

SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES PARA O TRATAMENTO
DO CANCRO UTILIZANDO ANTI-CORPOS MONOCLONAIS
CONTRA GANGLIOSIDO G_{D3} COM IL-2"

Sumário da invenção

O anticorpo monoclonal, ou a sua porção F(ab')₂, específico para o gangliosido G_{D3} estimula a prolifracção de linfócitos em células T humanas.

Este efeito também demonstra a indução de receptores IL-2 e de secreção IL-2 pelos linfócitos, assim como um aumento na percentagem de células de G_{D3}⁺. Este efeito de estimulação das células T é aumentado por IL-2 exógeno, PHA e PMA.

Descrição resumida dos desenhos

A Figura 1, representa a coloração R24 de timócitos, timo fetal, gânglios linfáticos de adultos e linfócitos. A Figura 2 representa a cromatografia em camada fina e o rastreio densitométrico de preparações de gangliosidos.

A Figura 3 representa a inibição da reactividade do mAB R24 pelos gangliosidos purificados.

A Figura 4 representa a proliferação de linfócitos E⁺ com R24.

A Figura 5 representa o efeito mitogénico de diferentes concentrações de R24.

A Figura 6 representa uma análise, em citómetro de fluxo, de células E^+ estimuladas pelo anticorpo anti-CD3 (OKT-3) ou R24.

A Figura 7 representa o efeito do PHA do mBA anti-célula T e PMA sobre a proliferação de células E^+ induzida pelo mAB R24.

Memória descritiva

Descrição Pormenorizada dos Desenhos

Figura 1

Coloração imunofluorescente de timo fetal (a-c) e gânglio linfático adulto (d) com mAB R24. O mAB R24 reage com os timócitos nas áreas sub-corticais (a) em torno dos vasos sanguíneos (b) e próximo dos corpúsculos de Hassal (c). O mAB colora aglomerados de linfócitos nas áreas paracorticais (d). Amplificação original, 200x.

Figura 2

Cromatografia em camada fina e rastreio densitométrico de preparações gangliosídicas. a) Estimularam-se células E^+ com mAB R24 (100 $\mu\text{g/ml}$) durante 5 dias (μg = micrograma). Efectuou-se uma preparação de gangliosido de melanoma (MEL) a partir de um tumor metastásico de melanoma recente a partir de gânglios linfáticos axilares. b) Rastreio densitométrico da cromatografia de camada fina em a) _____, Rastreio de uma preparação de gangliosido de células E^+ ;-----, Rastreio de uma calha normalizada G_{D3} . A seta designa o pico do G_{D3} .

Figura 3

Inibição por gangliosidos purificados da reactividade do mAB R24 contra uma preparação de gangliosidos provenientes de células E⁺ não estimuladas. As barras representam um desvio padrão.

Figura 4

Tempo de decurso da proliferação dos linfócitos de E⁺ na presença (●) ou ausência (○) de mAB R24 (100 µg/ml).

A proliferação foi medida pela libertação de ³H-timidina, conforme descrito a seguir. Apresentam-se os resultados como a média e os 100% de uma série de experiências independentes (e o desvio padrão e o acumulado da libertação de ³H-timidina dos meios de controlo estava dentro dos 10% de valores médios).

Figura 5

Efeito mitogénico de diferentes concentrações de mAB R24 (Fig. 5a) ou fragmentos F(ab')₂ de mAB R24 (Fig. 5b). Os resultados apresentam-se como a libertação de ³H-timidina durante 1 a 5 dias de cultura. Cada ponto representa o meio de culturas triplicadas. Os 100% da série estão compreendidos nos 15% da média. A Figura 5a representa a proliferação de células E⁺ na ausência de anticorpos (meio de controlo). As concentrações de mAB R24 ou de fragmentos F(ab')₂ de mAB R24 encontram-se representadas na Figura: (200) = 200 µg/ml; (20) = 20 µg/ml; (2) = 2 µg/ml.

Figura 6

Análise por citometria de fluxo de células E⁺ estimuladas com o anticorpo anti-CD3 (OKT-3) (2,5 mg/ml) ou de mAB R24 (100 µg/ml). Incubaram-se as células E⁺ no início das culturas (dia 0) ou no dia 5 das culturas, com mAB R24 (10 µg/10⁶ células), seguindo-se a incubação com imunoglobulina de cabra-anti-murganho marcada com FITC (GAMIgFITC). Analisaram-se as células com um FACS IV. A: Coloração com mAB R24 + GAMIgFITC de culturas estimuladas anti-CD3 (OKT-3) (18% de células R24⁺) (dia 5) ou coloração com apenas GAMIgFITC (controlo). B: Intensidade de fluorescência de células E⁺ coradas com mAB R24 + GAMIgFITC no dia 0 (9,9% de células R24⁺) e no dia 5 (44% de células R24⁺) da cultura. A intensidade de fluorescência apresenta-se numa escala logarítmica.

Figura 7

Efeitos de PHA, anticorpos monoclonais anti-célula T (anti-CD2, anti-CD3, anti-CD8) e PMA sobre a proliferação de células E⁺ induzida pelo mAB R24. A proliferação induzida apenas pelo mAB R24, conforme medida pela libertação de ³H-timidina, apresenta-se a 100% e corresponde a 63426 ± 4729 cpm. As concentrações de mAB R24 foram de 100 µg/ml, PHA a 1% (v/v), OKT-3 250 µg/ml, OKT-11 1 µg/ml e OKT-8 1 µg/ml, PMA 5 ng/ml. Mediu-se a proliferação no 5º dia da cultura. Os resultados das experiências que se efectuaram nos dias 3 e 7 da cultura apresentaram o mesmo diagrama das experiências realizadas no dia 5.

Os gangliosídeos são uma classe de glicosfingolí-

pidos que contêm grupos oligossacáridos sialilados ligados a uma estrutura de núcleo lipídico. Apesar de não se conhecer a função exacta dos gangliosidos, tem sido sugerido que desempenham uma função na sinalização e reconhecimento celulares [Hakamori, S (1981) "Ann. Rev. Biochem." 50 : 733; Yu, R.K. e outros (1984) "Adv. Exp. Med. Biol." 174 : 87]. Tem-se considerado os gangliosidos específicos como receptores de vírus [Markwell, M.A.K., e outros (1981) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 78 : 5406; Bergelson, L.D. e outros "Eur. J. Biochem." 128 : 467 (1982); Suzuki, Y. e outros (1985) "J. Biol. Chem." 260 : 1362] e de toxinas [Fishman, P.H., (1982) "J. Membr. Biol." 69 : 85]. Outras provas sugerem que os gangliosidos podem modificar as funções do receptor de crescimento e alterar a afinidade destes receptores [Bremer, E.G., e outros (1984) "J. Biol. Chem." 259 : 6818; Bremer, E.G. e outros (1986) "J. Biol. Chem." 261 : 2434; Lacetti, P., e outros (1984) "Adv. Exp. Med. Biol." 174 : 355]. Tem-se prestado especial atenção à relação entre os gangliosidos e o crescimento e diferenciação de células de origem neuro-ectodérmica. Por exemplos os gangliosidos podem induzir a proliferação de células nervosas (dos neurónios), aumentar a formação de neurite [Ferrari G. e outros (1983) "Brain Res." 284 : 215; Tsuji, S. e outros (1983) "J. Biochem." (Tokyo) 94 : 303; Nakajuma, J. e outros (1986) "Biochem. Biophys. Acta." 876 : 65] e facilitar a adesão das células nervosas [Blackburr, C.C., e outros (1986) "J. Biol. Chem." 261 : 2873].

Provas experimentais sugerem que os gangliosidos e os anticorpos que se dirigem contra os gangliosidos podem

influenciar também as células do sistema imunológico [Marcus, D.M. (1984) "Mol. Immunol." 21 : 1083 Whisler, R.L., e outros (1980) "J. Immunol." 125 : 2106; Merrit, W.D. e outros (1984) "Cell. Immunol." 89 : 17. Descobertas recentes demonstraram que a ligação da subunidade B da toxina da cólera ao G_{M1} da superfície celular pode induzir a proliferação de timócitos de ratos [Spiegel, S., e outros (1985) "Science" 230 : 1285] e que os anticorpos monoclonais dirigidos contra o dissialogangliosido G_{D3} pode aumentar a resposta dos linfócitos aos mitogénios [Hersey, P. e outros (1986) "Aust. NZ. J. Med." 16 : 152]. Uma vez que estes resultados sugeriram que a ligação a gangliosidos específicos pode modular o crescimento de células linfocíticas, calculou-se o efeito nas células linfóides dos anticorpos monoclonais para os gangliosidos G_{D2} , G_{D3} e G_{M2} . Trabalhos anteriores demonstraram que os anticorpos monoclonais contra estes gangliosidos reagem principalmente com tipos de células derivadas da neuro-ectoderme [Real, F.X., e outros (1985) "Cancer Res." 45 : 4401; Saito, M., e outros (1985) "Biochem. Biophys. Res. Comm." 127 : 1; Natoli, E., e outros (1986) "Cancer Res." 46 : 4116]. No estudo presente, demonstra-se que os anticorpos para o G_{D3} também reagem com um subgrupo de timócitos de feto humano e com subpopulação de linfócitos nos gânglios linfáticos e no sangue periférico. A ligação polivalente de anticorpos monoclonais anti- G_{D3} e de fragmentos $F(ab')_2$ para linfócitos T, activa uma subpopulação de células G_{D3} positivas, induzindo a produção de IL-2, a expressão de receptores para o IL-2 e a proliferação celular.

Os exemplos seguintes servem para ilustrar a presente invenção sem a limitar aos exemplos específicos. Os equivalentes estão, também, englobados no âmbito da presente invenção.

Materiais e Métodos

Anticorpos Monoclonais e IL-2

Demonstrou-se que os anticorpos monoclonais de murganho (mAB) R24 (IgG3), C₅ (IgG3) e K9 (IgM) reagem com o G_{D3} [Dippold, W., e outros (1980) "Proc. Natl. Acad. SCI. USA" 77 : 6114; Rekel, C., e outros (1982) "J. Exp. Med. 155 : 1133]. O mAB 3F8 (IgG3) de murganho (uma revelação do Dr. Nai-Kong Cheung, Case-Western Reserve University, Cleveland, Ohio) reconhece o gangliosido G_{D2} [Saito, M., e outros (1985) "Biochem. Res. Comm." 127 : 1]; O mAB 10-11 (IgM) de murganho, reconhece o G_{M2} [Natoli, E., e outros (1986) "Cancer Res." 46 : 4116] e o mAB F 36/22 (IgG3) de murganho reage com uma glicoproteína de peso molecular elevado da superfície celular, espessa pelas células do carcinoma da mama, mas não pelas células linfóides [Papsidero, L.D., e outros (1984) "Cancer. Res." 44 : 4653]. O mAB R24 foi utilizado como sobrenadante de hibridoma ou foi preparado a partir de ascite de murganhos portadores de tumores de hibridoma. Purificaram-se as preparações de mABs R24, 3F8, C5 e F 36/22 de ascites, por precipitação com uma solução saturada de sulfato de amônio que se adicionou para proporcionar a concentração final de 35% (p/v). Para purificação adicional fez-se a aplicação das preparações do anticorpo IgG3 a uma coluna de proteína A em "Sepharose" (Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ) e eluiu-se

com tampão de citrato 0,5M/NaCl 0,15 M, a pH 4,0. As fracções de proteína eluída passaram através de uma coluna de "Sephadex G25 M" (Pharmacia, Inc.) e eluiu-se com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS), a pH 6,0. Os anticorpos monoclonais OKT-3, OKT-4, OKT-6, OKT-8 e OKT-11, conjugados ou não conjugados com FITC, foram adquiridos em "Ortho Diagnostics Systems" (Raritan, NJ). Os anticorpos OKT-3 e OKT-8 e OKT-11 foram intensamente dialisados antes de se utilizarem em ensaios de proliferação.

Os receptores anti-IL-2 dos anticorpos monoclonais marcados com FITC e Leu-2a, Leu-3a e Leu-4 conjugados com ficoeritrina (PE) foram adquiridos na "Becton-Dickinson, Inc. Mountainview, CA". O IL-2 recombinante foi amavelmente cedido por "Cetus" (Emeryville, CA).

Produção de Fragmentos F(ab')₂

Os mABs R24 ou 3F8 purificados em citrato de sódio 0,05 M/cloreto de sódio 0,15 M, a pH 4,0, foram digeridos com pepsina a 37°C, durante 5 minutos. Utilizou-se pepsina em uma quantidade que proporcionasse a obtenção da proporção enzima: Anticorpo de 1 : 33, em peso. Interrompeu-se a reacção adicionando um terço do volume de Tris 3M, a pH 8,6. O produto da digestão foi eluído sobre uma coluna de proteína A em "Sephrose" (Pharmacia, Inc.), equilibrada previamente com PBS, a pH 7,0. Recolheram-se os fragmentos F(ab')₂ e armazenaram-se a 4°C. A electroforese em gel com dodecil-sulfato de sódio/poliacrilanida (SDS/PAGE) sob condições de não redução, revelou uma banda única de 122000 daltons. A coloração por imunofluorescência de um painel de linhas de célu-

las R-24-positivas e R24-negativas (11 R24⁺ de melanomas e 11 R24⁻ de carcinomas) confirmou que a especificidade das preparações de F(ab')₂ de R24 foi a mesma da globalidade de IgG R24.

Coloração de Tecidos Normais

Obtiveram-se os gânglios linfáticos humanos adultos histologicamente normais, a partir de espécimes de patologia cirúrgica de pacientes sem cancro, ao fim de 1 - 2 horas após ressecção. Obtiveram-se os espécimes de timo fetal a partir de abortos escolhidos. A idade gestacional do feto foi determinada por medidas do perímetro cefálico, perímetro pélvico e de peso. Mergulharam-se os tecidos em isopentano, previamente arrefecido em azoto líquido, embeberam-se no composto OTC em criomoldes (Miles labs, Inc. Naperville, IL) e armazenaram-se a 70°C.

As reacções de tecido de corte criostático (4-8 micra de espessura) utilizaram-se não fixas ou fixas com acetona a 4-8°C, durante 10 minutos. Coaram-se as secções de tecido por imunofluorescência indirecta ou métodos de peroxidase, conforme descrito antes [Cordon-Cardo, C. e outros (1986) "Int. J. Cancer" 37 : 667]. Resumidamente, fez-se a incubação das secções de tecido em soro supressor de cabra (10% v/v) durante 20 minutos e depois em anticorpo primário durante 1 hora. Utilizou-se o mAB R24 em concentrações compreendidas entre 20 - 40 µg/ml sob a forma de sobrenadante de hibridoma ou de ascite de murganho purificada. Para coloração por imunofluorescência, fez-se a incubação das secções durante 45 minutos com um anticorpo secundário marcado por

fluorescência anti-IgG de murganho (Cappell Labs, Cochranville, PA) e examinou-se com um microscópio equipado com epifluorescência com uma lâmpada de mercúrio de 100 watts. Para coloração com imunoperoxidase, os tecidos foram tratados com 0,01% de H₂O₂ em PBS durante 10 minutos, fez-se o bloqueio com soro supressor e procedeu-se à incubação com o anticorpo primário, conforme descrito antes. Os anticorpos secundários foram conjugados com peroxidase de rábano bravo ("horseadish peroxidase") (Ortho Diagnostics, Inc. Raritan, NJ). Utilizou-se a diaminobenzidina como um cromogénio. Após coloração, as secções foram entrastadas com hematoxilina e procedeu-se à montagem.

Células Mononucleares do Sangue Periférico

Separaram-se as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de doadores humanos, por centrifugação em gradiente de densidade num "Ficollhyspaque" [Boynm, A., (1976) "Scand. J. Immun." 5 (Suppl. 5) : 97]. Lavaram-se as células três vezes em meio RPMI 1640 enriquecido com 2 mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina e 10% de soro de feto de bovino inactivado pelo calor (FBS).

Conservaram-se as células neste meio durante todos os procedimentos de incubação e lavagem subsequentes.

No sentido de se recolherem as células aderentes, fez-se a incubação de até 3×10^7 PBMC durante 90 minutos a 37°C em 5% de CO₂ num volume total de 10 ml, em recipientes de cultura de tecidos "Falcon 3003" (Falcon Labware Div., Becton - Dickinson, Oxnard, CA). Separaram-se as células não aderentes rodando cuidadosamente os recipientes e pipetando

lentamente o meio. Lavaram-se os recipientes três vezes com o meio e recolheram-se as células aderentes utilizando uma espátula de borracha. A fracção de células aderentes continha mais do que 90% de monócitos/macrófagos, conforme se verificou por coloração com alfa-naftil-acetato-estearase.

Separação dos Linfócitos T

Para isolar as células T, tingiram-se de cor-de-rosa as PBMC não aderentes, com glóbulos vermelhos de ovelha tratados com neuraminidase, de acordo com um método modificado por Weiner e outros [Weiner, M.S., e outros (1973) "Blood" 42 : 939]. Esta fracção continha menos do que 2% de monócitos/macrófagos e mais do que 90% de células que reagiram com o anticorpo monoclonal OKT-3. Esta população celular designa-se por : "células E⁺".

Análise dos Antígenios de Superfície dos Linfócitos

Para ensaios indirectos de imunofluorescência, fez-se a incubação de 10^6 PBMC em 0,1 ml com diluições apropriadas do anticorpo monoclonal não conjugado, durante 30 minutos em gelo, lavaram-se três vezes com PBS/2% de albumina de soro de bovino (BSA) frio e, depois, fez-se a incubação em gelo com 0,1 ml de uma diluição a 1 : 40 de anti-IgG F(ab')₂-FITC do murganho desenvolvida na cabra e purificada por afinidade (Cappel Lab. Cochranville, PA). Para duas análises de cor, lavaram-se mais três vezes as células e incubaram-se com 0,02 ml de anticorpo monoclonal marcado com PE, durante 30 minutos em gelo. Lavaram-se as células três vezes e ajustaram-se para uma concentração de 1×10^6 células/ml

para análise por citometria de fluxo. Determinou-se a fluorescência de contraste testando com anticorpos de murganho de controlo (adequadamente marcados) em vez do anticorpo de ensaio. Para fluorescência directa, fez-se a incubação de 10^6 células durante 30 minutos com o anticorpo monoclonal directamente conjugado com FITC, lavaram-se três vezes e fez-se uma nova suspensão para análise.

Analisaram-se as células por citometria de fluxo, utilizando um citofluorografo H-50 (Ortho Diagnostic Systems, Inc. Raritan, NJ) ou um FACS IV (Becton-Dickinson). Gerou-se um citograma de fluorescência verde segundo um ângulo recto em função de um ângulo de dispersão desfasado com avanço, no sentido de demarcar a vizinhança da região com interesse (isto é, para diferenciar as células linfocíticas, monocíticas e granulocíticas) e excluir os detritos celulares e as células moribundas. Quando se utilizou o citofluorógrafo H-50, instalou-se na vizinhança das células linfocíticas um laser de iões de árgon sintonizado para 488 nm na vizinhança da região demarcada. A partir desta região demarcada geraram-se histogramas de fluorescência verde (FITC). Para fluorescência a duas cores, determinou-se e analisou-se a fluorescência verde (FITC) em função da vermelha (PE). Analisaram-se para cada histograma um mínimo de 10 000 células e determinou-se a percentagem de células positivas por comparação com a marcação pelo anticorpo de controlo. Estimaram-se os dados utilizando um sistema computarizado "Data General", modelo 2150.

Ensaio de Proliferação

Faz-se a incubação separada de células PBMC ou E⁺ em micro-recipientes de cultura em triplicado (Costar 3595 placas, Costar Inc. Cambridge, MA) na presença ou ausência de mAB R24. Outros factores avaliados nos ensaios de proliferação englobam o IL-2 recombinante (Cetus Corporation), fito-hemaglutinina (PHA) (Gibco Labs, Grand Island, NY), forbol-miristato-acetato (PMA) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO), e proteína A (Pharmacia, Inc.). Em determinados momentos certos, removeram-se 100 µl de sobrenadante de cada recipiente para se ensaiar a actividade IL-2. Em momentos específicos, as culturas triplicadas foram batidas durante 4 horas em ³H-timidina (0,5 µCi/recipiente, New England Nuclear, Boston, MA) e mediu-se a libertação de ³H-timidina conforme descrito antes [Welte, K., e outros (1983) "J. Immunol" 131 : 2356].

Ensaio Para a Actividade IL-2

Para os ensaios de IL-2, utilizou-se uma linha de células citotóxicas T de murganho dependentes do IL-2, conforme descrito antes [Welte, K., e outros (1983) supra]. Neste ensaio uma unidade de actividade é equivalente a uma unidade de actividade do padrão IL-2 do programa "Biological Response Modifier", National Institutes of Health.

Lise Medida por Complemento das Células Positivas R24

Ajustaram-se as células E⁺ para uma concentração de 10⁶ células/ml. Fez-se a incubação das células E⁺ à tempe-

ratura ambiente com diferentes concentrações de mAB R24 (100, 10, 1 µg/ml) durante 1 hora, lavaram-se e incubaram-se com uma fonte de complemento (soro humano, previamente rastreado, diluído a 1: 8 em meio tamponado com Veronal) a 37°C durante 2 horas. Lavaram-se três vezes as células e fez-se nova suspensão para utilização em ensaios de proliferação. Trataram-se as células de controlo com PBS, seguindo-se apenas a fonte complementar ou com mAB R24 (100 µg/ml) seguindo-se o meio tamponado com Veronal sem fonte do complemento.

Preparação e Avaliação dos Gangliosidos

Purificou-se o G_{D3} a partir de tecido de melanoma humano e purificou-se o G_{D2} a partir de cérebro humano, conforme descrito a seguir. O G_{M1} foi adquirido em Sulpeco, Inc. (Bellafonte, PA). Preparou-se o G_{M2} por tratamento do G_{M1} com beta-galactosidase (do Dr. George W. Jourdian, University of Michigan, Ann Arbor, MI) conforme descrito por Cahan e outros [Cahan, D.L., e outros (1982) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 79 : 7629]. Verificou-se a pureza das preparações gangliosídicas mediante cromatografia de camada fina.

Isolaram-se os glicolípidos por uma modificação do método descrito por Saito e Kahamori [Saito, T. e outros (1971) "J. Lipid Res." 12 : 257]. Resumidamente. homogeneizaram-se as células em clorofórmio: metanol (C:M) a 2 : 1 e extraíram-se num volume 100 vezes superior de C:M. Filtrou-se o homogeneto e tornou a extrair-se duas vezes em C:M, primeiro a 1 : 1, depois a 1 : 2. Evaporaram-se os filtrados num evaporador rotativo, acetilaram-se, fez-se o desenvolvimento numa coluna de florisil, desacetilaram-se e fez-se a

diálise em H_2O durante 24 horas. Depois, fez-se uma nova evaporação e suspensão da amostra em C : M : H_2O (30:60:80) e aplicou-se a uma coluna de "Sephadex-DEAE" (Pharmacia, Inc.) equilibrada com C : M : 0,8 M de acetato de sódio (30:60:8).

Para análise por cromatografia de camada fina, activaram-se placas de gel de sílica (Analtech, Newark, Delaware), aquecendo-as a $100^{\circ}C$ durante 1 hora. Utilizou-se N-propanol : hidróxido de amónio : H_2O (60:95:11,4) para desenvolver as cromatografias. Após o solvente ter migrado 12 cm a partir da origem, secaram-se as placas ao ar, colocaram-se em estufa durante 10 minutos a $120^{\circ}C$, arrefeceram-se até à temperatura ambiente e aspergiram-se com resorcinol-HCl. Avaliou-se a densitometria utilizando um cromatógrafo de camada fina Shimadan C5 - 930 (Kyoto, Japan).

Imuno-Ensaio ligado a Enzimas para a Reactividade do mAB com os Gangliosidos

Colocaram-se as preparações gangliosídicas a partir de células E^+ em placas de microteste (Bellco Glass, Inc. Vineland, NJ). Secaram-se as placas ao ar durante duas horas e fez-se o bloqueio com BSA a 1%, durante 2 horas. Fez-se a incubação de 20 $\mu g/ml$ de mAB R24 com diversas concentrações de preparações gangliosídicas durante 2 horas, e, depois, adicionaram-se às placas de microteste e fez-se a incubação durante uma hora à temperatura ambiente. Lavaram-se três vezes as placas e fez-se a incubação durante 45 minutos com anti-IgG de murganho conjugada com fosfatase alcalina (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) diluída a 1 : 200. Lavaram-se as placas e fez-se a incubação com substrato de dietanolami-

na durante 20 minutos a 37°C. Avaliou-se a reactividade num leitor "Artec Systems Corp.", modelo 210 (Farmingdale, NJ).

Radio-imunoprecipitação e Marcação de Western

Testou-se a capacidade do mAB R24 para reagir com antígenos de proteína ou de glicoproteína de células E⁺ não estimuladas ou de células E⁺ estimuladas com mAB R24 (100 µg/ml). Prepararam-se extractos a partir de células E⁺ solubilizadas com detergentes (em NP-40 a 0,05%, 0,01 M de Tris, pH 7,5, 0,15 M de NaCl e 2 mM de MgCl₂), ou a partir de extractos tratados por ultra-sons de preparações de membrana solubilizadas em SDS a 2% (p/v). Marcaram-se os extractos com ¹²⁵I pelo método da cloramina T [Greenwood, F.C., e outros (1963) "Biochem. J." 89 : 114]. Fez-se a incubação durante 1 hora do mAB R24 anti-HLA A, B, C, anticorpo W6/32 [Barnstable, C. J., e outros (1978) "Cell" 14 : 9], OKT-3 ou anti-soro de controlo (soro de murganho normal) com extractos marcados e anti-IgG de murganho desenvolvida no coelho, a 4°C, seguindo-se a imunoprecipitação com proteína A em "Sepharose" (Pharmacia, Inc.), conforme descrito antes [Lloid, K.O. e outros (1981) "J. Immunol." 126 : 2408]. Eluíram-se os imunoprecipitados com SDS a 2% e analisaram-se em geles a 9% em SDS/PAGE.

Efectuou-se a marcação de Western conforme descrito [Towbin, H. e outros (1979) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 76 : 4350]. Separaram-se os extractos por SDS/PAGE e transferiram-se para nitrocelulose (Schleicher e Schuell, Keene, NH) ou membranas "Zeta Probe" (BioRad Labs, Richmond,

CA) durante 1,5 - 3 horas a 70 V (230 mA) com arrefecimento. Secaram-se as membranas, incubaram-se com mAB R24, seguindo-se anti-IgG de murganho desenvolvida na cabra, marcada com peroxidase de rábano bravo e desenvolveram-se com diaminobenzidina/H₂O₂.

Os exemplos seguintes servem para ilustrar a invenção e não se pretende que esta fique limitada à especificidade dos exemplos.

Exemplo I

O mAB R24 reage com Timócitos e Linfócitos

Descobriu-se que o mAB R24 reage com sub-populações de células nos tecidos do timo de três fetos de 12 - 14 semanas de idade. Os timócitos R24⁺ estão localizados nas áreas sub-cordicais e nos aglomerados na vizinhança dos vasos sanguíneos e dos corpúsculos de Hassal (Figura 1a - c).

Observaram-se resultados idênticos nos tecidos tingidos por técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase. No sentido de confirmar que o mAb R24 reagia com os timócitos, tingiram-se 4 micro-seções consecutivas com mAbs R24 ou OKT-6; demonstrou-se que as células R24⁺ reagem com o marcador de timócitos OKT-6. Nos Gânglios linfáticos derivados de adultos saudáveis o mAb R24 tingiu pequenos cachos de linfócitos na vizinhança dos vasos sanguíneos, nas áreas interfoliculares e pericorticais (Figura 1d).

O mAb R24 reagiu com $13,9 \pm 5,5\%$ (desvio padrão S.D.) da PBMC de 13 indivíduos saudáveis (intervalo de 7,4 - 24,3% de células positivas R24). A análise por citometria

de fluxo bicolor para o PBMC demonstrou que o mAb R24 reagiu com a sub-população de linfócitos T. Nas restantes células T derivadas do sangue periférico de 13 pessoas saudáveis, o mAb R24 reagiu com $14,8 \pm 5,7\%$ (S.D.) de células $CD3^+$ (intervalo de 5,0 - 25,5%) com $20,1 \pm 11,7\%$ (S.D.) de células $CD8^+$ (intervalo de 7,0 - 44,0%) e com $14,0 \pm 6,7\%$ (S.D.) de células T $CD4^+$ (intervalo de 6,0 - 29,7%).

Exemplo II

O mAb R24 Reage com o Gangliosido G_{D3} nos Linfócitos T

Para confirmar que o mAb R24 reagiu melhor com o G_{D3} do que com outros componentes da superfícies das células T, demonstrou-se que o determinante antigénico detectado pelo mAb R24 possuía as características de um gangliosido. A reactividade do mAb R24 com as células E^+ destruiu-se tratando previamente as células alvo com neuraminidase e etanol, consistente com as propriedades de um glicolípido sililado mas, não foi afectada pela protease e pela tripsina. Demonstrou-se que o G_{D3} era um componente gangliosídico menor das preparações glicolípidas ácidas de células E^+ do sangue periférico estimuladas com mAb R24 durante 5 dias (Figura 2a). Nas células E^+ estimuladas, o G_{D3} constitui 3 - 5% dos gangliosidos totais (Figura 2b), enquanto as células E^+ não estimuladas contêm níveis inferiores de G_{D3} . O mAb R24 reagiu com uma fracção gangliosídica purificada derivada das células T do sangue periférico e esta reactividade foi especificamente inibida por G_{D3} purificado, mas não por G_{M2} , G_{M3} ou G_{D2} (Figura 3). Estes resultados demonstraram que o mAb R24 de-

tectou o gangliosido G_{D3} nas células T e que o mAb R24 não reagiu com os outros gangliosidos presentes na preparação de células T. Finalmente, o mAb R24 não reagiu com os componentes ~~proteicos das células~~ E^+ do sangue periférico, por análise de marcação de Western ou por radio-imunoprecipitação dos extratos marcados com ^{125}I pelo método da cloramina T.

Exemplo III

O mAb R24 Induz a Proliferação de Linfócitos E^+

Descobriu-se que o mAb R24 estimula o crescimento de células PBMC e de células E^+ . A cinética da libertação da 3H -timidina pelas células cultivadas na presença de 100 $\mu g/ml$ de mAb R24 encontra-se representada na Figura 4. A proliferação máxima observou-se decorridos 5 a 7 dias de estimulação. A Figura 5a representa o efeito de diversas concentrações de mAb R24 sobre a proliferação de células E^+ entre 2 e 5 dias de cultura. Observou-se a resposta de proliferação dependente da dose em todos os pontos testados. Uma concentração de 20 $\mu g/ml$ proporcionou um acréscimo significativo na libertação de 3H -timidina sobre o meio de cultura (em cultura apenas no meio) em todos os dias testados. Para concentrações tão baixas como 2 $\mu g/ml$, o mAb R24 ainda produziu um acréscimo detectável na proliferação.

Para determinar que a estimulação das células T era devida especificamente ao anticorpo que reage com G_{D3} , ensaiou-se um segundo anticorpo IgG3 (mAb C5) e dirigiu-se um anticorpo IgM (mAb K9) contra o G_{D3} . Ambos os anticorpos anti- G_{D3} induziram a proliferação de células T (Tabela 1)

(A proliferação induzida pelo mAb C5 foi idêntica aos resultados com o mAb R24). Os anticorpos monoclonais que reconhecem outros gangliosidos, incluindo um IgG3 contra o G_{D2} e um IgM contra o G_{M2} , não estimularam as células T. De modo idêntico, um IgG3 de controlo (mAb F36/22) que não reconhece gangliosidos nem reage com células T, não estimulou as PBMC ou as células E^+ . Excluiu-se a possibilidade de os anticorpos ou substâncias de contaminação (por exemplo, proteína A) serem responsáveis pela estimulação de células T. O mAb R24 preparado por diversos métodos induziu níveis idênticos de proliferação de células E^+ em concentrações proteicas equivalentes. A estimulação foi produzida por sobrenadantes a partir do hibridoma R24, de ascites não purificadas de murghos portadores de hibridoma R24 e de ascites purificadas por precipitação com sulfato de amónio com ou sem cromatografia por afinidade de proteína A (Tabela 1). A própria proteína A induziu apenas uma proliferação mínima de células E^+ (2379 ± 145 cpm, libertação de 3H -timidina ao 5º dia com $5 \mu\text{g/ml}$ de proteína A).

Exemplo IV

Os Fragmentos $F(ab')_2$ de R24 estimulam as Células T

Para excluir a possibilidade do mAb R24 estimular as células T através da porção Fc da molécula, isolaram-se fragmentos $F(ab')_2$ de mAb R24 por digestão com pepsina. A Figura 5b demonstra a libertação de 3H -timidina das PBMC durante a estimulação para diferentes concentrações (2, 20 e $200 \mu\text{g/ml}$) de fragmentos $F(ab')_2$ de mAb R24. A incubação

de células com fragmentos F(ab')₂ de um anticorpo monoclonal IgG3 de controlo, mAb 3F8 (anti-G_{D2}), não produziu acréscimo na proliferação. O nível de proliferação durante a estimulação com fragmentos F(ab')₂ foi de metade do nível da proliferação induzida pela mesma concentração de moléculas de anticorpo R24 intactas [por exemplo, 30 000 cpm para 200 µg/ml de mAb R24 total contra 18 000 cpm com 200 µg/ml de F(ab')₂].

Exemplo V

O mAb R24 Induz a Produção de IL-2 e a Expressão do Receptor para IL-2

Detectou-se a produção de IL-2 durante a estimulação de células E⁺ pelo mAb R24, numa cultura de sobrenadantes entre o 1º e o 5º dias (Tabela 2). Pelo 7º dia não havia IL-2 mensurável nos sobrenadantes da cultura. O tempo decorrido para a produção de IL-2 foi diferente do da indução por outros mitógenos em que se produz IL-2 durante os primeiros dias de estimulação [Welte, K., e outros (1983) "J. Immunol." 131 : 2356]. A Tabela 2 pormenoriza a percentagem de células E⁺ positivas receptoras de IL-2 até ao 7º dia em cultura. Detectou-se a expressão do receptor IL-2 por ensaios com anticorpo monoclonal, mas não se distinguiram os receptores de elevada afinidade e de baixa afinidade. Os resultados de três experiências independentes efectuadas com células E⁺ de três doadores saudáveis diferentes, demonstraram que a percentagem de células positivas receptoras de IL-2 subiu desde menos do que 3% inicialmente até aproximadamente 50% pelo 7º dia.

Exemplo VI

A Estimulação pelo mAb R24 Aumenta a Proporção de Células R24

A estimulação de células E^+ e de PBMC com o mAb R24 produziu um acréscimo na percentagem de células $R24^+$. Análises sequenciais de células E^+ estimuladas por citometria de fluxo demonstraram que a proporção de células $R24^+$ subiu significativamente entre o 5º e o 7º dias (Tabela 1 e Figura 6). Na figura 6 apresenta-se a intensidade de coloração imunofluorescente de células estimuladas pelo mAb R24. A intensidade de coloração foi heterogênea; contudo, a coloração mais brilhante após estimulação observou-se, em grande extensão, nas células semelhantes a blastos quando se analisaram por 0^\pm e se dispersou a 90° por citometria de fluxo, sugerindo que foi a população de linfócitos $R24$ positiva que estava a proliferar e a expandir-se durante a estimulação. A análise das PBMC originou percentagens idênticas de células positivas $R24$: 26% no 2º dia, 33% no 3º dia, 36% no 5º dia e 39% no 7º dia. Quando se utilizou como estimulador o anticorpo anti-CD3 (OKT-3), a percentagem de células $R24^+$ não aumentou durante os 5 dias de cultura (Figura 6).

Exemplo VII

A Mitogenicidade Induzida pelo mAb R24 Depende da Presença de Células $R24^+$

A depleção de células $R24^+$ a partir de células E^+ por lise com o mAb R24 e complemento humano originou uma redução na proliferação induzida pelo mAb R24 (Tabela 3). O

grau de diminuição na proliferação estava relacionado com a concentração de mAb R24 utilizada para a lise intermédia complementar e com a proporção das restantes células R24⁺ da cultura. Quando a lise das células R24⁺ estava virtualmente completa, houve uma anulação completa da estimulação de células E⁺ pelo mAb R24.

Exemplo VIII

A Proliferação Induzida pelo mAb R24 Ocorre em Culturas com Deplecção de Macrófagos

O mAb R24 induziu estimulação equivalente nas culturas de PBMC contendo 10 - 20% de macrófagos e culturas de células E⁺ com deplecção de macrófagos (confirmado por análise de citometria de fluxo) conforme medido pela expressão dos receptores IL-2 e pelo nível de proliferação celular (Tabela 4). O PHA e o anti-mAb CD3, dois mitogénios que exigem células acessórias, não estimularam estas culturas E⁺ com deplecção de macrófagos. Quando se adicionaram novamente macrófagos às células E⁺ (até 5% e 10% do número final de células), não houve alteração na indução da proliferação pelo mAb R24 (Tabela 4).

Exemplo IX

Efeitos de Outras Células T Mitogénicas ou Co-estimuladas na Estimulação Induzida nas Células T pelo mAb R24

Avaliou-se a influência potencial de outras células T, que se demonstrou serem mitogénicas, na proliferação de células T induzida pelo R24. A Figura 7 apresenta os re-

sultados de experiências representativas (ao 5º dia de cultura). O PHA em concentrações de 1% (v/v) aumentou aproximadamente 1,5 vezes a proliferação de células E⁺ induzida pelo R24, embora o PHA a 1% apenas seja minimamente mitogénico (menos do que 10% do nível de proliferação atingido com PHA a 1% na presença de macrófagos). A estimulação com anti-CD3 (OKT-3) também está dependente da presença de macrófagos. O anti-CD3 em concentrações de 2,5 ng/ml, 25 ng/ml e 250 ng/ml não aumentou nem inibiu a estimulação de células E⁺ com depleção de macrófagos, induzida pelo R24 (Figura 7).

O anti-CD2 (OKT-11) não induziu a estimulação de células E⁺ quando utilizado sózinho, mas o anti-CD2 inibiu a proliferação induzida pelo mAb R24 (60% de inibição a 1 µg/ml e 33% de inibição a 100 ng/ml) (Figura 7). O anti-CD8 (OKT-8), que pertence à mesma sub-classe do anti-CD2 e do anti-CD3 e é conhecido por inibir a produção de IL-2 e a proliferação induzida pelo anti-CD3 [Welte, K., e outros (1983) supra] não inibiu nem aumentou a estimulação pelo mAb R24. O éster de forbol, PMA, um potente activador da proteoquinase C [Nishizuka, Y (1986) "Science" 233 : 305] e um co-estimulador para a proliferação induzida pelo anti-CD3 nas células T, com depleção de monócitos [Hara, T., e outros (1985) "J. Exp. Med." 161 : 641] aumentou em mais do dobro a proliferação induzida pelo R24 (Figura 7). A proliferação induzida pelo mAb R24, conforme medida por libertação de ³H-timidina, foi o resultado da produção de IL-2 e da expressão do receptor IL-2 (Tabela 1). Para se testar se o IL-2 exógeno podia aumentar a proliferação induzida pelo mAb R24, adicionou-se IL-2 recombinante (100 U/ml) a culturas estimuladas pelo

mAb R24. Conforme se apresenta na Tabela 5 o IL-2 exógeno aumentou substancialmente a proliferação de células E⁺, quando comparado com a estimulação feita apenas pelo mAb R24.

Exemplo X

Demonstra-se na Tabela 6 seguinte que a proteína A (material recombinante de Pharmacia Corp., Piscataway, N.J.) também aumenta a proliferação de células T e pode servir com um agente estimulador, conforme indicado.

Tabela 6

Efeito da Proteína A na Proliferação de Linfócitos

Proliferação (libertação de ³H-timidina no 3º dia de cultura)

Meio	65 cpm
R 24 (100 µg/ml)	17443 cpm
Proteína A (5 µg/ml)	2426 cpm
Proteína A (0,5 µg/ml)	1558 cpm

Em referências anteriores demonstrou-se que o dissialogangliosido G_{D3} está expresso nos tipos de células derivadas da neuro-ectoderme, incluindo melanócitos, células de medula adrenal, glia, neurómios e nas células dos ilhéus do pâncreas [Real, F.X., e outros (1985) "Cancer Res." 45 : 4401]. Com a descoberta de que o G_{D3} se exprime por uma sub-população de timócitos e linfócitos do sangue periférico,

o G_{D3} junta-se a uma classe de antigénios partilhados pelas células da neuro-ectoderme e pelas células do sistema imunitário. Uma vez que ambas as linhagens são abundantes em células cuja junção primária é a comunicação célula a célula, é possível que o G_{D3} possa desempenhar um papel crucial na sinalização celular nestas vias de diferenciação. No estudo actual, demonstra-se que a ligação ao G_{D3} induz a activação das células T, incluindo a expressão dos receptores IL-2, a produção de IL-2 e a proliferação celular. Podem estimular-se as células T por IgM, IgG e fragmentos F(ab')₂ que reagem com o G_{D3} . Estes resultados são consistentes com a interpretação de que a união e as ligações cruzadas do G_{D3} sobre a superfície das células T conduzem a um sinal para activação.

Como o soro contém G_{D3} , é possível que o G_{D3} da superfície dos linfócitos seja o resultado de adsorção passiva.

Contudo, diversas linhas de evidência sugerem que o G_{D3} é sintetizado activamente pelas células T. Em primeiro lugar, o G_{D3} é expresso selectivamente em níveis elevados por apenas uma pequena sub-população de células T em vez de o ser por uma ampla população de células. Em segundo lugar, o número de células T que exprimem o G_{D3} aumenta substancialmente em cultura de tecidos na presença de anticorpos anti- G_{D3} . Em terceiro lugar, o G_{D3} pode detectar-se nas células T de linhas celulares leucémicas assim como em células linfocíticas leucémicas recentes. Demonstrou-se, a este respeito, que o nível de expressão de G_{D3} pelas linhas celulares CEL de células T leucémicas, aumenta durante a es-

timulação com o éster de forbol, PMA [Kignebi, K. e outros (1986) "Cancer Res." 46 : 3027].

Demonstrou-se que os gangliosidos interferem nos sinais e receptores que influenciam o crescimento e diferenciação celulares. Descobriu-se que adicionando exogenamente gangliosidos às células em crescimento se altera a afinidade de ligação dos factores de crescimento para os seus receptores e se afecta o estado de fosforilação da tirosina dos receptores dos factores de crescimento [Bremer, E.G. e outros (1984) "J. Biol. Chem." 259 : 6818; Bremer, E.G. e outros (1986) "J. Biol. Chem." 261 : 2434]. Diversas moléculas glicoproteicas da superfície das células T, podem ser intermediárias na activação das células T, incluindo o receptor IL-2, o complexo molecular Ti/CD3 e o antigénio CD2 [Weiss, M.J. e outros (1984) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 81 : 6836]. A activação por estes receptores exige, geralmente, células auxiliares receptoras positivas Fc, tais como macrófagos e componentes solúveis (por exemplo, IL-1) ou PMA [Hara, T. e outros (1985) "J. Exp. Med." 161 : 641]. Uma excepção é o receptor CD2 que se expressou prematuramente nas células T em diferenciação no timo [Mener, S.C. e outros (1984) "Cell" 36 : 897]. A activação por ligação a G_{D3} , tal como a activação mediada por CD2, não parece depender de células auxiliares. Apesar da diversidade de receptores da superfície celular disponíveis para activação supõe-se que existem apenas vias limitadas disponíveis por transdução de sinais no interior das células [Nishizuka, Y. (1986) "Science" 233 : 305; Imboden, J.B. e outros (1985) "J. Exp. Med." 161 : 446]. Não é evidente que a ligação do G_{D3} pelo mAB inicie a acti-

vação ao nível dos conhecidos ligantes receptores superficiais ou através de um complexo receptor separado ainda não identificado. Diversas referências sugeriram que os gangliosídeos extracelulares podiam ligar o IL-2, inibindo assim a proliferação de linfócitos induzida por um mitogénio [Robb, R.J. (1986) "J. Immunol" 136 : 971; Parker J., e outros (1984) "FEBS letters" 170 : 391]. Neste caso, os gangliosídeos podem competir contra a reactividade IL-2, por remoção ou inactivação de IL-2. Para além da sua possível reactividade com a molécula IL-2 solúvel, Robb e outros [Robb, R.J. (1986) "J. Immunol." 136 : 971] demonstraram que os gangliosídeos são susceptíveis de diminuir a expressão do receptor IL-2 (antígeno Tac) nos blastos induzidos por PHA. Estes resultados sugerem que os gangliosídeos celulares podem estar envolvidos na supressão da expressão do receptor IL-2 das restantes células T. Neste modelo, a ligação de IL-2 ou de anticorpos a gangliosídeos críticos nas células T, poderão permitir a expressão total dos receptores IL-2. Isto também poderá ser compatível com a observação de que o IL-2 seja susceptível de regular muito bem o seu próprio receptor [Reem, G.H. e outros (1984) "Science" 225 : 429; Welte, K. e outros (1984) "J. Exp. Med." 160 : 1390] e que um efeito proeminente do mAb R24 nas células seja a indução da expressão dos receptores IL-2. Isto também é suportado pelo acréscimo substancial na proliferação de células E⁺ estimuladas pelo mAb R24 na presença de IL-2 exógeno (Tabela 5). A estimulação das células T pelos anticorpos anti-G_{D3} pode ser aumentada por IL-2 exógeno, PHA e PMA, mas não pelo mAb anti-CD3. A inibição da

activação mediada pelo G_{D3} pelos anticorpos monoclonais para CD2 sugere que o G_{D3} pode estar associado com a molécula CD3, mas existem outras explicações possíveis para esta descoberta, por exemplo, desregulação da activação mediada por CD3 por ligação a CD2 [Mener, S.C. e outros (1983) "Science" 222 : 1239]. Pensa-se que as células T de G_{D3}^+ sejam essenciais para a activação inicial pelo mAb R24 uma vez que a depleção desta população anula a resposta proliferativa. Embora seja possível que a estimulação possa conduzir ao recrutamento de células G_{D3}^- numa população G_{D3}^+ , é mais verosímil que a activação pelo anti- G_{D3} conduza à expansão do agregado G_{D3}^+ das células T : 1) as células T G_{D3}^+ são necessárias para estimulação; 2) a expansão do agregado G_{D3}^+ é constituída essencialmente por células semelhantes a blasto, em proliferação; 3) a estimulação por outros mitogénios tais como o PHA ou o anti-CD3 não conduz a um acréscimo maior na proporção de células G_{D3}^+ (Figura 6). Experiências com linhas de células T G_{D3}^+ e G_{D3}^- clonadas ajudarão a clarificar este ponto e permitirão uma análise funcional das células T G_{D3}^+ . As experiências demonstram que o mAb R24 reage com os linfócitos T3 e que a população em proliferação em culturas estimuladas por R24 englobam uma mistura de linfócitos T4 e T8.

O mAb R24 pode aniquilar as células alvo por citotoxicidade mediada pelo complemento e citotoxicidade celular dependente do anticorpo. Com base na reactividade restrita e nos efeitos citotóxicos do mAb R24 in vitro, iniciou-se uma experiência clínica preliminar para avaliar o mAb R24 no tratamento de pacientes com melanomas metastásicos [Houghton,

A.N. e outros (1985) "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 82 : 1242]. A infusão intravenosa de mAb R24 induziu sinais clínicos e sintomas de inflamação na vizinhança dos tumores e regressão ou desaparecimento das lesões em alguns pacientes. Foi evidente que o tratamento com o mAb R24 produziu deposição e infiltração complementar de células T ($CD3^+/CD8^+/Ia^+$) nos tumores. Apesar de diversas propriedades biológicas do mAb R24 poderem contribuir para a sua actividade anti-tumor, a função potencial de activação das células T é particularmente intrigante. Este ponto de vista é suportado pela descoberta de que as células T se infiltram em tumores em regressão após tratamento com R24, mas não em biopsias de tumor antes do tratamento. Além disso, os clones de células citotóxicas T foram confirmados a partir de um paciente tratado com R24. Estes clones de células T aniquilam especificamente as células de melanoma do mesmo indivíduo e não tecidos normais ou melanomas alógenos. A possível activação de células T nos pacientes tratados é um assunto complexo, uma vez que o mAb R24 pode também proporcionar a lise das células T alvo na presença de complemento humano e abolir, assim, a estimulação de células T (Tabela 3). A capacidade do mAb R24 para efectuar a lise das células hospedeiras, pode explicar parcialmente a observação de que as regressões de tumor apenas foram genericamente verificadas após o tratamento com doses reduzidas, mas não com doses elevadas de mAb R24 [Houghton, A.I., e outros (1985) "Proc. Natl. Sci. USA" 82 : 1242]. Será possível investigar esta questão, uma vez que os fragmentos $F(ab')_2$ de mAb R24 podem estimular as células T mas não medeiam a lise

do complemento (P. Chapman, observação não publicada). Investigar-se-ão os fragmentos $F(ab')_2$ numa experiência clínica com o objectivo de avaliar a sua função potencial no tratamento do cancro.

Há uma teoria que admite que uma "ponte" mAb tal com um braço do mAb R24 se liga às células T e as activa enquanto um braço diferente de mAb se liga ao tumor efectuando a aniquilação.

A proteína A recombinante é outro agente de estimulação. Para o tratamento do cancro apenas, pode injectar-se Proteína A por via intravenosa ou pode remover-se o sangue de um corpo e passá-lo por proteína A e, depois, efectuar a re-infusão (ex vivo). Em qualquer dos casos de modelos animais observou-se regressão dos tumores.

Será mais aconselhável o uso de PHA ou PMA em tratamento ex vivo conjuntamente com IL-2 e/ou R24.

Também se observou a possibilidade de utilizar fragmentos $F(ab)_2$ interligados com fragmentos Fc de imunoglobulina humana num anticorpo quimérico o qual pode influenciar a tolerância melhorada para o mAb R24, em pacientes. Deste modo, é possível estimular cada uma das células T directamente in vivo, as quais são depois orientadas para o tumor, ou para estimular as células T de um paciente, no exterior do corpo, conforme demonstrado antes, e, depois, injectar estas células estimuladas para efectuar a citotoxicidade do tumor em conjunto com o IL-2, Proteína A, R24, etc., adicionados.

O intervalo de tratamento com IL-2 varia aproximadamente entre uma dose reduzida inferior a 1 milhão de uni

dades até uma dose elevada superior a 3 milhões de unidades de IL-2. Considera-se um intervalo médio quando varia aproximadamente entre 1 - 3 milhões de unidades de IL-2.

Tabela 1

Análise da Estimulação de Células T por Anticorpos Monoclonais Contra Gangliosidos

MAb	MAb Concentração	Incorporação de ³ H-timidina (CPM ± SD)
R24 ¹	100 µg/ml	28497 ± 6501
R24 ¹	30 µg/ml	5390 ± 536
R24 sobrenadante de hibridoma	30 µg/ml	4899 ± 951
K9 (IgM, anti-G _{D3})	100 µg/ml	10777 ± 3982
10-11(IgM, anti-G _{M2})	100 µg/ml	565 ± 186
3F8(IgG3, anti-G _{D2})	100 µg/ml	610 ± 79
F36/22(IgG3 controlo)	100 µg/ml	1137 ± 55
Meio	-	733 ± 415

¹ Purificado a partir de ascite

² 5 dias em cultura

Tabela 2

Produção de IL-2, Receptor de IL-2 e Expressão de G_{D3} pelas Células E^+ estimuladas com MAb R24

Dia de Estimulação	Produção de IL-2 (U/ml \pm SD) ¹	Células Positivas Receptoras de IL-2 (% Positiva \pm SD) ¹	Células R24 ⁺ (% Positiva)
0	0	3	9,9 ²
1	1,4 \pm 1,2	6,6 \pm 2,0	15,9
2	1,3	12,8 \pm 8,0	21,6
3	0,9 \pm 0,3	22,3 \pm 11	25,9
5	0,7 \pm 0,5	38,9 \pm 7,5	44,0 ²
7	0	49,7 \pm 4,5	43,0

1 - Resultados de 3 experiências independentes (com exceção de uma única medição de produção de IL-2 no 2º dia) utilizando o mAb R24 (100 µg/ml) para estimulação.

2 - Também apresentado na Figura 6

Tabela 3

Proliferação das Células E⁺ induzida pelo R24 após Depleção Intermediária Complementar de Células R24⁺¹

<u>Células E⁺ Tratadas com</u>	<u>Células E⁺ Após Tratamento</u>		
	<u>%R24⁺</u>	<u>Libertação de ³H-timidina</u>	
		<u>(CPM)</u>	
		<u>3º dia</u>	<u>5º dia</u>
R24(100 µg/ml) + Complemento	<1	55	36
R24(10 µg/ml) + Complemento	3	320	1729
R24(1 µg/ml) + Complemento	7	977	4138
Apenas Complemento	15	4942	31330
Apenas R24(100 µg/ml)	15	4656	25069

1 As células E⁺ foram tratadas com ou sem mAb R24/complemento (ver "Materials and Methods"), ensaiadas para uma percentagem de células R24⁺ e depois estimuladas com mAb R24(100 µg/ml).

Tabela 4

Efeito da Depleção de Macrófagos na Proliferação de Células E⁺ induzida pelo R24

<u>Fracção Celular</u>	<u>Incorporação</u> <u>de ³H-timidina</u> <u>(CPM)</u>
<u>Exp. 1</u>	
E ⁺	7235 ± 775
E ⁺ + 5% Macrófagos	5341 ± 729
E ⁺ + 10% Macrófagos	7486 ± 1301
<u>Exp. 2</u>	
E ⁺	15076 ± 631
PBMC	12240 ± 710

1 - 3 dias de cultura estimulada com mAb R24 (100 µg/ml).
Apresentam-se os resultados como média e desvio padrão
de culturas triplicadas.

Tabela 5

Efeito do IL-2 Exógeno na Proliferação de Células E^T Induzida
pelo mAb R24

Dia de	R24	Aumento	
Estimulação	R24 Sózinho	+ IL-2 ²	
		Vezes	
3	17672 ± 325	27710 ± 2356	1,6
5	25069 ± 1041	104402 ± 2038	4,2
7	16667 ± 2442	98007 ± 10373	5,9
9	4461 ± 930	45573 ± 2443	10,2

1 - MAb R24 100 µg/ml

2 - MAb R24 100 µg/ml mais IL-2 100 U/ml. A libertação máxima de ³H-timidina na presença de IL-2 apenas foi de 2536 ± 11705 CPM no 7º dia de cultura.

Os resultados apresentam-se como média e desvio padrão de culturas triplicadas.

REIVINDICAÇÕES

1.- Processo para a preparação de composições para o tratamento do cancro em seres humanos, e susceptíveis de induzir a activação de células T, caracterizado por se incorporar um anticorpo monoclonal que reage imunologicamente com gangliosido G_{D3} junto com IL-2 em quantidades fisiologicamente activas.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o anticorpo monoclonal incluir o anticorpo IgG ou IgM.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se incorporar o fragmento $F(ab')_2$ do referido anticorpo monoclonal.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se incorporar um anticorpo monoclonal escolhido no grupo que consiste em R24 K9 e C5.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por se incorporar a porção $F(ab')_2$ do referido anticorpo monoclonal.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a activação de células T ser caracterizada pela expressão de receptores de IL-2, produção de IL-2, proliferação de células e aumento nas células T de G_{D3}^+ .


7.- Processo para a preparação de composições para o tratamento do cancro em seres humanos, em que as referidas composições são susceptíveis de activar células T, caracterizado por se incorporar um anticorpo monoclonal que reage imunologicamente com gangliosido G_{D3} junto com proteína A, em quantidades fisiologicamente activas.

8.- Processo para a preparação de composições para o tratamento do cancro em seres humanos, em que as referidas composições são susceptíveis de activar células T, caracterizado por se incorporar um anticorpo monoclonal que reage imunologicamente com gangliosido G_{D3} junto com PMA ou PHA ex vivo em quantidades fisiolo-

gicamente activas,

Lisboa, 13 de Novembro de 1987

O Agente



R E S U M O

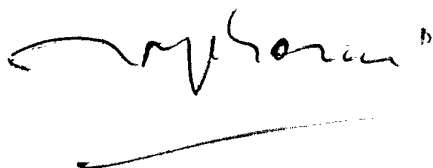
"Processo para a preparação de composições para o tratamento do cancro utilizando anti-corpos monoclonais contra gangliosido G_{D3} junto com IL-2"

Presume-se que os gangliosidos de superfície das células intervêm no crescimento e diferenciação das células. Assim, a presente invenção, que utiliza anticorpos monoclonais dirigidos contra G_{D3} , um disialogangliosido expresso predominantemente por células de origem neuro-ectodermal, verifica que G_{D3} é expresso por uma subpopulação de células do sistema imunológico que inclui:

- 1) timocitos fetais em regiões subcorticais e vasos próximos
- 2) linfócitos de nódulos de linfa em áreas interfoliculares e vasos próximos e 3) um pequeno subconjunto de células T no sangue periférico. Verificou-se que anticorpos monoclonais de murganho [dois IgGs, um IgM e fragmentos de $F(ab')_2$] que reagem com G_{D3} estimulam a proliferação de células T derivadas de sangue periférico. Pode aumentar-se, a proliferação induzida por ligação a G_{D3} de proteína A, PHA, PMA ou IL-2 exógeno.

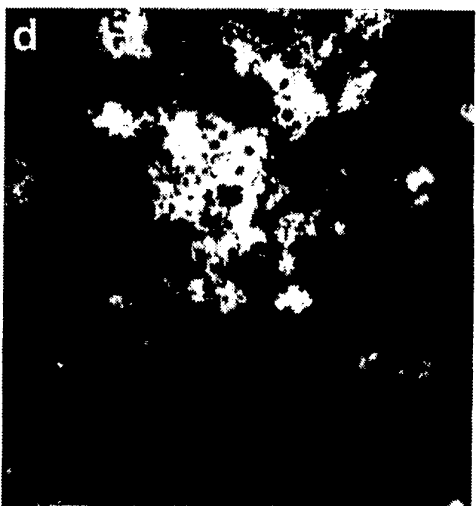
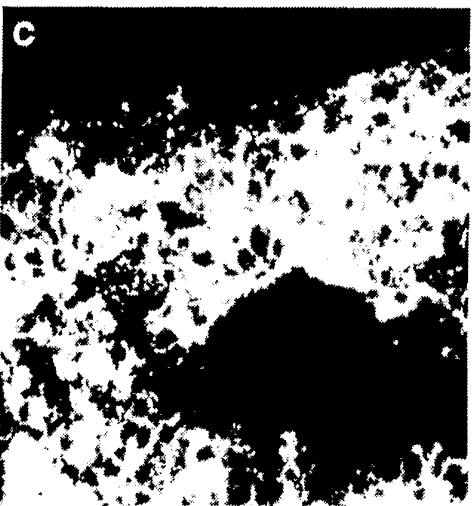
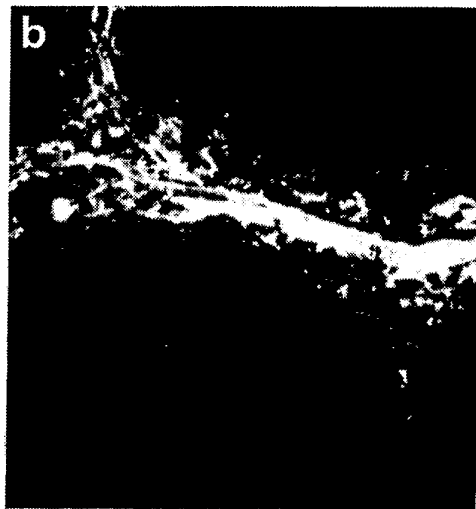
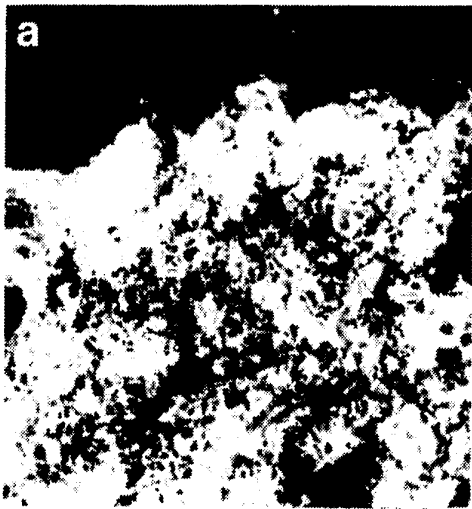
Lisboa, 13 de Novembro de 1987

O Agente da Propriedade Industrial



4.

Figura 1



4.

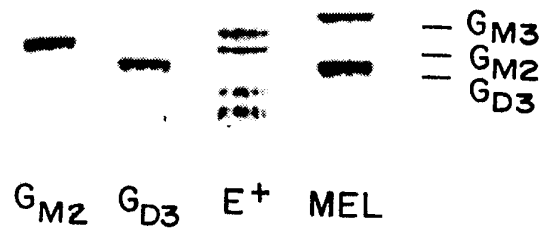


Figura 2a

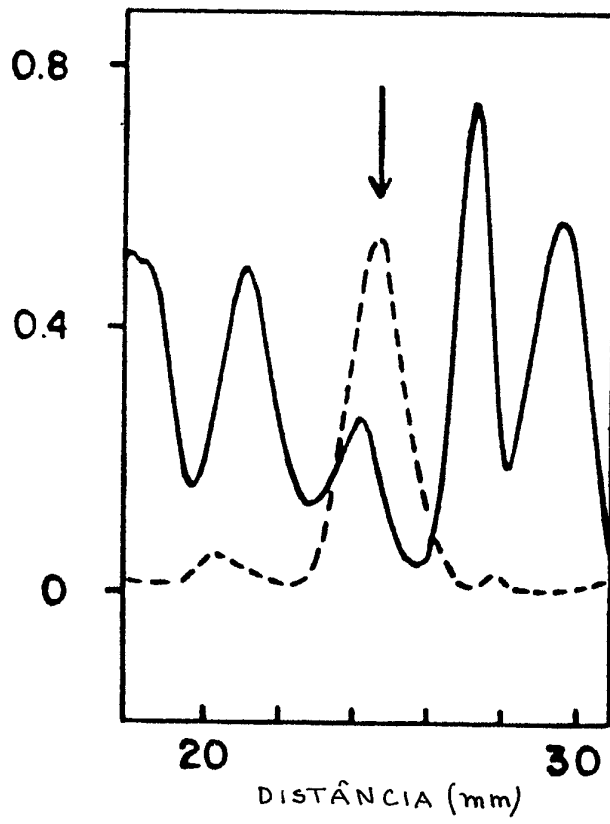
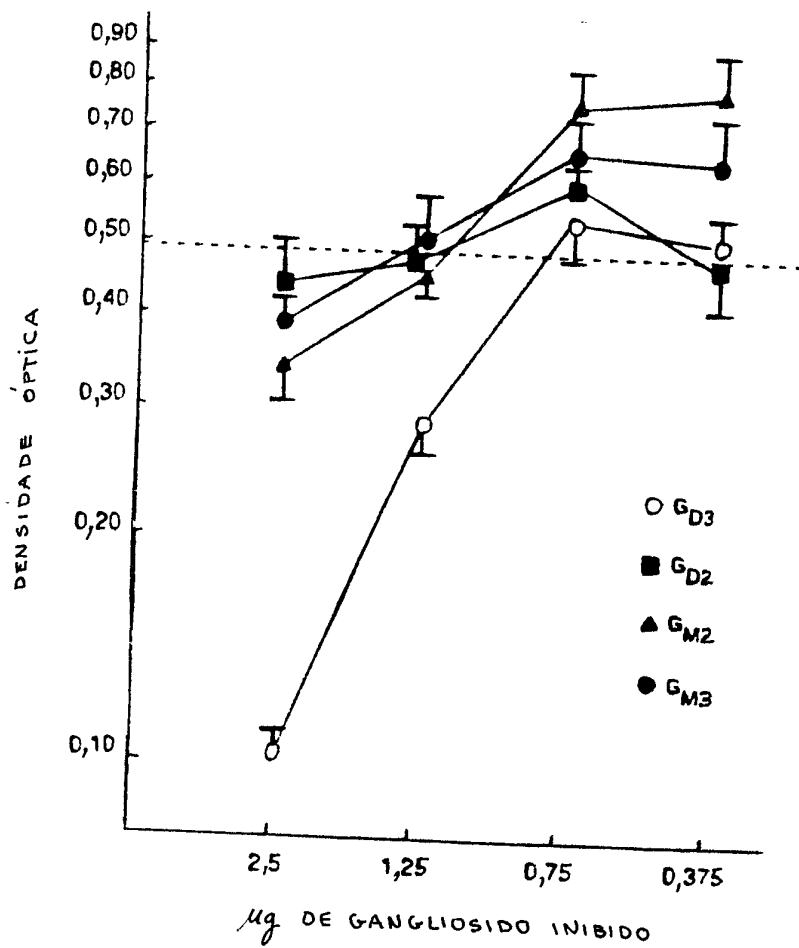


Figura 2b

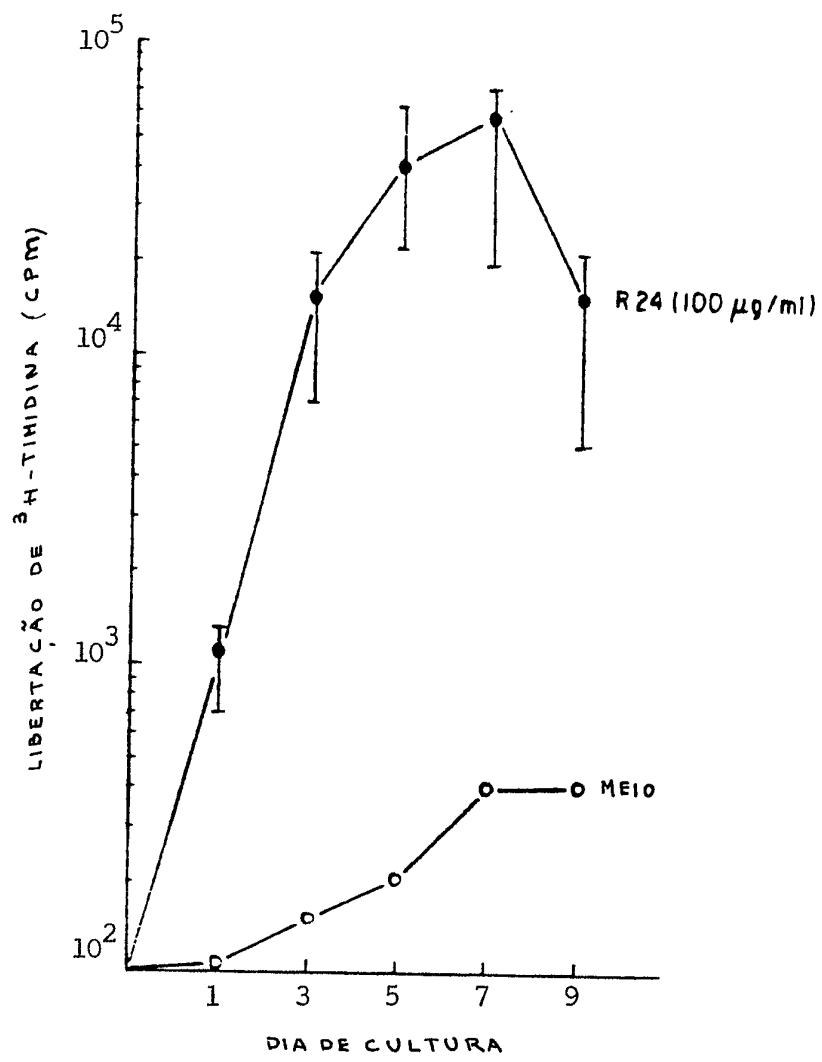
4.

Figura 3



4.

Figura 4



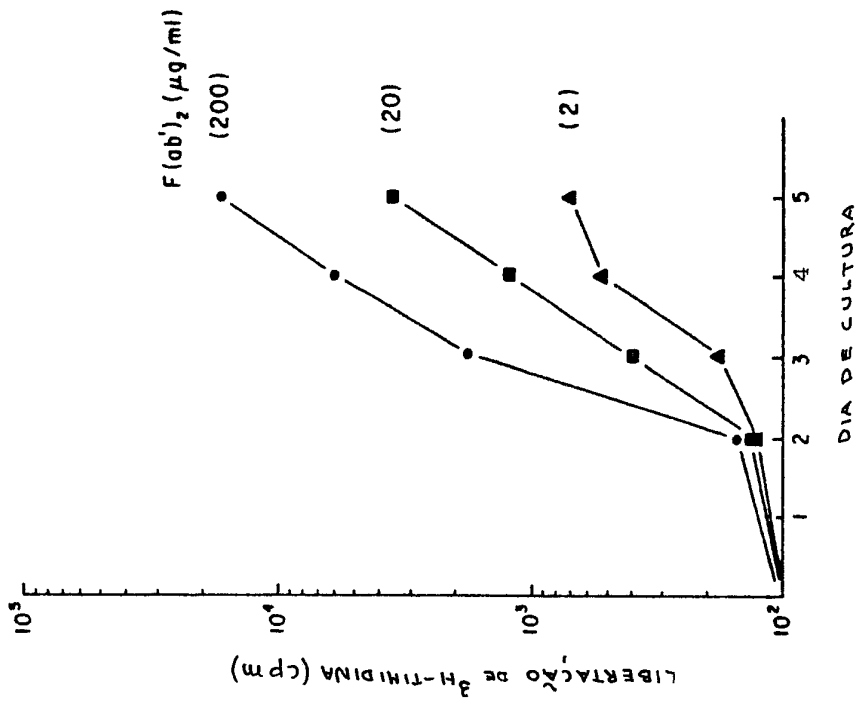


Figura 5b

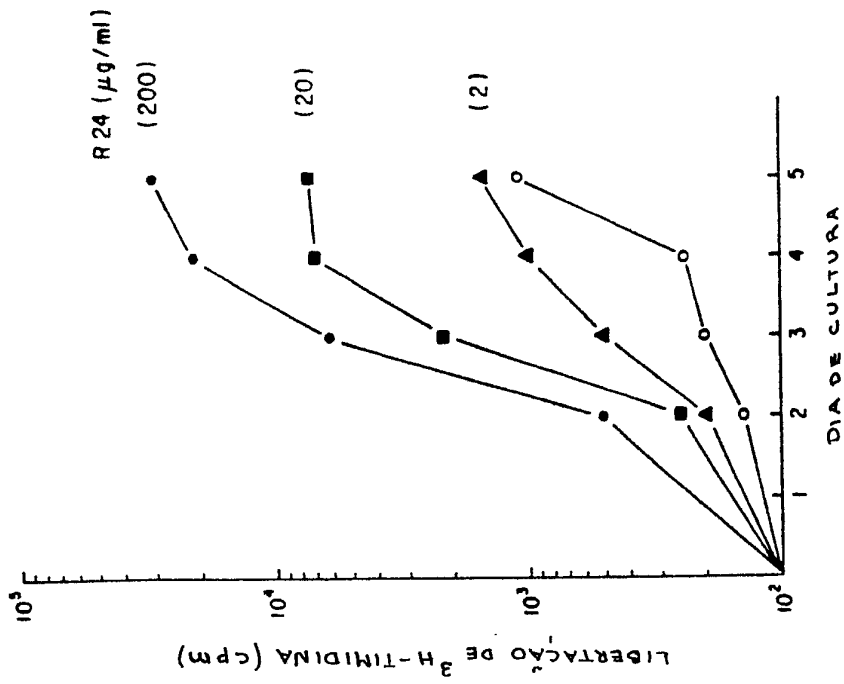
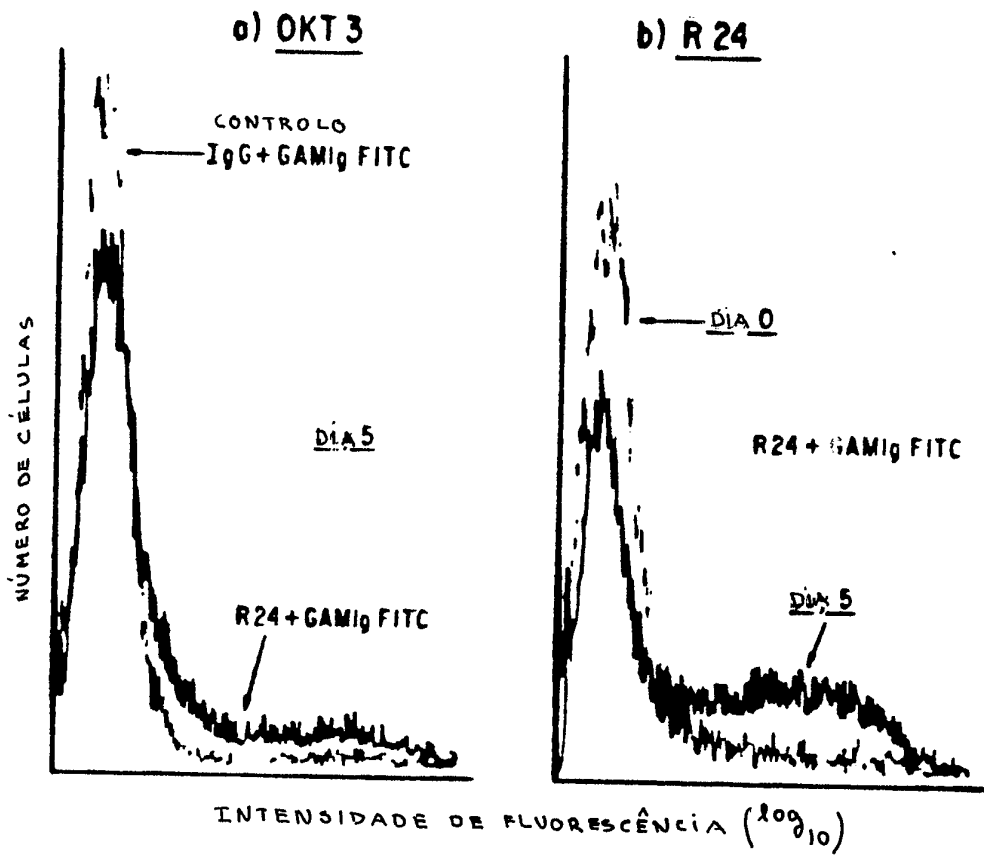


Figura 5a

4.

Figura 6



4

Figura 7

