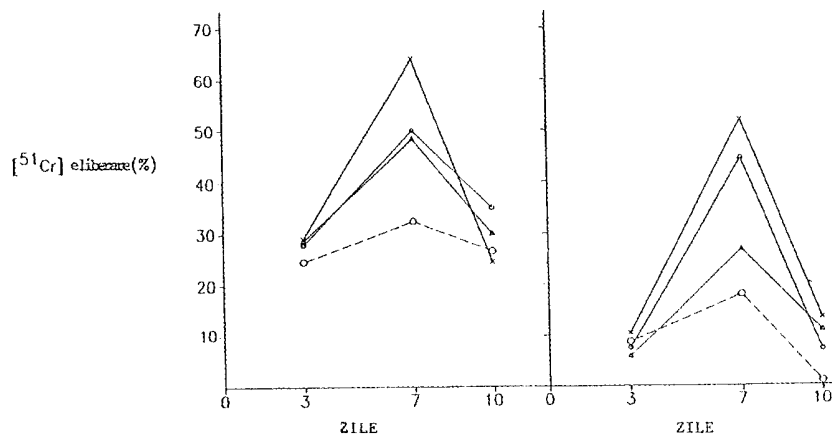


Fig. 6

# MD 1374 G2

22



Fig. 7

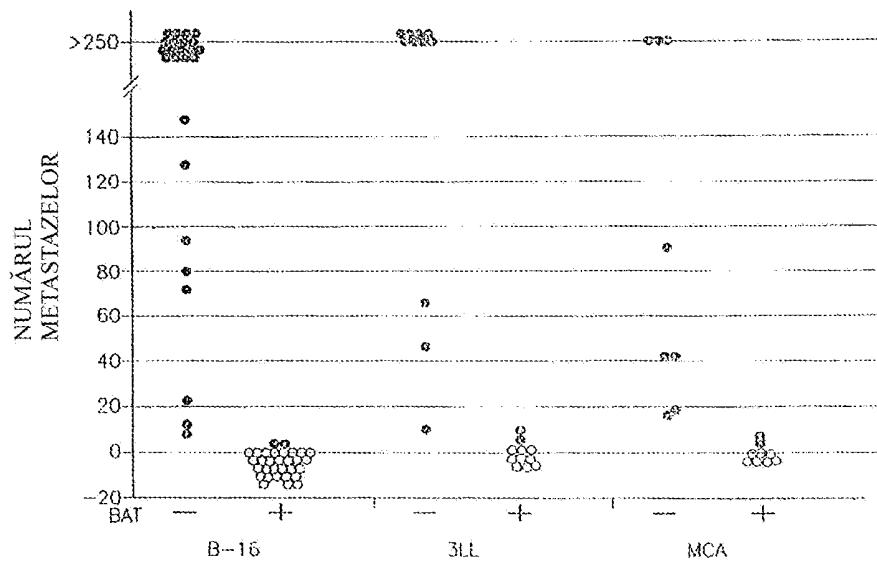


Fig. 8

MD 1374 G2

23

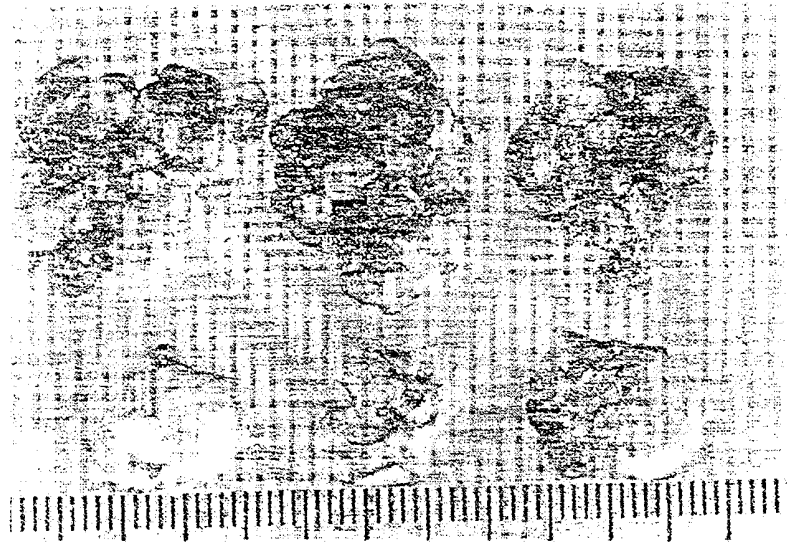


Fig. 9

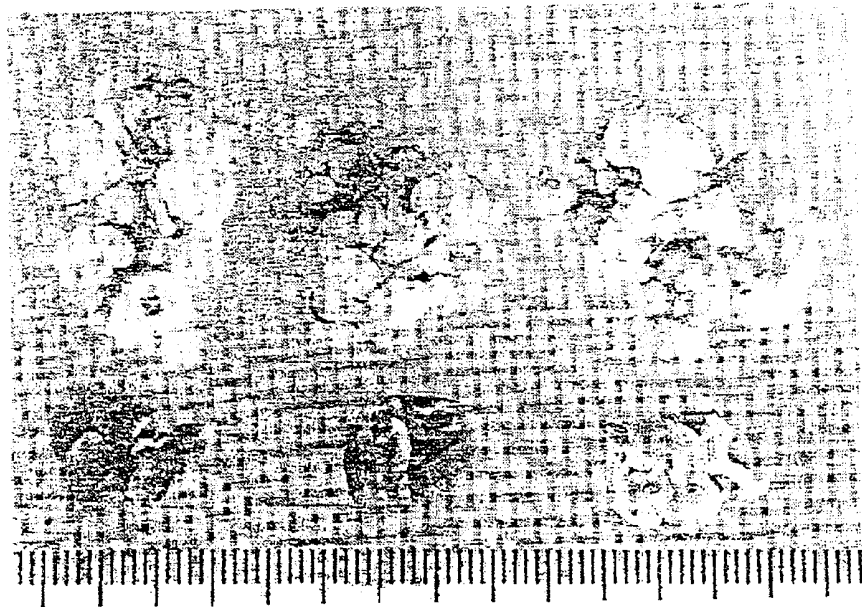


Fig. 10

