



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1027375 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/42 (2006.01) **C12N 5/20** (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1998.10.21**

(30) Prioridade(s): **1997.10.21 CU 0011997**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.08.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.16**
001/2007

(73) Titular(es):

**CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
CALLE 216 Y 15, ATABEY, PLAYA CIUDAD
HABANA 12100**

CU

(72) Inventor(es):

**ROLANDO PEREZ RODRIGUEZ
ANA MARIA VASQUEZ LOPEZ
ELADIO IGLESIAS SIERRA
ALEXIS PEREZ GONZALEZ
GUMERSINDA BOMBINO LOPEZ**

CU

CU

CU

CU

CU

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMINIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-IDIOTIPO, SUA UTILIZAÇÃO EM
IMUNOTERAPIA ACTIVA DE TUMORES MALIGNOS E COMPOSIÇÕES CONTENDO OS MESMOS**

(57) Resumo:

RESUMO**"ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-IDIOTIPO, SUA UTILIZAÇÃO
EM IMUNOTERAPIA ACTIVA DE TUMORES MALIGNOS E
COMPOSIÇÕES CONTENDO OS MESMOS"**

Anticorpo monoclonal anti-idiotipo que é específico de anticorpos de ratinho contra gangliósidos portadores de ácido siálico N-glicolilado, particularmente contra os gangliósidos que são expressos por células tumorais. O anticorpo monoclonal é útil como imunomodulador para o tratamento de cancro. Especificamente, o anticorpo monoclonal anti-idiotipo do presente invento é capaz de induzir uma resposta que é predominantemente anti-idiotípica em modelos xenogeneicos. O anticorpo monoclonal anti-idiotipo também exerce um efeito protector contra tumores malignos em animais.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-IDIOTIPO, SUA UTILIZAÇÃO EM IMUNOTERAPIA ACTIVA DE TUMORES MALIGNOS E COMPOSIÇÕES CONTENDO OS MESMOS"

Campo técnico

O presente invento está relacionado com anticorpos monoclonais anti-idiotipo e sua utilização como imunomoduladores. Mais particularmente, o presente invento diz respeito a um anticorpo monoclonal murino, o qual foi desenvolvido contra um anticorpo monoclonal murino reactivo com gangliósidos contendo N-glicolilo e com antigénios expressos em células de cancro, e ao seu efeito inibidor no crescimento de tumores.

Fundamento

Uma das estratégias para o tratamento de cancro tem sido a utilização de imunoterapia activa, uma modalidade de tratamento que tem como objectivo activar o potencial natural do sistema imune do hospedeiro contra o tumor. Desde que Niels Jerne em 1974 (Jerne, N.K. 1974. Ann Immunol 125C, 373-389) propôs a teoria da rede idiotípica, novas possibilidades foram abertas no estudo de terapias eficazes contra o cancro. A teoria de Jerne apresentou,

pela primeira vez, o sistema imune como uma rede de anticorpos que podem interagir entre eles, e com um grande número de epitopos naturais, através das suas regiões variáveis ou idiotipos (Id).

Esta série complexa de interacções idiotipo-anti-idiotipo opera para regular respostas imunes contra antigénios. Os anticorpos produzidos como resposta ao antigénio original, designado Ab1, tornam-se eles próprios antigénios e induzem a produção de uma segunda série de anticorpos, designados anticorpos anti-idiotipos (anti-Id) ou Ab2, os quais também podem ser regulados por outros anticorpos referidos como anti-anti-idiotipo (Ab' ou Ab3).

A teoria original de Jerne continua a ser revista e foi descrito que o resultado da interacção do Ab2 com linfócitos portadores de Ab1 não tem necessariamente de ser a supressão da resposta imune, mas pode ser a estimulação desta resposta. Ainda, Jerne limitou esta teoria aos linfócitos B e anticorpos, mas agora é claro que as células T desempenham um papel importante na regulação através dos idiotipos dos receptores das células T (Teitelbaum, D. *et al.*, 1984 *J. Immunol* 132, 1282-1285; Zanetti, M. *et al.* (1986) *J. Immunol* 137, 3140-3146; Powell, J. *et al.* (1988) 140, 3266-3272; Baskin, J.G. *et al.* (1990) *J Immunol* 145, 202-208; Furuyama, A. *et al.* (1992) *Anticancer Res* 12, 27-32; Raychaudhuri, S. *et al.* *J. Immunol* 131, 271-278; Raychaudhuri *et al.* (1987) *J. Immunol* 139, 3902-3910; Durran *et al.* (1994) *Cancer Res.* 54, 4837-4840).

Um idiótipo é imunologicamente definido pela reactividade com mais de um anti-Id que reconhece um determinante idiotípico ou idiotopo dentro de um determinado idiótipo. Assim, como um Ab1 particular expressa múltiplos idiotopos quando este Ab1 é administrado a animais singeneicos, é obtida uma população heterogénea de anticorpos anti-Id.

A classificação dos anticorpos anti-Id foca-se na sua ligação dentro do local de ligação ao antígeno ou noutra região do idiótipo. Se a ligação do Ab2 com Ab1 for inibida pelo antígeno relevante e se o Ab2 for também capaz de induzir uma resposta de anticorpos da mesma especificidade do Ab1, ele simula o antígeno natural e é classificado como Ab2 β ; este tipo de Ab2 é referido como imagem interna anti-Id e eles podem actuar como substitutos de antígenos. Os anti-Id que não são inibidos pelo antígeno são designados Ab2 α , estes Ab2 reagem com idiotopos Ab1 que não estão estruturalmente relacionados com o local de ligação ao antígeno.

Em 1984, Bona e Köhler propuseram um terceiro tipo de anticorpos anti-Id (Ab2 γ), os quais são inibidos pelo antígeno devido a interferência espacial, este tipo de anti-Id reage com idiotopos estruturalmente associados com o local de ligação ao antígeno, mas não simulam o epítopo antigénico reconhecido pelo Ab1 (Bona e Köhler (1984) "Anti-idiotypic antibodies: Probes for receptor

structure and function", Venter JC, Frasser CM, Lindstrom J (eds), NY, Alan R. Liss, pp 141-149, 1984).

Com base na teoria de Jerne, foram desenvolvidas duas abordagens principais na pesquisa de vacinas contra um grande número de antígenos, incluindo antígenos associados a tumores. A primeira abordagem, baseia-se na apresentação de epitopos num ambiente molecular diferente, usando Ab2 β . Vacinas contendo este tipo de anticorpos anti-Id foram capazes de induzir respostas protectoras contra vírus, bactérias e parasitas (Kennedy *et al.* (1986) 232, 220-223; McNamara *et al.* (1985) Science 226, 1325-1326). Igualmente, Ab2 β foi usado para induzir respostas imunes contra antígenos associados a tumores e foram obtidos resultados positivos em modelos animais e em ensaios clínicos (Raychauri *et al.* (1986) J Immunol 137, 1743-1749; Raychauri *et al.* (1987) J Immunol 139, 3902-3910; Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1987) J Immunol 139, 1354-1360; Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1988) J Immunol 141, 1398-1403; Herlyn, D *et al.* (1989) Intern Ver Immunol 4, 347-357; Chen, Z-J *et al.* Cell Imm Immunother Cancer (1990) 351-359; Herlyn, D. *et al.* (1991) *In vivo* 5, 615-624; Furuya *et al.* (1992) Anti-cancer Res 12, 27-32; Mittelman, A. *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 466-470; Durrant; LG. *et al.* (1994) cancer Res 54, 4837-4840; Mittelman, A. *et al.* (1994) Cancer res. 54, 415-421; Schmitt, H. *et al.* (1994) Hybridoma 13, 389-396; Chakrobarty, M. *et al.* (1995) J Immunother. 18, 95-103; Chakrobarty, M. *et al.* (1995) Cancer Res. 55, 1525-1530; Foon, K.A. *et al.* (1995) Clin Cancer res 1, 1285-1294;

Herlyn, D. *et al.* (1995) *Hybridoma* 14, 159-166; Sclebusch, H. *et al.* (1995) *Hybridoma* 14, 167-174; Herlyn, D. *et al.* (1996) *Cancer Immunol. Immunother.* 43, 65-76). No entanto, foi demonstrado que o carácter β de um Ab2 não é suficiente para prever o efeito biológico que poderá induzir o Ab2 (Raychauhuri *et al.* (1986) *J Immunol* 137, 1743-1749; Raychauhuri *et al.* (1987) *J. Immunol* 139, 231-278); Maruyama *et al.* (1996) *Int. J. Cancer* 65, 547-553).

A segunda abordagem baseia-se na manipulação da rede através de idiotopos reguladores, os quais não estão relacionados com a ligação do antigénio, mas envolvem idiotopos partilhados com outros anticorpos ou células T. Tem-se acumulado evidência de que estes anticorpos anti-Id são igualmente capazes de produzir respostas e efeitos protectores (Paul, W.E. e Bona, C. (1982) *Immunology Today* 3, 230-234; Mcnamara M.K. *et al.* (1985) *Science* 226, 1325-1326; Köhler *et al.* (1992) *Proc. 8th Inter. Cong Immunol. Budapest*, pp.619).

Os gangliósidos são glicosfingolípídeos que possuem ácido siálico e são expressos na maioria das membranas das células de mamífero. Se bem que estes antigénios estejam presentes em tecidos normais, eles podem ser encontrados em quantidades maiores e expressos numa organização e conformação diferente na superfície de células malignas (Hakomori, S (1985), *Cancer Res* 45, 2405-2415; Miraldi, F (1989) *Seminars in Nuclear Medicine* XIX, 282-294; Hamilton *et al.* (1993) *Int J Cancer* 53, 1-81).

Se bem que os gangliósidos sejam alvos úteis para as respostas imunes, a sua imunogenicidade é extremamente fraca, devido à sua natureza de açúcar e à sua condição de auto-antigénio (Livingston, P et al. (1995) *Seminars in Cancer Biology* 6, 357-366).

A variante N-glicolilo do ácido siálico é expressa em tecidos normais da maior parte dos mamíferos; mas é muito difícil de detectar em tecidos normais de seres humanos (Watarai, S. et al. (1995) *J. Biochem* 117, 1062-1069. Por outro lado, a presença destes antigénios foi descrita em cancro do cólon, melanoma, retinoblastoma e cancro da mama, entre outros (Higachi, H et al. (1984) *Jpn J Cancer Res (Gann)* 75, 1025-1029; Higachi, H. et al. (1985) *Cancer Res* 45, 3796-3802; Hirabayashi, I. et al. (1987) *Jpn J Cancer Res (Gann)* 78, 1614-1620; Higachi, H. et al. (1988) *Jpn J Cancer Res (Gann)* 79, 952-956; Miyake, M. et al. (1990) *Cancer* 65, 499-505; Devine, P.L. et al. (1991) *Cancer Res.* 51, 5826-5386; Vázquez, A.M. et al. (1995) *Hybridoma* 14, 551-556; Marquina, G. et al. (1996) *Cancer Res* 56, 5165-5171)

A imunização com vacinas contendo gangliósidos resulta no prolongamento da sobrevivência de doentes com melanoma, os quais desenvolveram anticorpos anti-gangliósido (Livingston, P. et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 2911-2915; Livingston, P. et al. (1989) *Cancer Res* 49, 7045-7050; Livingston, P. (1995) *Immunological Reviews* 145, 147-166). No entanto, os problemas de um

antigénio com fraca imunogenicidade tornaram o uso de anticorpos anti-idiotipo uma alternativa atraente para imunoterapia activa neste modelo antigénico. Um mAb murino anti-Id (4C10) foi produzido contra um mAb IgM humano (L612) que reconhece GM3 em melanoma humano. Os soros de ratinhos imunizados com este mAb anti-Id acoplado a hemocianina de lapa (KLH) reagiu fortemente com uma linha celular de melanoma positiva para o antigénio e com GM3 purificado, o que sugeriu que este mAb anti-Id portador da imagem interna de GM3 ($\text{Ab2}\beta$) pode ser uma ferramenta eficaz para a imunoterapia específica activa em doentes com melanoma (Yamamoto, S. *et al.* (1990) *J Natl Cancer Inst* 82, 1757-1576; Irie, R.F. Patente Número US 5208146). VL e VH deste mAb anti-Id foram clonadas, sequenciadas e expressas como um anticorpo quimérico IgG1 ratinho/humano (Hastings, A. *et al.* (1992) *Cancer Res* 52, 1681-1686).

Igualmente, um mAb anti-idiotipo do tipo alfa foi produzido contra o mAb humano 1612 útil em procedimentos de imunodiagnóstico (Irie, R.F. Patente Número US 5208146).

O mAb BEC-2, um mAb anti-Id de ratinho induzido contra um mAb de ratinho que reconhece o gangliósido GD3 (mAbR24), pode simular GD3 e pode induzir anticorpos contra gangliósido apesar da expressão de GD3 em tecido normal de coelho (Chapman, P.B. e Houghton, A.N. (1991) 88, 186-192). Os resultados de um estudo piloto mostraram que BEC-2 mais o adjuvante BCG aumentaram significativamente a sobrevivência de doentes com cancro das células pequenas do

pulmão (Scrip Magazine (1996) pp 56-59:33rd American Society of Clinical Oncology Annual Meeting (1997)).

A imunização de ratos com um mAb de ratinho específico contra GD2 (3F8), produziu mAbs anti-Id que, quando testados como imunogénios em ratinhos, puderam estimular anticorpos que reagiram com o gangliósido GD3. Foi sugerido que estes mAbs anti-Id possam ser úteis na construção de vacinas (Cheung, N-K.V. *et al.* (1993) *Int. J. Cancer* 54, 499-505).

Igualmente, foi produzido um mAb humano anti-Id usando células mononucleadas do sangue periférico, derivadas de um doente tratado com o mAb 14G2 de ratinho específico contra GD2. A imunização de coelhos com este mAb humano anti-Id induziu anticorpos anti-GD2 e uma resposta DTH contra células tumorais positivas para o antigénio. Foi sugerido que este anticorpo pudesse potencialmente ser usado como vacina anti-Id humana em doentes com melanoma maligno (Saleh, M.N. *et al.* (1993) *J Immunol* 151, 3390-3398).

EP-A-0657471 está relacionada com anticorpos monoclonais anti-gangliósido e sua utilização na imunoterapia activa específica de tumores malignos. Em particular, o referido documento descreve a geração de um anticorpo anti-gangliósido P3 que especificamente se liga a NGcGM3 (o ácido N-glicolilneuramínico ligado à galactose interna do gangliósido GM3) e anticorpos anti-idiotípios

induzidos contra o referido anticorpo anti-gangliósido P3, anticorpos anti-idiotípicos esses que reconhecem o antígeno original, NGcGM3.

No artigo "Ganglioside vaccine: anti-idiotypic monoclonal antibodies as antigen surrogates" (Iglesias, E., et al. *Biotecnologia Aplicada*, Vol. 14, N° 1, 1997, página 50, XP-002091466) são descritos sete anticorpos monoclonais (MAbs) anti-idiotípicos que reagiram fortemente com o mAb P3 e não se observou reactividade com os outros MAbs IgM anti-gangliósidos testados. Os sete MAbs anti-idiotipos possuem capacidade de bloquear a ligação de P3 a NGcGM3 numa gama de concentrações entre 1 e 10 µg/ml. Cinco destes anti-idiotipos foram capazes de induzir uma resposta humoral contra NGcGM3, sendo classificados como anticorpos monoclonais anti-idiotípicos Ab2β e Ab2α.

Por outro lado, Pérez et al. ("What gangliosides show us about idiotypic networks". *Biotecnologia Aplicada*, Vol. 14, N° 1, 1997, página 42, XP-002091467) também descreve que o anticorpo anti-gangliósido P3 induziu respostas anti-idiotípicas IgG fortes (Ab2, títulos 1/10000 a 1/50000) em ratinhos Balb/c). A maior parte destes clones Ab2 específicos obtidos foram capazes de bloquear a ligação do Mab P3 a GM3 (NeuGc). Estes anticorpos, tal como no caso atrás referido, foram capazes de induzir uma resposta de auto-anticorpos naturais contra gangliósidos, como no caso atrás referido, sendo igualmente classificados como anticorpos anti-idiotípicos Ab2β.

Conforme é aparente do que atrás foi dito, até agora nenhum anticorpo monoclonal anti-idiotipo do tipo gama foi gerado contra anticorpos monoclonais que reconhecem gangliósidos contendo N-glicolilo, os quais ao mesmo tempo seriam capazes de exercer um efeito anti-tumoral num modelo animal.

Descrição do invento

O presente invento está relacionado de um modo geral com anticorpos monoclonais (mAb) anti-idiotípicos (anti-Id) e sua utilização como imunomoduladores para o tratamento de cancro. Mais particularmente, o invento envolve um anticorpo monoclonal anti-idiotípico do tipo gama (Ab2 γ), induzido contra um anticorpo de ratinho anti-gangliósidos contendo N-glicolilo produzidos pelo hibridoma depositado com o número de acesso ECACC 94113026, o Ab2 γ sendo obtido a partir da linha celular de hibridoma depositado com o número de acesso ECACC97112901. Ainda, o invento envolve o referido hibridoma depositado com o número de acesso ECACC 97112901, uma composição farmacêutica contendo uma quantidade eficaz do referido anticorpo monoclonal anti-idiotípico, juntamente com um diluente, um adjuvante ou uma molécula transportadora; e a utilização do referido anticorpo monoclonal para a produção de um medicamento para o tratamento de neoplasias malignas.

De acordo com o presente invento, um objectivo

deste invento é proporcionar um novo mAb anti-Id para induzir uma resposta anti-idiotípica predominante em modelos xenogeneicos e para exercer um efeito protector em ratinhos ou outra espécie animal com tumores malignos.

Descrição detalhada do invento.

PROCEDIMENTO DE IMUNIZAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE RESPOSTA DE ANTICORPOS ANTI-IDIOTÍPICOS (Ab2) CONTRA mAbs ANTI-GANGLIÓSIDOS

Ratinhos e outras espécies de mamíferos foram imunizados com doses de 25-200 µg de mAbs anti-gangliósido purificados, com ou sem adjuvante, e facultativamente acoplados a uma proteína transportadora.

Os animais receberam 2-6 doses de mAbs anti-gangliósido com 14 e 30 dias de intervalo entre as doses. As vias de imunização possíveis são intraperitoneal, subcutânea, endovenosa ou uma combinação destas.

Antes e durante o período de imunização amostras de soro do sangue animal foram colhidas e a resposta do nível de anticorpos Ab2 determinada por quaisquer métodos de imunoensaio conhecidos. As diluições do soro animal foram incubadas com o mAb anti-gangliósido usado como imunogénio ou com outros mAbs anti-gangliósidos não usados no protocolo de imunização.

Foram igualmente realizadas experiências para definir a capacidade do soro dos animais imunizados para bloquear a ligação do mAb anti-gangliósido usado como imunogénio ao seu antigénio.

PRODUÇÃO DE mAb ANTI-IDIOTÍPICO CONTRA mAbs ANTI-GANGLIÓSIDO.

Ratinhos com títulos de anticorpos Ab2 elevados receberam uma imunização com o mAb usado como imunogénio três dias antes da obtenção das células produtoras de anticorpos. As células do baço deverão ser preferencialmente usadas, ainda que outras células produtoras de anticorpos possam ser seleccionadas.

Estas células são fundidas com células de mieloma que conferem às células híbridas ou hibridomas a propriedade de reprodução *in vitro* e *in vivo*. A fusão celular pode ser realizada por qualquer um de uma série de métodos conhecidos.

Os anticorpos produzidos pelos hibridomas são testados por métodos de imunoensaios, de preferência por um ensaio imunoenzimático em que os sobrenadantes de hibridomas são incubados com o mAb usado como imunogénio e com outros mAbs anti-gangliósido não usados nas imunizações.

A capacidade do sobrenadante de hibridoma bloquear a ligação do mAb anti-gangliósido usado como imuno-

génio ao seu antígeno é determinada por incubação dos sobrenadantes com diluições adequadas do mAb anti-gangliósido seguido de incubação do referido anticorpo com o seu antígeno.

Os hibridomas seleccionados são clonados pelo menos duas vezes e os mAbs resultantes são produzidos *in vitro* e *in vivo* como descrito atrás.

Os mAbs anti-idiotípicos obtidos reconhecem os mAbs anti-gangliósido e podem possuir a capacidade de bloquear a ligação do mAb anti-gangliósido ao seu antígeno.

PROCEDIMENTO DE IMUNIZAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE RESPOSTA DE ANTICORPOS ANTI-ANTI-IDIOTÍPICOS (Ab3) CONTRA mAbs Ab2 EM MODELOS XENOGENEICOS.

Macacos ou outra espécie xenogeneica são imunizados com mAbs anti-idiotípicos. Estes mAbs podem ser administrados com ou sem adjuvante e facultativamente acoplados a uma proteína transportadora antes de serem usados como imunogénio.

Cada um dos animais recebeu 2 a 8 doses de 250 µg a 2 mg do mAb anti-idiotípico, com intervalos de tempo de 7 a 30 dias entre doses.

As vias de imunização podem ser intradérmica,

subcutânea, endovenosa, intraperitoneal ou uma combinação destas.

As amostras de sangue animal são obtidas antes e durante o protocolo de imunização e a presença da resposta de anticorpos Ab3 é controlada usando qualquer um dos métodos de imunoensaio conhecidos.

A administração a animais de mAbs anti-idiotípicos, produzidos pela imunização com mAbs anti-gangliósido, pode induzir uma resposta de anticorpos predominantes contra o idiotopo do mAb anti-idiotípico usado como imunogénio, sem a indução de resposta de anticorpos específicos de antigénio.

EFEITO ANTI-TUMORAL DO TRATAMENTO COM mAbs ANTI-IDIOTÍPICOS

Os MAb anti-idiotípicos são administrados numa quantidade eficaz com ou sem adjuvantes e, facultativamente, acoplado a um veículo proteico antes de serem usados. O termo "quantidade eficaz" deverá ser entendido como significando uma quantidade do anticorpo anti-idiotípico necessária para se conseguir um efeito anti-tumoral. O tratamento com os mAbs anti-idiotípicos é feito antes ou após a administração experimental de células malignas em animais.

Os animais recebem 1-5 doses de 10-200 µg dos mAbs anti-idiotípicos, com intervalos de tempo de 7-30 dias entre doses.

As vias de imunização podem ser intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, endovenosa ou uma combinação destas.

Após o tratamento com os mAbs anti-idiotípicos, a incidência de tumor e a sobrevivência no grupo tratado com os mAbs anti-idiotípicos pode ser comparada com os grupos testemunha, tratados e mantidos na mesma forma.

O tratamento com mAb anti-idiotípico aumentou significativamente a sobrevivência de animais portadores de tumores e diminuiu as metástases do pulmão.

Exemplo 1: Obtenção de um anticorpo anti-idiotípico contra o mAb P3 num modelo singeneico.

Ratinhos Balb/c fêmeas, 6-8 semanas de idade, foram imunizados com duas doses de 50 µg de mAb P3 purificado (anti-gangliósidos contendo N-glicolilo (EACC número de acesso 94113036, Pedido de Patente Europeia EP 657471 A1; Vázquez, A.M. et al., Hybridoma (1995) 14, 551-556) acoplado a KLH, com intervalos de 14 dias entre doses.

Três dias após a última imunização, os baços de ratinhos com níveis séricos elevados de anticorpos Ab2 contra o mAb P3 foram removidos e uma suspensão celular preparada pressionando o tecido através de um crivo de aço inoxidável ou perfusão do baço.

A fusão foi realizada pelo método descrito por Köhler e Milstein (1975, Nature (London) 256, 495-497) com ligeiras modificações.

As células do baço de ratinho foram fundidas com as células de mieloma murino não secretoras P3/X63 Ag8 6.5.3. obtidas a partir de ECACC, N° 85011420, numa proporção de 10:1, em 0,5 ml de meio de fusão contendo 42% de polietilenoglicol em meio RPMI-1640.

Após fusão, as células foram cultivadas num meio selectivo HAT (hipoxantina-aminopterina e timidina) a 37°C numa atmosfera húmida de CO₂.

Dez a quinze dias após a fusão, a avaliação da presença de anticorpos em sobrenadantes de hibridoma foi determinada por ELISA. As placas de ELISA (COSTAR de elevada ligação) foram incubadas durante a noite a 4°C com 10 µg/ml de mAbP3 e outro mAb IgM anti-gangliósido, em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,8.

As placas, após lavagem com PBS, contendo 0,05% Tween 20, foram bloqueadas com o mesmo tampão contendo 1% BSA durante uma hora a 37°C.

O passo de lavagem foi repetido e 50 µl/alvéolo dos sobrenadantes foram adicionados. Após incubação durante 2 horas as placas foram lavadas novamente e adicionado um

anti-soro de cabra anti-região Fc de IgG de ratinho conjugado com fosfatase alcalina. Após lavagem, adicionou-se 100 µl/alvéolo da solução de substrato (1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato diluído em tampão dietanolamina, pH 9,8). A absorvância foi medida a 405 nm num leitor de ELISA.

Igualmente, a capacidade dos sobrenadantes para bloquear a ligação do mAb P3 a NeuGgGM3 foi determinada por um ELISA indirecto efectuado em placas activadas com cloreto de polivinilo (ICN-FLOW) com NeuGgGM3 imobilizado, de acordo com o seguinte método: Cinquenta microlitros do gangliósido em metanol (4 µg/ml) foram adicionados a cada um dos alvéolos. O metanol foi evaporado colocando as placas a 37°C, durante uma hora. Mais tarde, 150 µl/alvéolo de tampão TRIS-HCl 0,05M pH 7,8 contendo 1% BSA foram adicionados e as placas foram incubadas a 37°C durante 30 minutos.

Os sobrenadantes de hibridoma foram incubados com 4 µg/ml do mAb P3 durante 3 horas a 37°C e depois, 50 µl/alvéolo das misturas foram adicionados e as placas foram incubadas a 37°C durante 90 minutos.

Os alvéolos foram lavados 4 vezes com 200 µl de PBS e adicionados 50 µl de anti-soro anti-imunoglobulinas de ratinho conjugado com fosfatase alcalina, adequadamente diluído. Após lavagem com PBS, os alvéolos foram incubados com a solução de substrato como descrito anteriormente.

Foi obtido um mAb anti-idiotípico, designado 1E10, da subclasse IgG1. Este mAb 1E10 anti-Id3 era muito específico para o mAb P3 usado como imunogénio. Não reage com outros anticorpos anti-gangliósido, tais como E1, A3 e F6 (Figura 1). Este mAb anti-idiotípico foi capaz de inibir a ligação do mAb P3 a Neu GgGM3 (Figura 2) e a uma linha celular de tumor da mama positiva para P3.

Exemplo 2: Produção da resposta de anticorpos anti-anti-idiotípicos (Ab3) contra mAb anti-Id 1E10 num modelo xenogeneico.

O mAb anti-IdP3 1E10 precipitado com hidróxido de alumínio foi usado para imunizar intradermicamente macacos cinomologos, em intervalos de 14 dias, com uma dose de 2 mg de mAb por injeção. Os animais receberam várias doses do mAb.

Amostras de soro foram colhidas antes e após as imunizações. A presença da resposta de anticorpos Ab3 no soro de macaco foi determinada por ELISA. Placas de ELISA (Costar de elevada ligação) foram incubadas durante a noite a 4°C com 10 µg/ml do mAb 1E10 ou dos seus fragmentos F(ab')₂ em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,8.

As placas, após lavagem com PBS contendo 0,05% de Tween 20, foram bloqueadas com o mesmo tampão contendo 1% BSA durante uma hora a 37°C.

O passo de lavagem foi repetido e adicionados 50 μ l/alvéolo das diferentes diluições de soro. Após incubação durante 2 horas a 37°C, as placas foram novamente lavadas e adicionados anti-soro de cabra anti-imunoglobulina humana, anti-IgM ou anti-IgG, conjugado com fosfatase alcalina. Após lavagem, a solução de substrato foi adicionada como anteriormente descrito.

As experiências de bloqueio foram realizadas para distinguir entre as respostas de anticorpos anti-isotípicas e anti-idiotípicas.

O soro de macaco foi incubado durante a noite a 4°C com 500 μ g/ml de um mAb com o mesmo isotipo do mAb 1E10, mas com especificidade diferente. Em seguida, a restante reactividade residual contra o mAb 1E10 foi medida por ELISA, como descrito atrás.

Os soros de macaco foram testados quanto à sua capacidade para inibir a ligação do mAb P3 biotinilado aos fragmentos F(ab')₂ do mAb 1E10 que revestem placas de ELISA usando o método de ELISA descrito atrás, mas em que, após incubação das placas revestidas com as diluições de soro, foram adicionados 50 μ l/alvéolo do mAb P3 biotinilado. Após uma incubação durante uma hora a 37°C, as placas foram lavadas e adicionados 50 μ l/alvéolo do complexo avidina-biotina-peroxidase durante uma hora a 37°C. Após lavagem, adicionou-se o tampão substrato (8 mg de o-fenilenodiamina

em 12 ml de tampão fosfato-citrato, pH 5,0). A absorvância foi medida a 492 nm num leitor de ELISA.

Os soros de macacos imunizados com o mAb anti-IdP3 1E10 reagiram fortemente com os fragmentos F(ab')₂ de 1E10 (Fig. 3). Os soros de macacos imunizados ligaram-se especificamente ao mAb 1E10 da imunização, e apresentaram menos reactividade com um mAb não relacionado (ou C5). A presença de anticorpos contra o idiótipo de 1E10 foi confirmada após incubação dos soros animais com o mAb irrelevante, devido a uma forte reactividade dos soros adsorvidos com o mAb anti-Id3 1E10; surpreendentemente, a resposta de anticorpos anti-idiotípicos induzida foi superior comparativamente com a resposta anti-anticorpo isotípico gerada (Fig. 4). Os soros de macacos Ab3 também inibiram a ligação do mAb P3 biotinilado contra o mAb anti-Id 1E10, indicando que os soros de macaco Ab3 partilham idiotopos com o mAb P3 (Fig. 5). Uma resposta de anticorpos IgG predominante foi gerada contra o mAb anti-IdP3 1E10 (Fig. 6). Os soros dos macacos reagiram com fragmentos F(ab')₂ de 1E10 mesmo 4 meses após os animais receberem a última imunização (Fig. 7), os anticorpos Ab3 com capacidade inibidora da ligação do mAb P3 a 1E10 foram também detectados nessa altura. Não foram detectados anticorpos contra NeuGcGM3 nos soros animais.

Foi demonstrado que o mAb anti-idiotípico 1E10 é do tipo gama, uma vez que o mAb anti-idiotípico 1E10 é capaz de inibir a ligação o mAb P3 com o seu antigénio e

não é capaz de induzir a produção de anticorpos tipo P3 nos animais.

Exemplo 3: Tratamento de ratinhos com o mAb anti-Id 1E10

Ratinhos C57BL/6 foram imunizados com cinco doses de 50 µg do mAb anti-IdP3 1E10 precipitado com hidróxido de alumínio, com intervalos de 14 dias. Uma semana mais tarde, os ratinhos foram injectados subcutaneamente com 5×10^3 células de melanoma. Animais tratados da mesma forma, mas que não receberam o mAb foram usados como testemunha. Na Figura 8 estão apresentadas curvas de sobrevivência Kaplan-Meyer; a sobrevivência foi significativamente melhor no grupo imunizado com o mAb anti-IdP3 1E10 do que no grupo testemunha.

Ratinhos C57BL/6 foram inoculados intravenosamente com 50×10^3 células Lewis de cancro do pulmão. Catorze dias mais tarde, 10 µg de 1E10 foram administradas intravenosamente e, após 6 dias, os ratinhos foram mortos e contado o número de metástases do pulmão. Animais tratados com um mAb IgG irrelevante ou que apenas receberam PBS foram usados como controlos. Sete dos 10 animais tratados com o mAb anti-P3 1E10 não desenvolveram metástases do pulmão, nos outros 3 animais o número total máximo de metástases foi de 3. Pelo contrário, todos os animais tratados com a IgG1 irrelevante ou os que receberam apenas PBS desenvolveram metástases do pulmão. Estes resultados indicam que o tratamento com este mAb anti-Id tipo gama teve um efeito protector contra tumores.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS:

Figura 1: mostra a reactividade do mAb anti-IdP3 1E10 com mAbs anti-gangliósidos P3, E1, A3 e F6.

Figura 2: mostra os resultados de um ensaio de inibição em que o mAb P3 foi incubado com o mAb anti-IdP3 1E10 e mais tarde a reactividade do mAb P3 com NeuGgGM3 foi medida por ELISA.

Figura 3: mostra a reactividade de anticorpos de soro de macaco com os fragmentos $F(ab')_2$ de 1E10 medida por ELISA após o animal ter recebido diferentes doses de mAb anti-Id 1E10 precipitado com hidróxido de alumínio.

Figura 4: Mostra os resultados de um ensaio de inibição em que ambas as reactividades, de um soro de macaco não pré-adsorvido com o mAb 1E10 (-■-) e de um soro de macaco não pré-adsorvido com o isotipo correspondente irrelevante ou o mAb C5 (-●-), foram medidos por ELISA, assim como a ligação de anticorpos séricos ao mAb 1E10 (-□-) e ao mAb irrelevante C5 (-○-). As setas indicam a altura da imunização e a linha contínua o tempo da colheita de sangue.

Figura 5: mostra a inibição da ligação do mAb P3 ao mAb anti-Id 1E10 pelo soro de um macaco imunizado com o mAb 1E10, medido por ELISA. A seta indica a altura da

imunização e a linha contínua a altura da colheita de sangue.

Figura 6: mostra a cinética da resposta de anticorpos IgM e IgG no soro de um macaco imunizado com o mAb anti-idiotípico, medido por ELISA. As setas indicam a altura da imunização e a linha contínua a altura da colheita de sangue.

Figura 7: mostra o reconhecimento dos fragmentos F(ab')₂ de 1E10 por soro pré-imune de macaco; pelo soro obtido após o macaco ter recebido a última dose do mAb anti-idiotípico 1E10 precipitado com hidróxido de alumínio (indicado com a seta) e pelo soro obtido 4 meses após o animal ter recebido a última imunização.

Figura 8: mostra as curvas Kaplan-Meyer para a sobrevivência de ratinhos tratados com o mAb anti-IdP3 1E10 e inoculados com células de melanoma B16.

Lisboa, 19 de Dezembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

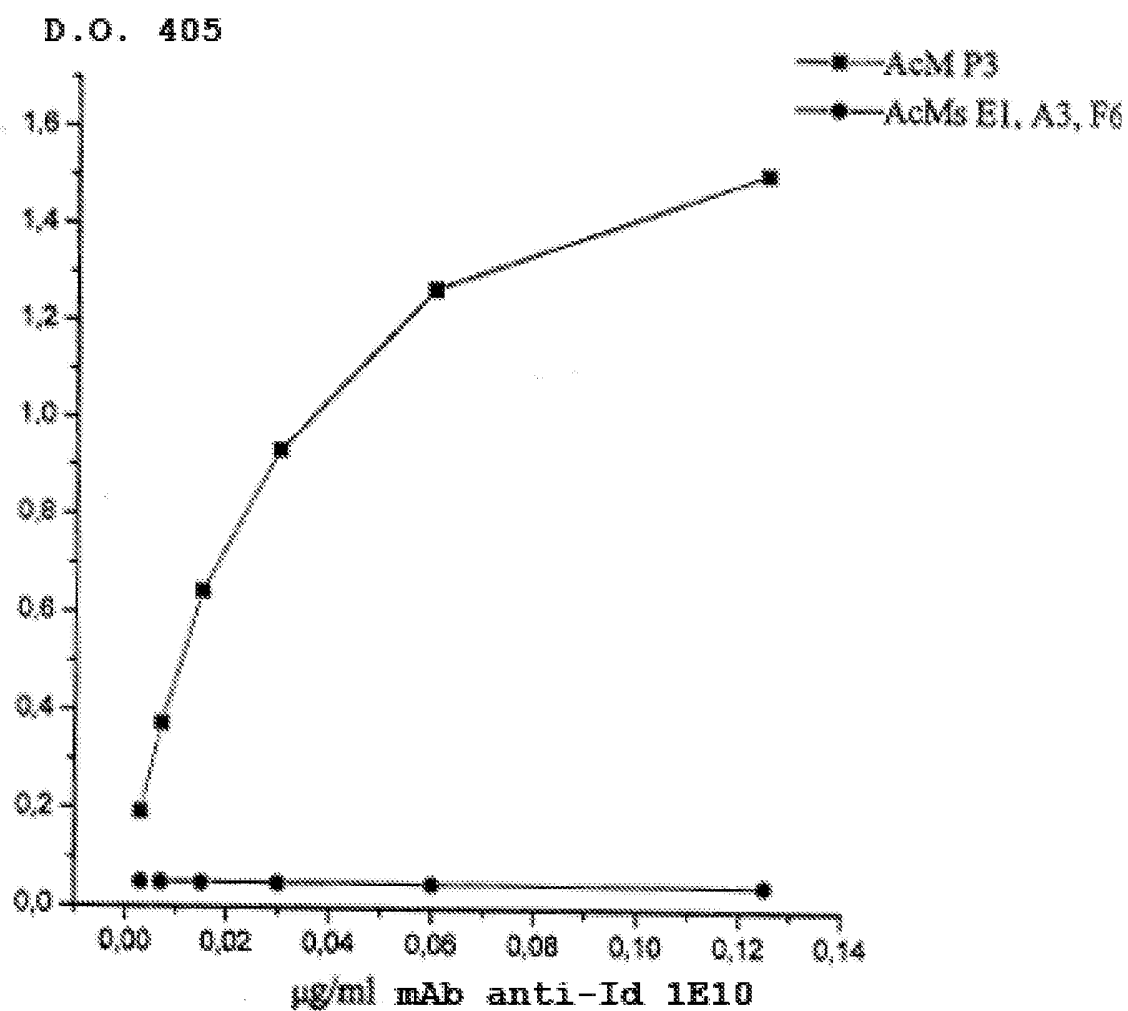
1. Um anticorpo monoclonal anti-idiotípico tipo gama ($\text{Ab}2\gamma$) induzido contra um anticorpo de ratinho contra gangliósidos contendo N-glicolilo produzidos pelo hibridoma depositado com o número de acesso ECACC 94113026, o $\text{Ab}2\gamma$ sendo obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada com o número de acesso ECACC 97112901.

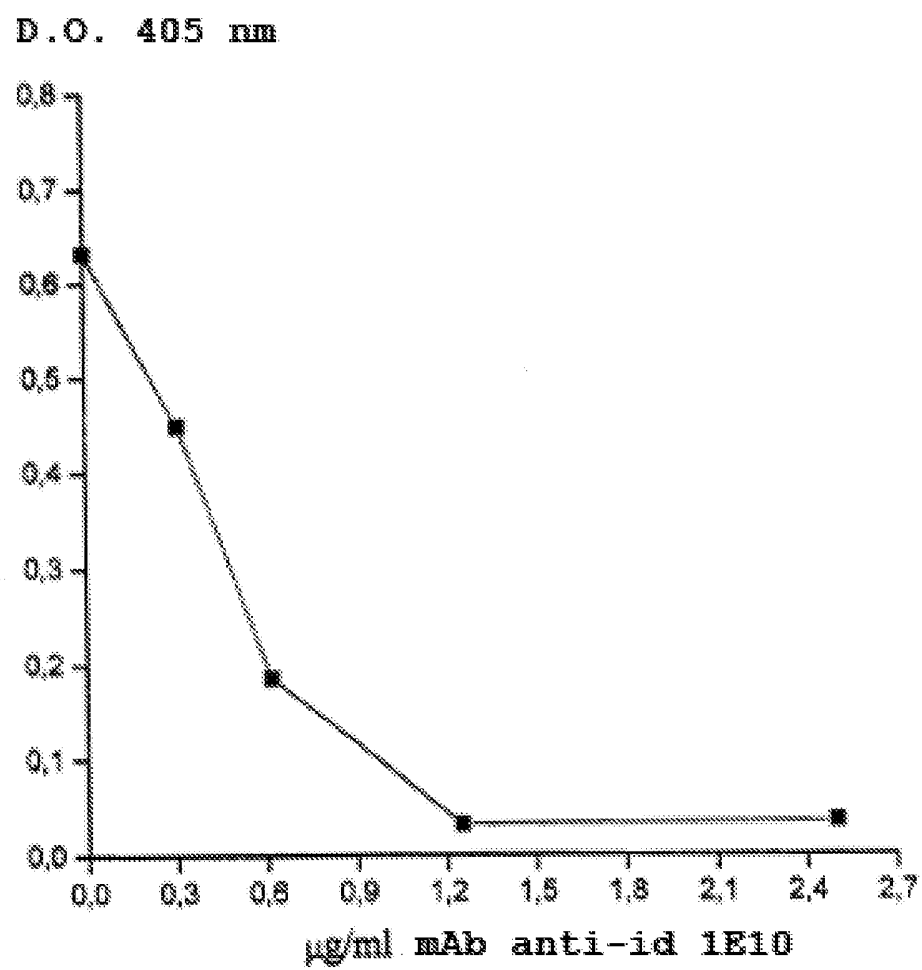
2. Um hibridoma produtor do anticorpo monoclonal da reivindicação 1, depositado com o número de acesso ECAA 97112901.

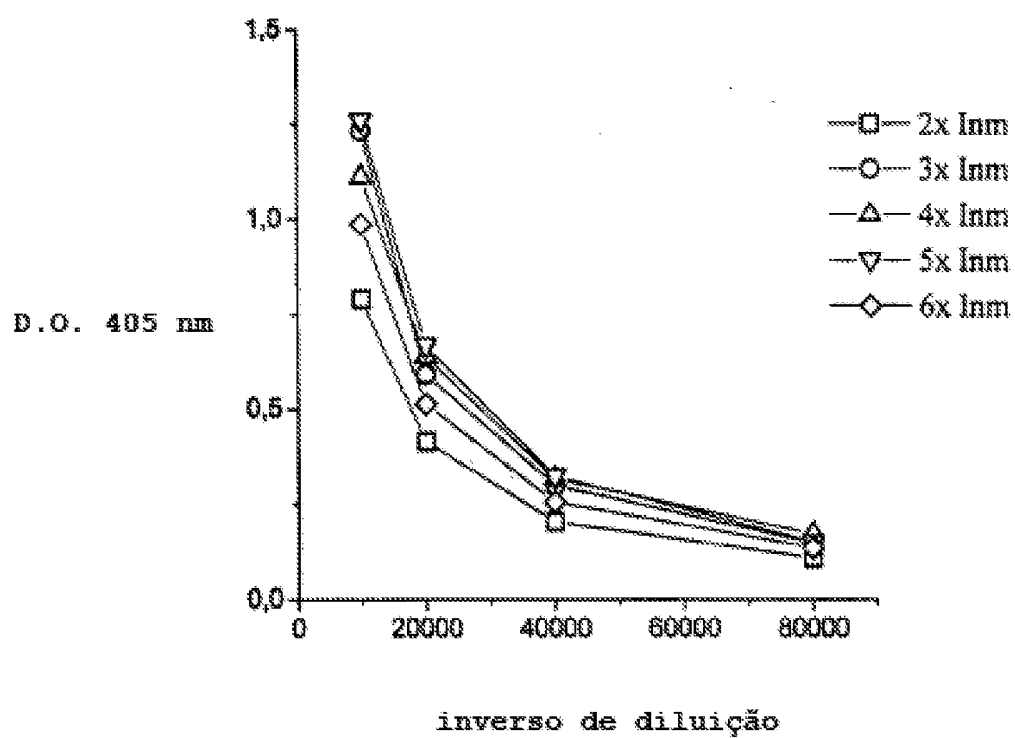
3. Uma composição farmacêutica contendo uma quantidade eficaz do anticorpo monoclonal anti-idiotípico da reivindicação 1, juntamente com um diluente, um adjuvante ou uma molécula veículo.

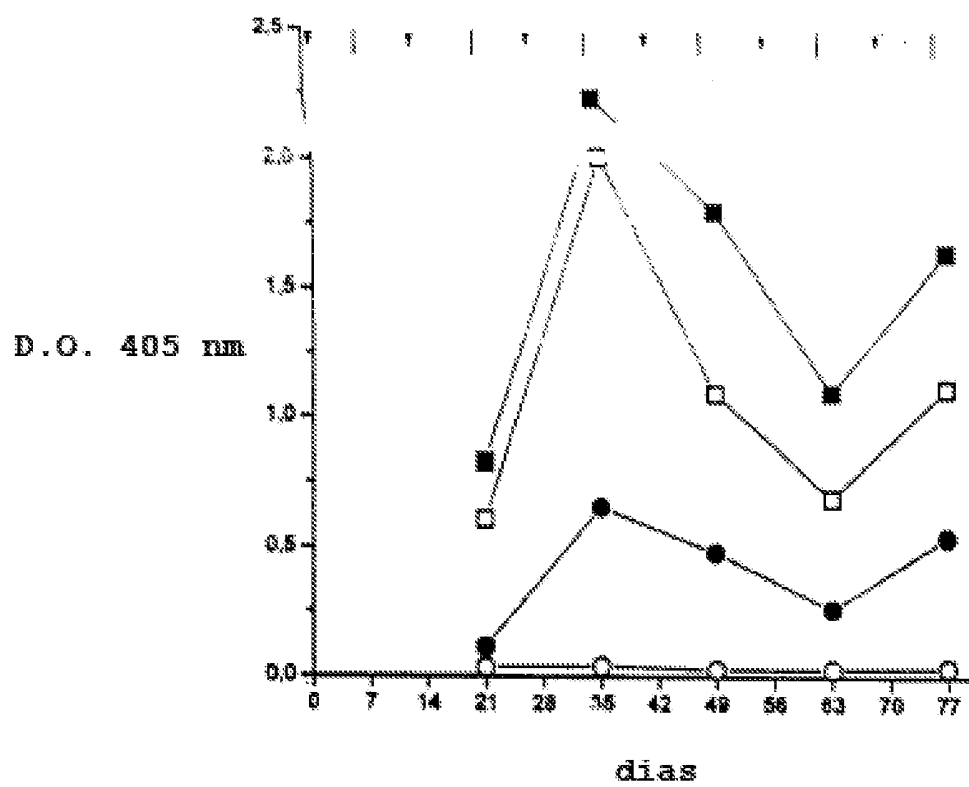
4. Utilização do anticorpo monoclonal da reivindicação 1 para a produção de um medicamento para o tratamento de neoplasias malignas.

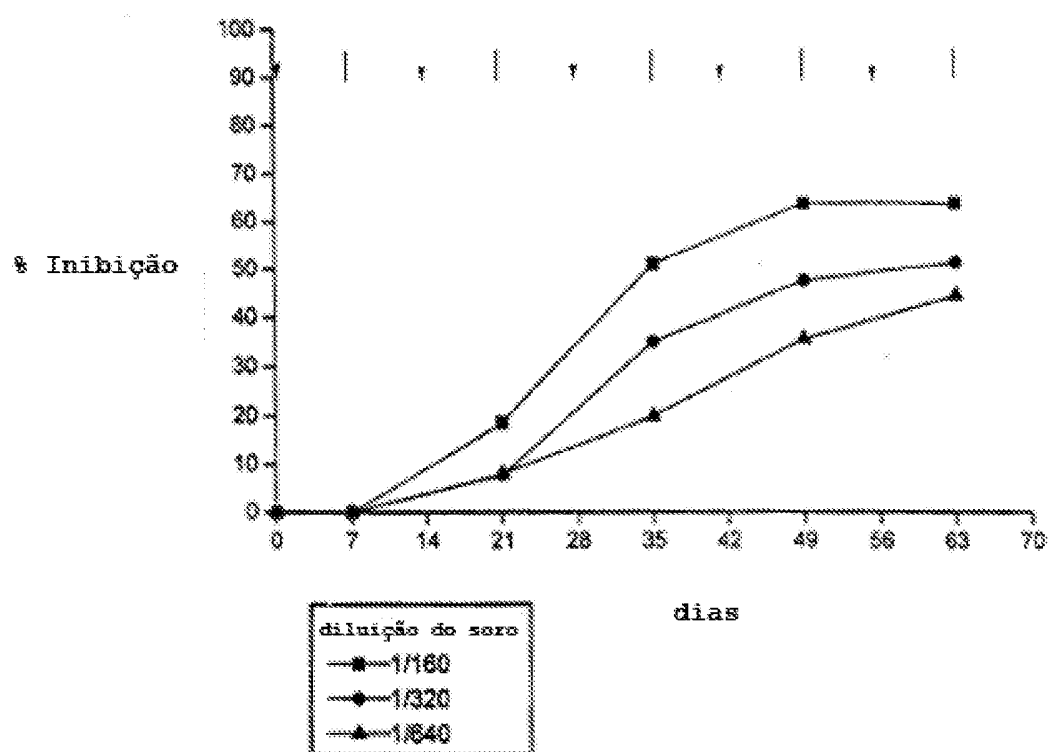
Lisboa, 19 de Dezembro de 2006

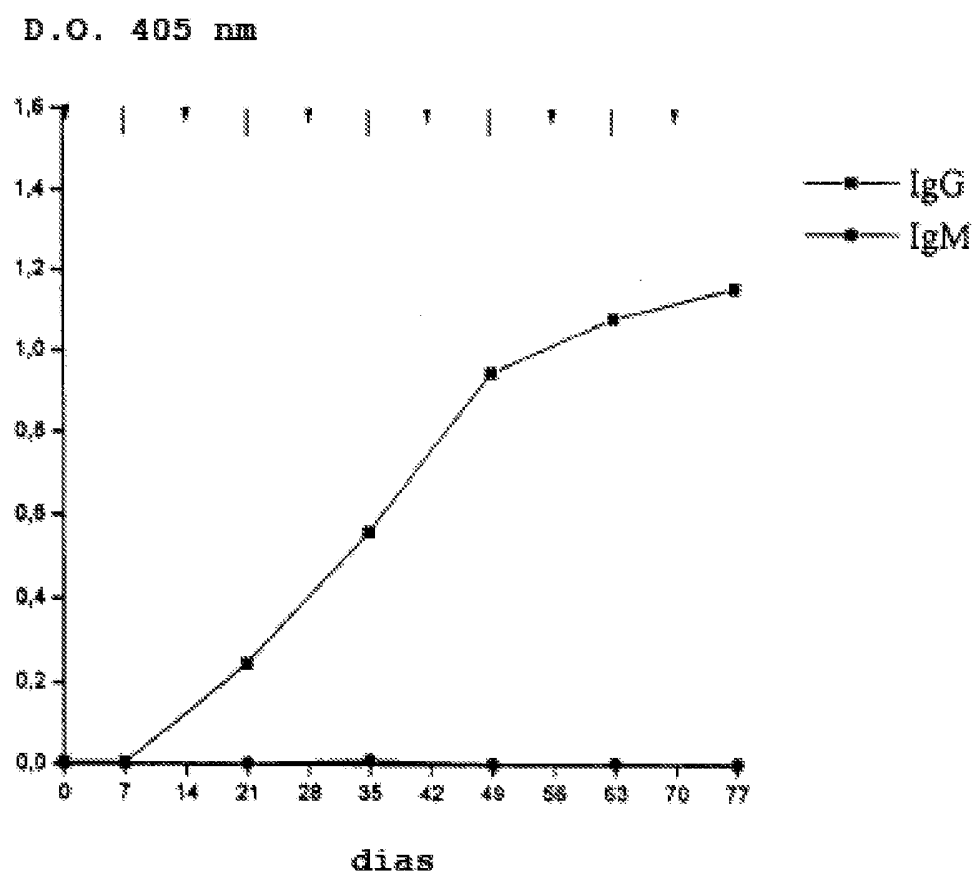
**FIG. 1**

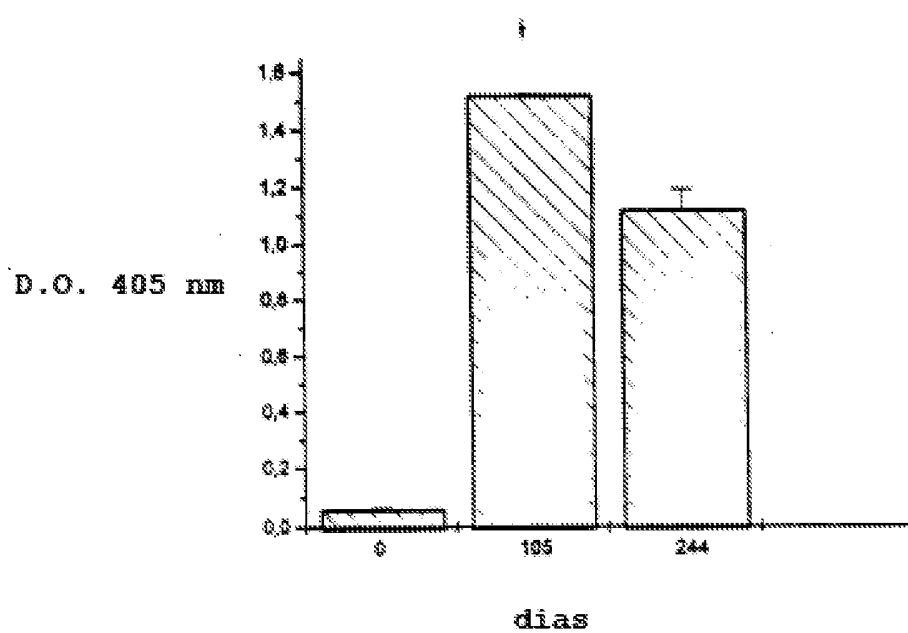
**FIG. 2**

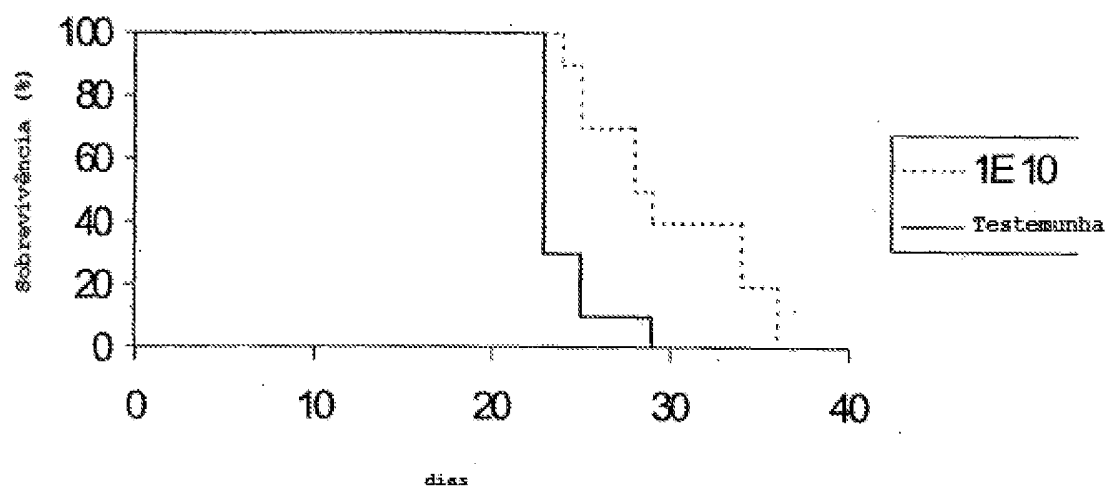
**FIG. 3**

**FIG. 4**

**FIG. 5**

**FIG. 6**

**FIG. 7**

**FIG. 8**