

Invenția se referă la domeniul medicinei, anume la oncologie, și este destinată tratamentului limfomului celulelor B. Sistemul imun al vertebratelor (de exemplu al primatelor, inclusiv uman, al mamiferelor, etc.) constă dintr-o serie de organe și tipuri de celule care au evoluat pentru recunoașterea exactă și specifică a microorganismelor eterogene ("antigen"), care invadează gazda vertebrată, configurarea specifică a acestor microorganisme eterogene și eliminarea lor (distrugerea de astfel de microorganisme eterogene). Printre altele pentru sistemul imun limfocitele sunt critice. Limfocitele sunt produse în timus, splină și măduvă osoasă la maturi și constituie cca 30% din totalul de leucocite sangvine din sistemul circulator uman (adult). Există două subpopulații principale de limfocite: celule T și celule B. Celulele T sunt responsabile pentru imunitatea mediată celular, celulele B - pentru producerea anticorpilor (imunitate umorală).

Fiecare celulă B în gazdă exprimă pe suprafața sa diverși anticorpi. Astfel, o celulă B exprimă un anticorp specific pentru un antigen, în timp ce altă celulă B exprimă anticorp specific pentru alt antigen. Astfel, celulele B sunt absolut diferite și această diversitate are o importanță deosebită pentru sistemul imun. La om fiecare celulă B poate produce un număr enorm de molecule de anticorpi (adică cca de la  $10^7$  la  $10^8$ ). De regulă, o asemenea producere de anticorpi încetează (sau descrește considerabil) după neutralizarea antigenului eterogen. Ocazional, însă, proliferarea anumitelor celule B este continuă și o asemenea proliferare poate avea ca rezultat un cancer, așa-numitul limfom al celulei B.

Atât celulele T, cât și celulele B conțin proteine celulare de suprafață, care se utilizează ca "marcheri" pentru diferențiere și identificare. Unul din acești marcheri ai celulei B umane este antigenul Bp35 uman cu diferențiere limitată a limfocitelor B, indicat ca "CD20". CD20 se exprimă în evoluția precoce a precelulelor B și se menține până la diferențierea celulelor plasmei. În special, molecula CD20 poate regla o etapă în procesul de activare, care este necesar pentru inițierea ciclului celular și diferențiere și, de regulă, se exprimă la niveluri supraînalte pe celule B neoplazice ("tumoare"). prin definiție, CD20 este prezent atât pe celulele B "normale", cât și pe celulele B "maligne", adică pe acele celule B, proliferarea continuă a cărora poate cauza limfomul celulei B. Astfel, antigenul CD20 are toate posibilitățile de a fi "afectat" de limfomul celulei B.

În esență, o astfel de afectare se produce în modul următor: pacientului i se introduc, de exemplu, anticorpi specifici pentru antigenul CD20 al celulei B. Acești anticorpi anti-CD20 se conjugă specific cu antigenul celular de suprafață CD20, evident atât al celulelor B normale, cât și celor maligne. Anticorpii anti-CD20 conjugat cu antigenul de suprafață CD20 poate provoca deteriorarea și epuizarea celulelor B neoplazice. În plus, substanțele chimice sau elementele marcate radioactiv, cu abilitate de distrugere a tumorii, pot fi conjugate cu anticorpii anti-CD20 astfel că substanța special se furnizează, de exemplu în celulele B neoplazice.

Este cunoscută metoda de tratament al limfomului celulelor B prin afectarea antigenului superficial CD20, care include administrarea anticorpului IF5 monoclonal murin (șoarece) (un anticorp anti-CD20) cu ajutorul infuziei intravenoase continue [1].

Este cunoscută metoda de tratament al limfomului celulelor B prin afectarea antigenului superficial CD20, care include administrarea anticorpului IF5 monoclonal murin marcat cu iod - 131 [2].

Dezavantajul metodelor sus-enumerate constituie dozele mari depășind 2 g de IF5 și rezultatele «instabile» ale tratamentului. În afară de aceasta, injecțiile repetate de asemenea anticorpi eterogeni pot duce la inducerea răspunsului imun, provocând reacții periculoase de hipersensibilitate. În plus, acești anticorpi «eterogeni» pot fi expuși acțiunii sistemului imun al gazdei, astfel încât ei în realitate sunt neutralizați până a-și atinge ținta sa.

Este cunoscut anticorpii himeric șoarece-om destinat acțiunii împotriva antigenului CD20 [3].

Însă, nu este furnizată nici o informație despre abilitatea, eficacitatea sau utilizarea practică a acestor anticorpi himerici pentru tratamentul tulburărilor celulei B. Mai mult decât atât, cercetările funcționale *in vitro* nu pot prezice capacitatea inerentă *in vivo* a anticorpilor himerici de a distruge sau reduce celulele țintă care exprimă antigenul specific.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în sporirea eficienței tratamentului limfomului celulelor B.

Problema în cauză se rezolvă prin aceea că pentru tratamentul limfomului celulelor B se administrează o cantitate terapeutic eficientă a unui anticorp anti-CD20 himeric imunologic activ cuprinsă între 0,001 și 30 mg/kg greutate corporală, totodată anticorpii pot fi obținuți din transfectom, cuprinzând anti-CD20 în TCAE 8, depozitat la ATCC sub numărul 69119. Administrarea anticorpului poate fi înfăptuită repetat. Anticorpii pot fi administrați în 3 perioade, a doua perioadă a tratamentului fiind realizată cel târziu peste 7 zile de la prima perioadă, iar perioada a treia a tratamentului - cel târziu peste 14 zile de la prima perioadă. În a doua perioadă a tratamentului se poate administra un anticorp anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi, cuprinzând anticorp monoclonal secretat de hibridomul depozitat la ATCC sub numărul HB 11388.

În afară de aceasta, se solicită un hibridom cu depozitul la ATCC sub numărul HB 11388, care secretă anticorpii anti-CD20 și un anticorp anti-CD20 monoclonal secretat de el. Anticorpii pot fi marcat cu izotopi radioactivi, totodată marcajul radioactiv se alege din grupa care include ytriu [90], indiu [111] și iod [131] și se folosește în cantități terapeutice eficiente.

Limfomul celulelor B, de asemenea, se tratează pe calea administrării în prima perioadă a tratamentului a anticorpului anti-CD20 himeric imunologic activ, apoi în a doua perioadă a tratamentului a anticorpului anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi, totodată se poate administra un anticorp anti-CD20 himeric, derivat de la un transfectom cuprinzând anti-CD20 în TCAE 8, depozitat la ATCC ca parte a numărului 69119. În a doua perioadă a

tratamentului se poate administra anticorpii anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi, care pot conține anticorpii monoclonal secretat de hibridomul depozitat la ATCC sub numărul HB 11388.

Celulele B sunt responsabile pentru producerea anticorpilor și în cazul intrării antigenului în organismul uman are loc stimularea lor față de diferențierea și producerea de către celulele B a anticorpilor împotriva antigenului.

Însă uneori proliferarea anumitelor celule B continuă neîncetat, ceea ce poate provoca tumoarea, numită «limfomul celulei B». Celulele B conțin proteine superficiale, care se utilizează pentru diferențiere și identificare. Unul din acești markeri ai celulelor B este antigenul Bp35 uman cu diferențiere limitată a limfocitului B marcat «CD20».

Administrarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi, specifici la antigenul superficial CD20 provoacă distrugerea rapidă și extenuarea celulelor B neoplazice, ceea ce conduce la extenuarea celulelor B ale sângelui periferic, inclusiv a celulelor B ale limfomului, întrucât ele posedă funcționalitatea efectorilor omului, adică sunt în stare să completeze liza dependentă de complement sau să supună lizei celulele țintă umane cu ajutorul toxicității celulare care este în funcție de anticorpi sau prin intermediul fagocitozei completate de receptorii Fc.

Administrarea anticorpilor anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi înlătură problema accesului limitat la limfom, totodată face posibilă reducerea cantității totale a anticorpului necesar.

Administrarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi poate fi realizată ca administrare unică sau ca o serie de administrări succesive fără temeri față de posibilitatea dezvoltării reacției de hipersensibilitate. Iar administrarea combinată a anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi și anticorpilor anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi face posibil de a reduce dozajul anticorpilor administrați, de a distruge mai rapid și sigur limfomul, fără inducerea răspunsului imunologic.

Rezultatul constă în distrugerea și extenuarea direcțională a celulelor B neoplazice și destituirea reacției de hipersensibilitate.

Invenția se elucidează prin desenele prezentate în fig. 1-17:

- fig. 1, reprezentare diagramatică a vectorului de expresie al anticorpilor himerici în tandem, folosit pentru producerea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi («TCAE 8»);
- fig. 2A-2E, secvența acidului nucleic a vectorului din fig. 1;
- fig. 3A-3F, secvența acidului nucleic a vectorului din fig. 1, cuprinzând în plus segmentele variabile ale catenelor ușoare și grele murine («anti-CD20 în TCAE 8»);
- fig. 4, acidul nucleic și secvențele aminoacide (inclusiv CDR și segmentele constante) ale segmentelor variabile ale catenei ușoare murine derivată de la anticorpii 2B8 anti-CD20 monoclonal murin;
- fig. 5, acidul nucleic și secvențele aminoacide (inclusiv CDR și segmentele constante) ale segmentelor variabile ale catenei grele murine derivate de la anticorpii 2B8 anti-CD20 monoclonal murin;
- fig. 6, rezultatele citometriei curgătoare care confirmă legarea C1q uman marcat prin fluorescență cu anticorpii anti-CD20 himerici, ce include în calitate de martor C1q marcat; C1q marcat și anticorpii 2B8 anti-CD20 monoclonal murin; C1q marcat și IgG1, k uman;
- fig. 7, rezultatele lizei mediate de complement comparând anticorpii anti-CD20 himerici și anticorpii 2B8 anti-CD20 monoclonal murin;
- fig. 8, rezultatele citotoxicității celulare mediate de anticorpi cu celule efectoare umane *in vivo*, comparând anticorpii anti-CD20 himerici și 2B8;
- fig. 9, rezultatele limfopeniei celulelor B ale sângelui periferic la primatele non-umane după infuzia a 0,4 mg/kg (A) de anticorpii anti-CD20 himerici imunologic activi;
- fig. 10, rezultatele limfopeniei celulelor B ale sângelui periferic la primatele non-umane după infuzia a 1,6 mg/kg de anticorpii anti-CD20 himerici imunologic activi;
- fig. 11, rezultatele limfopeniei celulelor B ale sângelui periferic la primatele non-umane după infuzia a 6,4 mg/kg de anticorpii anti-CD20 himerici imunologic activi;
- fig. 12, rezultatele limfopeniei celulelor B ale sângelui periferic la primatele non-umane după infuzia a 0,01 mg/kg de anticorpii anti-CD20 himerici imunologic activi;
- fig. 13, rezultatele impactului tumoricid al Y2B8 într-un model xenografic de șoarece utilizând o tumoare limfoblastică de celule B;
- fig. 14, rezultatele impactului tumoricid al C2B8 într-un model xenografic de șoarece utilizând o tumoare limfoblastică de celule B;
- fig. 15, rezultatele impactului tumoricid al combinației Y2B8 și C2B8 într-un model xenografic de șoarece utilizând o tumoare limfoblastică de celule B;
- fig. 16, rezultatele analizei clinice la stadiul I/II demonstrând extenuarea populației de celule B sub acțiunea C2B8 peste un anumit timp la pacienții la care se manifestă o remisiune parțială;
- fig. 17, rezultatele analizei clinice la stadiul I/II demonstrând extenuarea populației de celule B sub acțiunea C2B8 peste un anumit timp la pacienții la care se manifestă o remisiune minoră.

#### *Prezentarea pe scurt a invenției*

Aici sunt descrise metode terapeutice de tratament al tulburărilor celulelor B și, în special, al limfoamelor celulelor B.

Aceste protocoale se bazează pe administrarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi. Pentru reducerea celulelor B în sângele periferic, inclusiv a celulelor B asociate cu limfom, se aplică administrarea anticorpilor anti-

CD20 marcați radioactiv pentru țintirea celulelor B și administrarea anticorpilor anti-CD20 himerici și anticorpilor anti-CD20 marcați radioactiv într-o strategie terapeutic asociată.

Utilizarea unui anumit anticorp anti-CD20, care se conjugă specific cu antigenul CD20 celular superficial, provoacă o digerare direcțională și o epuizare a celulelor neoplazice (făcând generalul), adică, înlătură dereglările celulelor B, vindecând limfomul celular B (făcând specialul).

Așa cum se va aprecia de specialiștii în domeniu, vectorii TCAE utilizați în prezenta invenție permit reducerea substanțială avantajosă a timpului necesar pentru generarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi. Generarea și izolarea segmentelor variabile ale catenelor ușoare și grele non-umane urmată de încorporarea acestora în caseta transcripțională constantă a catenei grele umane permit producerea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi.

Descrierea detaliată a invenției

Drept consecință a efectului de atenuare al limfomului celulelor B și a celei mai curente necesități de a asigura în practică tratamentul viabil al acestei maladii, au fost elaborate diverse metode, folosind anticorpul specific 2B8 în calitate de element de legătură între metode. În cadrul uneia din ele se exploatează avantajos capacitatea sistemelor de mamifere de a recunoaște cu ușurință și eficient celulele B sangvine periferice, folosind această metodă se înlătură sau se reduc celulele B în sângele periferic și țesutul limfatic cu scopul înlăturării limfomului celulelor B. Aceasta se realizează prin utilizarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi. Într-o altă abordare s-au făcut tentative de distrugere a celulelor efectoare tumorale cu marcaje radioactive.

O altă abordare, cea mai preferată pentru dezvoltarea anticorpului anti-CD20 himeric non-uman, se bazează pe utilizarea unui vector de expresie care include inițial DNA ce codifică segmentele constante din catenele grea și ușoară dintr-o sursă umană. Un asemenea vector permite inserarea de DNA ce codifică segmentul variabil non-uman astfel, încât se pot genera diverși anticorpi anti-CD20 non-umani, care se pot cerceta și analiza.

Ceea ce este nevoie și ceea ce ar fi un avantaj mare în domeniu, sunt abordările terapeutice având ca obiect antigenul CD20 pentru tratamentul limfoamelor celulelor B la primat, inclusiv, dar fără să se limiteze la oameni.

Termenul "anticorp anti-CD20", folosit în prezenta descriere, semnifică un anticorp care recunoaște specific o fosfoproteină neglicozilară pe suprafața celulară și care are o mărime de 35 000 Daltoni, de regulă, numită antigen Bp35 cu diferențiere limitată a limfocitelor B, uman menționat ca CD20. Termenul "himeric" folosit cu referire la anticorpii anti-CD20 cuprinde anticorpi care sunt derivați preferențial folosind metode recombinate cu acid dezoxiribonucleic care conțin atât componente umane, cât și non-umane (inclusiv specii imunologic "înrudite", de exemplu cimpanzeu), segmentul constant al anticorpului himeric este preferențial identic cu segmentul constant al unui anticorp uman natural; segmentul variabil al anticorpului himeric este derivat preferențial de la o sursă non-umană și are antigenicitatea și specificitatea dorită față de antigenul CD20 pe suprafața celulei. Sursa non-umană poate fi orice animal vertebrat care poate fi folosit pentru a genera anticorpi față de antigenul CD20 uman celular de suprafață sau un material ce include antigenul CD20 uman pe suprafața celulei. Asemenea surse non-umane includ (fără însă a se limita) rozătoare (de exemplu șoareci, șobolani, iepuri, etc.) și primat non-umane (Old World Monkey, maimuțe, etc.). În special, componenta non-umană (segmentul variabil) este derivată dintr-o sursă murină. Expresia "imunologic activ" folosită aici cu referire la anticorpii anti-CD20 himerici semnifică un anticorp himeric care fixează C1q uman și prezintă veriga intermediară a lizei mediate de complement ("CDC") a liniilor de celule B limfoide umane și a lizei celulelor țintă umane prin citotoxicitate celulară intermediată de anticorpi ("ADCC"). Expresiile "marcare indirectă" și "principiul marcării indirecte" folosite aici exprimă că un agent chelatic este atașat covalent la un anticorp și, cel puțin, un radionuclid este inserat în agentul chelatic. Agenții chelatici și radionuclizii preferențiali sunt descriși în sursele [Srivagtava, S.C. și Mease, R.C.; "Progress în Research on Ligands, Nuclides and Techniques for Labeling Monoclonal Antibodies", Nucl. Med. Bio., 18/6, 1991, p. 589-603]. Un agent chelatic preferențial este acidul l-izotiocismatobenzil-3-metildiotilen triaminpentacetic ("MX-DTPA"); radionuclizii preferați pentru marcarea indirectă includ indiu [111] și ytriu [90]. Expresiile "marcare directă" și "principiul marcării directe" folosite aici exprimă că un radionuclid este atașat covalent direct la un anticorp (de regulă, prin restul aminoacid). Radionuclizii preferați sunt prezentați în [Srivagtava, S.C. și Mease, R.C.; "Progress în Research on Ligands, Nuclides and Techniques for Labeling Monoclonal Antibodies", Nucl. Med. Bio., 18/6, 1991, p. 589-603]; iar radionuclidul cel mai preferat pentru marcarea directă este iodul [131] atașat covalent prin intermediul resturilor tirozinice. În special preferat însă este principiul marcării indirecte.

Metodele terapeutice descrise aici se bazează pe proprietățile sistemului imun al primatelor de a recupera rapid sau de a revitaliza celulele B din sângele periferic. În plus, datorită răspunsului imun principal al primatelor ocazionat de celulele T, în cazurile când sistemul imun are o deficiență de celule B în sângele periferic, se exclude necesitatea precauțiilor "extraordinare" (adică, izolarea pacientului, etc.). Ca o consecință a acestor și altor proprietăți ale sistemului imun al primatelor, principiul propus de terapie a tulburărilor celulelor B prevede înlăturarea celulelor B din sângele periferic folosind anticorpii anti-CD20 himerici imunologic activi.

Întrucât afectarea celulelor B din sângele periferic, conform definiției, poate indica necesitatea tratamentului sângelui, calea preferențială de administrare a anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi și anticorpilor anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi este cea parenterală. termenul "parenteral" folosit aici include administrarea intravenoasă, intramusculară, subcutanată, rectală, vaginală sau intraperitoneală, cea mai preferată fiind cea intravenoasă.

Anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi și anticorpilor anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi, de regulă, se obțin prin tehnici standard, folosind un tampon acceptabil farmaceutic, de exemplu soluție fiziologică sterilă, apă-tampon sterilă, propilenglicol sau combinațiile lor, etc. Procedeele de preparare a agenților pentru administrare parenterală sunt deja cunoscute [Pharmaceutical Carriers & Formulations, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed. (Mack Pub. Co., Easton, PA 1975)].

Cantitatea terapeutic eficientă, specifică a anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi, utilă pentru producerea unui efect terapeutic unic asupra oricărui pacient poate fi determinată prin tehnici standard bine cunoscute pentru specialiștii în domeniu.

Dozajele eficiente (adică, cantitățile terapeutic eficiente) ale anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi, sunt cuprinse într-un domeniu aproximativ de la 0,001 până la 30 mg/kg greutate corporală, de preferință, de la cca 0,01 până la 25 mg/kg greutate corporală, cea mai preferențială fiind gama cuprinsă între cca 0,4...20,0 mg/kg greutate corporală. Sunt viabile și alte dozaje. Factorii care influențează dozajul includ, însă nu se limitează, severitatea bolii, tratamentele anterioare, starea generală a sănătății pacientului, alte boli prezente, etc. Specialistul în domeniu poate cu ușurință să analizeze starea unui pacient și să determine doza necesară din gama menționată de dozaje sau, dacă este cazul, o doză depășind aceste limite.

Administrarea anticorpilor anti-Cd20 himerici imunologic activi în acest domeniu de doze poate fi realizată ca administrare unică sau mai multe administrări succesive. În ce privește anticorpilor himerici, este de preferință o serie de administrări succesive. Această metodă preferată este elaborată pe bază de tratament metodologic al acestei maladii. Evitând aprofundarea în teorie, urmează de menționat că datorită activității imunologice și legăturii cu CD20, anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi, chiar de la prima administrare produc extenuarea celulelor B în sângele periferic; mai mult ca atât, se observă o reducere aproape completă în cca 24 de ore după tratamentul prin infuzie. Deci, drept indicație pentru administrare(-ări) ulterioară a anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi (sau anticorpilor anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi) pot prezenta: a) celulele B clare în sângele periferic; b) inițierea extenuării celulelor B din ganglionii limfatici; c) inițierea extenuării celulelor B din alte surse tisulare, de exemplu din măduva osoasă, tumoare, etc. Altfel formulat, prin administrările repetate ale anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi, are loc o serie de fenomene, fiecare fiind considerat important pentru tratamentul eficient al bolii. Primul "fenomen" poate fi considerat ca orientat în principal spre a reduce substanțial celulele B din sângele periferic al pacientului; următoarele "fenomene" pot fi considerate fie ca orientate în special spre a înlătura simultan sau succesiv celulele B remanente din sistemul ganglionilor limfatici, fie ca înlăturare a celulelor B din alte țesuturi.

Realmente, în timp ce un dozaj unic asigură un efect pozitiv și poate fi utilizat eficient pentru tratarea și manipularea bolii, este preferențială o serie de tratament în câteva etape. Este recomandabil de a se administra pacientului o dată pe săptămână, timp de cca 2...10 săptămâni, preferențial 4 săptămâni, cca 0,4...20 mg/kg greutate corporală de anticorpi anti-CD20 himerici imunologic activi.

Referitor la folosirea anticorpilor anti-Cd20 marcați cu izotopi radioactivi este preferabil ca anticorpii să nu fie himerici. Acest fapt este dictat de perioada circulatorie de înjumătățire semnificativ mai lungă a anticorpilor himerici față de anticorpilor murini (adică, radionuclidul cu o perioadă circulatorie de înjumătățire mai lungă este prezent în organismul pacientului un timp mult mai îndelungat). Totuși, anticorpilor himerici marcați cu izotopi radioactivi pot fi utilizați benefic în dozaje mult mai scăzute, în mili-Curie ("mCi"), împreună cu un anticorp himeric înrudit cu anticorpii murini. Acest fapt permite reducerea toxicității în măduva osoasă până la un nivel acceptabil, menținând în același timp efectul terapeutic.

Conform prezentei invenții pot fi aplicați mulți și diverși radionuclizi cunoscuți din care specialiștii în domeniu vor avea posibilitatea să determine ușor radionuclidul adecvat pentru fiecare caz concret.

Cu apariția agenților chelatici superiori posibilitatea atașării grupelor chelatice metalice la proteine a permis de a utiliza alți radionuclizi, cum sunt indiul [131] și ytriul [90]. Ytriul [90] are câteva avantaje în cazul utilizării în radioimunoterapie: perioada de înjumătățire a ytriului [90] de 64 de ore este suficient de lungă pentru a permite acumularea anticorpilor în tumoare și, de exemplu, spre deosebire de iod [131], ytriul [90] este un emițător pur de radiație beta de energie înaltă neînsoțită de radiația gama la atenuarea ei cu un domeniu în țesuturi de la 100 până la 1000 diametre celulare. În plus, cantitatea minimă de radiație penetrantă permite administrarea anticorpilor marcați cu ytriu [90] pacienților fără să fie în mod necesar spitalizați. Mai mult decât atât, nu este necesară interalierarea anticorpului marcat pentru distrugerea celulelor, iar emisia locală de radiație ionizantă va fi letală pentru celulele tumorale învecinate lipsite de antigen țintă.

Unica limitare neterapeutică pentru ytriu [90] se bazează pe absența radiației gama semnificative care face dificilă obținerea imaginii. Pentru evitarea acestor probleme se poate utiliza un radionuclid de diagnosticare cum este indiul [111] care "formează imagini" pentru localizarea și determinarea mărimii relative a tumorii înaintea administrării dozei terapeutice de anti-Cd20 marcat cu ytriu [90]. Indiul [111] este preferat în special ca radionuclid de diagnosticare, deoarece în doză de cca 1...10 mCi el este inofensiv și poate fi administrat fără toxicitate manifestă; datele tomografice, de regulă, se prognozează prin distribuția ulterioară a anticorpului marcat cu ytriu [90]. De regulă, în studiile tomografice se utilizează anticorpii marcati cu 5 mCi de indiul [111], deoarece această doză este sigură și inofensivă, cu un rezultat tomografic substanțial eficientizat comparativ cu dozele mai mici, imaginea optimă fiind obținută la 3...6 zile după administrarea anticorpului [Murray J.L., 26 J. Nuc. Med., 1985, p. 3328 și Carragullo, J.A. et al., 26 J. Nuc. Med., 1985, p. 67].

Dozajele unice eficiente ale tratamentului (adică, cantitățile terapeutic eficiente) ale anticorpilor anti-CD20 marcați cu ytriu [90] sunt încadrate în domeniul de cca 5...75 mCi, preferabil între cca 10 și cca 40 mCi. Dozajele ablative unice, eficiente de tratament (adică, pot necesita transplantare de măduvă osoasă) ale anticorpilor anti-CD20 marcați cu iod [131] sunt cuprinse în domeniul de cca 30...600 mCi, de preferință, de la cca 50 și mai puțin decât cca 500 mCi. În combinație cu un anticorp anti-CD20 himeric, datorită perioadei circulatorii de înjumătățire mai îndelungate față de anticorpii murini, dozele ablative unice eficiente pentru tratamentul măduvei non-osoase ale anticorpilor anti-CD20 himerici marcați cu iod [131] sunt cuprinse în domeniul de cca 5...40 mCi, de preferință mai puțin de cca 30 mCi. Doza necesară, de exemplu a marcajului cu indiu [111] pentru obținerea imaginii constituie cel mult 5 mCi.

În ce privește anticorpii anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi, se poate aplica o terapie la fel folosind un tratament terapeutic unic sau folosind tratamente multiple. Datorită componentei radionuclidice, este de preferat ca înaintea tratamentului să fie prelevate celule din ramificațiile periferice ("PSC") sau măduva osoasă ("BM") la pacienții care manifestă toxicitate potențială fatală a măduvei osoase sub acțiunea radiației ionizante. BM și/sau PSC se prelevă folosind tehnici standard, apoi se curăță și se congelează pentru o posibilă reinfuzie. Suplimentar, adesea este de preferat ca anterior tratamentului să se facă un examen dozimetric de diagnosticare al pacientului, folosind un anticorp marcat pentru diagnosticare (de exemplu, folosind indiu [111]), scopul fiind asigurarea următorului moment: anticorpul marcat terapeutic (de exemplu, cu ytriu [90]) nu se va "concentra" în alt țesut sau organ sănătos. specialiștilor în domeniu le sunt cunoscute metodologiile de generare a anticorpilor himerici. De exemplu, catenele ușoare și grele pot fi exprimate separat folosind, de exemplu, catena ușoară a imunoglobulinei și catenele grele ale imunoglobulinei în plasmide separate. Apoi, acestea pot fi purificate și colectate *in vitro* în anticorpi complecși. sunt cunoscute metodologiile de obținere a unor asemenea structuri [Scharff, M; Harvey Lectures, 1974, vol. 69, p. 125]. sunt, de asemenea, cunoscuți parametrii reacției *in vitro* pentru obținerea anticorpilor IgG din catene grele și ușoare izolate reduse [Beychok, S. Cells of immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, p. 69, 1979]. De asemenea, este posibilă coexpresia catenelor ușoare și grele în aceleași celule pentru a obține asocierea intracelulară și conexiunea catenelor grele și ușoare în anticorpi complecși H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>IgG. Asemenea coexpresie se poate realiza folosind aceeași plasmidă sau plasmide diferite în aceeași celulă gazdă. Conform invenției, cei mai preferați anticorpi anti-CD20 himerici s-au obținut folosind vectorul TCAE 8 (această regiune reprezintă o secvență parțial slăbită Kozak).

Detalii referitoare la impactul sitului de start al inițierii markerului selectiv dominant al vectorilor TCAE (numiți, de asemenea, "vectori ANEX") vizavi de expresia proteinei sunt dezvăluite în cererea depusă și examinată paralel și include sectoare variabile murine, preparate din anticorpul anti-CD20 monoclonal. Acest anticorp se notează "2B8". TCAE 8 cuprinde patru (4) casete transcripționale amplasate în tandem, adică, catenă ușoară de imunoglobulină umană fără regiune variabilă; catenă grea de imunoglobulină umană fără regiune variabilă; DHFR și NEO. Fiecare casetă transcripțională conține propriul său promotor eucariotic și regiunea de poliadenilare (referința este făcută la fig. 1, care este o reprezentare diagramatică a vectorului TCAE 8). În special:

- 1) promotorul/intensificatorul CMV în fața catenei grele a imunoglobulinei este o versiune truncată a promotorului/intensificatorului din fața catenei ușoare de la situl Nhe I cca - 350 până la situl Sst I cca -16;
- 2) o regiune constantă a catenei ușoare de imunoglobulină umană s-a derivat pe calea amplificării cDNA printr-o reacție PCR. În TCAE 8 s-au folosit regiuni constante kapa ale catenei ușoare de imunoglobulină umană (numerotate conform Kabat, aminoacizii 108...214 alotip km 3 [Kabat, E.A. "Sequences of Proteins of immunological interest", NIH Publication, Fifth Ed., No. 91, 1991, p. 3242] și regiunea constantă gama 1 a catenei grele de imunoglobulină umană (numerotate conform Kabat a aminoacizilor 114...478, alotip Gmla, Gmlz). Catena ușoară s-a izolat din sângele uman normal (IDEC Pharmaceuticals Corporation, La Jolla, CA) ; RNA de aici s-a folosit pentru sinteza cDNA, care apoi a fost amplificat folosind tehnici PCR (primerii s-au derivat exact conform Kabat). Catena grea s-a izolat (folosind tehnici PCR) din cDNA preparat de la RNA care, la rândul său, s-a derivat din celule în care a fost transfectat un vector IgG1 uman [3 Prot. Eng. 531, 1990; vectorul pN<sub>γ</sub>162]. S-au substituit doi aminoacizi în IgG1 uman izolat pentru împerecherea secvenței aminoacide conform Kabat, anume: în poziția 225 aminoacidul valină a fost substituit cu alanină (GTT cu GCA), iar în poziția 287 aminoacidul metionină s-a substituit cu lizină (ATG cu AAG);
- 3) casetele catenelor ușoare și grele de imunoglobulină umană conțin secvențe de semnal sintetice pentru secretarea catenelor imunoglobulinei;
- 4) casetele catenelor ușoare și grele de imunoglobulină umană conțin situri DNA de restricție specifice care permit inserarea regiunilor variabile ale catenelor ușoare și grele de imunoglobulină care mențin cadrul de citire tranzițional și nu alterează aminoacizii prezenți, de regulă, în catenele imunoglobulinei;
- 5) caseta DHFR conține propriul său promotor eucariotic (promotorul principal pe baza β-globinei de șoarece, "BETA") și regiunea de poliadenilare (poliadenilarea hormonului bovin de creștere, "BGH");
- 6) caseta NEO conține propriul său promotor eucariotic (BETA) și regiunea de poliadenilare (poliadenilare precoce SV40, "SV").

Referitor la vectorul TCAE 8 și caseta NEO, regiunea Kozak a fost parțial extenuată prin secvență conform Kozak (care include un sit Cla I în amonte);

Cla I -3 +1

GGGAGCTTGG ATCGAT ccTct ATG Gtt

(în vectorul TCAE 5.2, substituirea are loc între regiunile Cla 1 și ATG, anume: ccAcc).

Lista secvenței complete TCAE 8 (inclusiv componentele specifice ale celor 4 casete transcripționale) este prezentată în fig. 2 (secvența 1D nr. 1).

Așa cum se va aprecia de specialiștii în domeniu, vectorii TCAE permit reducerea substanțială avantajoasă a timpului necesar pentru generarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi. Generarea și izolarea regiunilor variabile ale catenei ușoare și grele non-umane urmată de încorporarea acestora în caseta transcripțională constantă a catenei ușoare și în caseta transcripțională constantă a catenei grele umane permit producerea de anticorpi anti-CD20 himerici imunologic activi.

S-a derivat o regiune variabilă non-umană preferențială cu specificitate față de antigenul CD20 folosind o sursă murină și tehnologia hibridoamelor. Folosind reacția de polimerizare de lanț ("PCR"), regiunile variabile murine ușoară și grea s-au clonat direct în vectorul TCAE 8, aceasta fiind ruta preferabilă pentru încorporarea regiunii variabile non-umane în vectorul TCAE. Această preferință este, în principiu, bazată pe eficiența reacției PCR și corectitudinea inserării. Totuși pentru realizarea acestei sarcini sunt acceptabile și alte proceduri echivalente. De exemplu, folosind TCAE 8 (sau un vector echivalent) se poate obține secvența regiunii variabile a anticorpului anti-CD20 non-uman, urmată de sinteza oligonucleotidelor, porțiunilor secvenței sau dacă corespunde, a întregii secvențe; ulterior, porțiunile sau întreaga secvență sintetică se poate insera în localizările corespunzătoare din vector. Specialiștii în domeniu au pregătirea pentru realizarea acestora.

Anticorpii anti-CD20 himerici imunologic activi, conform invenției, preferențial s-au derivat din utilizarea vectorului TCAE 8 care a inclus regiuni variabile derivate de la anticorpul monoclonal față de CD20; acest anticorp (va fi descris în detaliu în continuare), s-a numit "2B8". Secvența completă a regiunilor variabile obținute din 2B8 în TCAE 8 ("anti-CD20 în TCAE 8") este prezentată în fig. 3 (secvența 1D nr. 2).

Linia celulară gazdă utilizată pentru expresia proteinei preferențial este de origine mamiferă. Specialiștii în domeniu pot determina liniile celulare gazdă speciale ce sunt cele mai adecvate pentru produsul genetic opțional care trebuie exprimat în ele. Liniile celulare gazdă standard includ, fără însă să fie limitate, DG44 și DUXB11 (linie ovariană de hamster chinezesc (CHO), minus DHFR), HELA (carcinom uman cervical), CVI (linie renală de maimuță), COS (un derivat al CVI cu antigen SV 40 T), R1610 (fibroblaste de hamster chinezesc), BALBC/3T3 (fibroblaste de șoarece), HAK (linie renală de hamster), SP2/0 (mielom de șoarece), P3x63-Ag3.653 (mielom de șoarece), BFA-lcIBPT (celule endoteliale bovine), RAJI (limfocite umane) și 293 (rinichi uman). Liniile celulare gazdă de regulă sunt obținute din surse comerciale, de la ATCC sau sunt selectate din literatura publicată.

De preferință, linia celulară gazdă este DG44 ("CHO") sau SP2/0 [Urland, G. et al., "Effect of gamma ray and the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions." *Som. Cell & Mol. Gen.* 12/6, 1986, p. 555-566], [Shulman, M. et al., "A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies." *Nature*, 1978, p. 276-269]. Cea mai preferată este linia celulară gazdă DG44.

Transfecția plasmidei în celula gazdă se poate realiza prin orice metodă accesibilă specialiștilor în domeniu. Acestea includ, însă nu se limitează la, transfecția (inclusiv electroforeza și electroporarea), fuziunea celulară cu DNA învelit, microinjectarea și infectarea cu virus intact [Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors", cap. 24.2, p. 470-472 *Vectors*, Rodriguez and Denhardt, Eds (Butterworths, Boston, MA 1988)]. Cea mai preferată cale de administrare a plasmidei în gazdă este cea a electroporării.

S-a derivat o regiune variabilă non-umană preferențială cu specificitate față de antigenul CD20 folosind o sursă murină și tehnologia hibridoamelor. Folosind reacția de polimerizare în lanț ("PCR"), regiunile variabile murine ușoară și grea s-au clonat direct în vectorul TCAE 8, aceasta fiind ruta cea mai preferată pentru încorporarea regiunii variabile non-umane în vectorul TCAE. Această preferință este în principal bazată pe eficiența reacției PCR și corectitudinea inserării. Totuși, pentru realizarea acestei sarcini sunt accesibile și alte proceduri echivalente. De exemplu, folosind TCAE 8 (sau un vector echivalent) se poate obține secvența regiunii variabile a anticorpului anti-CD20 non-uman, urmată de sinteza oligonucleotidelor, porțiunilor secvenței sau, dacă corespunde, a întregii secvențe; ulterior, porțiunile sau întreaga secvență sintetică se poate insera în localizările corespunzătoare din vector. Specialiștii în domeniu au pregătirea necesară pentru realizarea acesteia.

#### EXEMPLE

Următoarele exemple nu vor fi interpretate ca limitând invenția. Exemplele ilustrează vizualizarea dozei folosind anticorpi anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi (I2B8"); anticorpul anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi (Y2B8) și anticorpul anti-CD20 himeric imunologic activ ("C2B8") derivat prin utilizarea unui vector specific ("TCAE 8") și regiunilor variabile derivate de la un anticorp anti-CD20 monoclonal murin ("2B8").

##### 1. ANTICORP 2B8 anti-CD20 marcat cu izotopi radioACTIVI

###### A. Obținerea anticorpului anti-CD20 monoclonal (murin) ("2B8")

șoarecii BALB/c s-au imunizat repetat cu linia celulară limfoblastică umană SB [Adams, R.A. et al., Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2. *Can Res*, vol. 28, 1968, p.1121-1125] (această linie celulară este accesibilă la colecția americană de culturi de țesuturi (ATCC), Rockville, MD, sub nr. de acces ATCC CL 120) prin injecții săptămânale timp de 3-4 luni. S-au identificat șoareci care manifestă titre serice ridicate de anticorpi anti-CD20, așa cum s-a determinat prin inhibiția anticorpilor CD20 specifici cunoscuți (anticorpii anti-CD20 utilizați au fost Leu 16, Beckton Dickinson, San Jose, CA nr. catalog 7670 și Bl, Coulter Corp.; Hialeah, FL, nr. catalog 6602201); apoi de la acești șoareci s-a îndepărtat splina. Celulele

splenice s-au fuzionat cu celule de mielom SP2/0 de șoarece în conformitate cu protocolul cunoscut (SP2/0 are nr. de acces la ATCC, ATCC CRL 8006) [EINFELD D.A. et al., EMBO, 1988, vol.7, p. 711 ] .

Examinările pentru determinarea specificității CD20 s-au realizat prin test radioimun. Anti-CD20 B1 purificat a fost marcat cu izotopul radioactiv  $I^{125}$  prin metoda cunoscută [Valentine, M.A. et al., J.Biol. Chem, 1989, vol. 264, p. 11282 (iodură de sodiu  $I^{125}$ , ICN, Irvine, CA, nr. catalog 28665H)]. Hibridoamele s-au concentrat prin incubare îmbinată a 0.05 ml de mediu din fiecare godeu de fuziune împreună cu 0.05 ml de anti-CD20 B1 marcat cu izotopul  $I^{125}$  (10 ng) în BSA, PBS 1% (pH 7.4) și 0.5 ml din același tampon conținând 100 000 celule SB. După incubare, timp de 1 oră la temperatura camerei, celulele s-au recoltat prin transferare în plăci de titrare cu 96 godeuri (V&P Scientific, San Diego, CA) și s-au spălat intens. Godeurile duble conținând anti-CD20 B1 nemarcat și godeurile lipsite de anticorp inhibitor au fost folosite drept martor pozitiv și negativ, respectiv. Godeurile conținând anticorpi cu mai mult de 50 % inhibiție au fost mărite și clonate. Anticorpul manifestând cea mai ridicată inhibiție s-a derivat de la linia celulară clonată desemnată aici ca "2B8".

B. Prepararea conjugatului 2B8-MX-DTPA

#### i. MX-DTPA

Ca agent chelatic pentru conjugarea izotopului radioactiv marcat cu 2B8 s-a utilizat acidul 1-izotiocianatobenzil-3-metildietilen-triaminopenta-acetic marcat cu  $C^{14}$  ("MX-DTPA marcat cu  $C^{14}$ "). Manipulările cu MX-DTPA s-au produs pentru menținerea condițiilor fără metale, adică folosind reactivi lipsiți de metale și, după posibilitate, s-au utilizat containere din polipropilenă (bidoane, cilindri gradați, pahare de laborator, pipete) spălate cu alconox și clătite cu apă Milli-Q. S-a obținut MX-DTPA sub formă de solid uscat de la Dr. Otto Gansow (National Institute of Health, Bethesda, MD) și s-a depozitat astfel deshidratat la 4°C (protejat de lumină), soluțiile bazice fiind preparate în apă Milli-Q la o concentrație de 2-5 mM depozitate la -70°C.

MX-DTPA s-a obținut, de asemenea, de la Coulter Immunology (Hialeah, Florida) ca sare disodică în apă și s-a depozitat la -70°C.

#### ii. Prepararea 2B8

S-a preparat 2B8 purificat pentru conjugare cu MX-DTPA prin transferarea anticorpului în 50 mM bicin-NaOff lipsit de metale, pH 8.6, conținând 150 mM NaCl, utilizând schimbul repetat de tampon cu ajutorul filtrelor rotative CENTRICOM 30™ (30 000 D, MWCO; Amicon). De regulă, în filtru se adaugă 50-200 μl de proteină (10 mg/ml), urmat de 2 ml tampon de bicin. Filtrul s-a centrifugat la 4°C într-o centrifugă Sorval SS-34 (6000 rot./min, timp de 45 min). Volumul menținut a constituit cca 50...100 μl; mai mult decât atât, această procedură s-a repetat de două ori folosind același filtru. Volumul menținut s-a transferat într-o eprubetă din polipropilenă de 1.5 ml prevăzută cu capsulă de închidere, s-a examinat pentru proteină, s-a diluat până la 10.0 mg/ml și s-a depozitat la 4°C până la utilizare. Analogic proteina s-a introdus în 50 mM de citrat de sodiu, pH 5.5, conținând 150 mM NaCl și azotură de sodiu 0.05%, folosind protocolul de mai sus.

#### iii. Conjugarea 2B8 cu MX-DTPA

Conjugarea 2B8 cu MX-DTPA s-a realizat în eprubete de polipropilenă la temperatură ambiantă. Soluțiile bazice congelate de MX-DTPA s-au dezghețat imediat înainte de utilizare. 50...200 ml de proteină la 10 mg/ml au intrat în reacție cu MX-DTPA, raportul molar al MX-DTPA și 2B8 fiind 4:1. Reacțiile s-au inițiat prin adăugarea soluției de rezervă MX-DTPA agitând atent; conjugarea s-a efectuat de la 14 până la 20 ore la temperatura ambiantă. MX-DTPA nereacționat s-a înlăturat din conjugat prin dializă sau ultrafiltrare repetată, așa cum s-a descris mai sus în exemplul I.B.ii, în soluție salină normală lipsită de metal (0.9% greutate/volum) care conține azotură de sodiu 0.05%. Concentrația proteinei s-a corectat până la 10 mg/ml și s-a depozitat la 4°C într-o eprubetă de polipropilenă până la marcarea cu izotopi radioactivi.

#### iv. Determinarea încorporării de MX-DTPA

Încorporarea MX-DTPA sa determinat prin numărătoare de scintilație și s-a comparat valoarea obținută cu conjugatul purificat pentru activitatea specifică a MX-DTPA marcat  $C^{14}$ . Pentru anumite studii în care s-a utilizat MX-DTPA neradioactiv (Coulter Immunology) încorporarea MX-DTPA s-a examinat prin incubarea conjugatului cu o soluție în exces purtătoare de ytriu [90] radioactiv de concentrație și activitate specifică cunoscute.

S-a preparat o soluție stoc de clorură de ytriu de concentrație cunoscută în Hcl 0.0N fără metal la care s-a adăugat ytriu [90] fără purtător (sare clorică). S-a analizat un alicvot al acestei soluții prin numărarea de scintilații în lichid pentru a determina o activitate specifică precisă pentru acest reactiv. Într-o eprubetă de propilenă s-a adăugat un volum de reactiv clorură de ytriu egal cu de 3 x numărul de moli de chelat așteptat să se atașeze la anticorp (de regulă, 2 mol/mol anticorp) și s-a corectat pH-ul până la 4.0...4.5 cu acetat de sodiu 2M. Ulterior s-a adăugat anticorpul conjugat și amestecul s-a incubat 15...30 min la temperatura ambiantă. Reacția s-a oprit prin adăugare de EDTA 20 mM până la o concentrație finală de 1 mM pH-ul soluției s-a ajustat până la aproximativ pH 6 cu acetat de sodiu 2M.

După o incubare de 5 min, întregul volum s-a purificat prin cromatografie de înaltă performanță de excludere după mărime (s-a descris mai jos). Proteina eluată care conține fracțiile s-a combinat, s-a determinat concentrația proteinei și s-a examinat pentru radioactivitate un alicvot. Încorporarea chelatului s-a calculat folosind activitatea specifică a preparatului clorură de ytriu [90] și concentrația proteinei.

#### v. Imunoactivitatea lui 2B8-MX-DTPA

Imunoactivitatea conjugatului 2B8 s-a examinat folosind celula integrală ELISA. S-au recoltat din cultură celule SB în faza Mid-log prin centrifugare și s-au spălat de 2 ori cu 1xHBSS. S-au diluat celulele până la  $1-2 \times 10^6$  celule/ml în HBSS și s-au împărțit în plăci de microtitrare din polistiren cu 96 godeuri la 50000...100000 celule/godeu. Plăcile s-au uscat în vid timp de 2 ore la 40...45°C pentru fixarea celulelor la plastic, până la utilizare plăcile s-au păstrat la loc uscat la -20°C. Pentru examen s-au încălzit plăcile la temperatura ambiantă imediat înaintea folosirii, apoi s-au blocat cu 1xPBS, pH 7.2...7.4, care conține BSA 1% (2 ore). Probele pentru examinare s-au diluat în 1xPBS/BSA 1%, s-au aplicat la plăci și s-au diluat serial (1:2) în același tampon. După incubarea plăcilor timp de 1 oră, la temperatura ambiantă plăcile s-au spălat de 3 ori cu 1xPBS. S-a adăugat la godeuri anticorpus secundar (50 μl conjugat HRP anti-șoarece IgG1-specific) (diluție 1:1500d în 1xPBS/BSA 1%) și s-au incubat 1 oră la temperatura ambiantă. Plăcile s-au spălat de 4 ori cu 1xPBS, după care s-a adăugat soluție substrat ABTS (citrat de sodiu 50 mM, pH 4.5, conținând ATBS 0.01% și H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%). Plăcile s-au citit la 405 nm după incubare 15...30 min. Celulele HSB antigen-negative s-au inclus în examinări pentru urmărirea legăturii nespecifice. Imunitatea conjugatului s-a calculat prin marcarea valorilor absorbantei față de factorul de diluție respectiv și comparând acestea cu valorile obținute folosind anticorp nativ (care reprezintă 100 % imunoreactivitate), s-au testat pe aceeași placă, s-au comparat câteva valori de pe porțiunea lineară a profilului titrării și s-a determinat o valoare medie (date neprezentate).

vi. Prepararea lui 2B8-MX-DTPA marcat cu indiu [111] ("12B8")

Conjugatele s-au radiomarcate cu indiu [111] fără purtător. S-a transferat un alicvot al izotopului (0.1...2 mCi/mg anticorp) în Hcl 0.05 M într-o eprubetă de propilenă și s-a adăugat aproximativ 1/10 volum de Hcl 2M fără metal. După incubare timp de 5 min, s-a adăugat acetat de sodiu 2M fără metal pentru a ajusta pH-ul soluției până la 4.0...4.4. S-au adăugat dintr-o soluție stoc DTPA 10.0 mg/ml în soluție salină normală aproximativ 0.5 mg de 2B8-MX-DTPA, sau citrat de sodiu 50 mM/NaCl 150 mM conținând azotură de sodiu 0.05% și soluția s-a amestecat imediat cu grijă. S-a controlat pH-ul soluției cu hârtie de pH măsurând o valoare de 4.0...4.5 și amestecul s-a incubat la temperatura camerei timp de 15...30 min. Ulterior, reacția s-a oprit prin adăugare de EDTA 20 mM până la o concentrație finală de 1 mM și amestecul de reacție s-a adus la pH aproximativ 6.0 folosind acetat de sodiu 2 M.

După o incubare de 5...10 min radioizotopul necompletat s-a îndepărtat prin cromatografie de excludere după mărime. Unitatea HPLC a constat dintr-un Waters Model 6000 sau TosoHaas Model TSK-6110, având sistem de eliberare respectiv, fiind prevăzut cu o valvă de injecție Waters U6K sau Rheodine 700. Separările cromatografice s-au realizat folosind o coloană cu gel de permeabilitate (BioRad SEC-250; 7.3x300 mm sau o coloană comparabilă TosoHaas) și o coloană de gardă SEC-250 (7.5x100 mm). Sistemul a fost echipat cu un colector de fracție (Pharmacia Frac200) și un monitor UV prevăzut cu un filtru de 280 nm (Pharmacia model UV-1). S-au aplicat probele și s-au eluat izocromatic folosind 1xPBS, pH 7.4, la o rată de curgere de 1.0 ml/min. S-au colectat în eprubete de sticlă 100 ml de fracțiuni și alicvoturi din aceștia s-au cuantificat într-un numărător gama. Ferestrele inferioară și superioară s-au montat la 100 și respectiv 500 KeV.

S-a calculat radioîncorporarea prin însumarea radioactivității asociate cu maximul proteinei eluate și împărțirea acestui număr prin radioactivitatea totală eluată din coloană; această valoare a fost apoi exprimată ca procent (datele nu s-au prezentat). În câteva cazuri radioîncorporarea s-a determinat folosind cromatografia instantanee în strat subțire ("ITLC"). Conjugatul marcat cu izotopi radioactivi s-a diluat 1:10 sau 1:20 în 1xPBS sau în 1xPBS/DTPA 1mM, apoi 1 μl s-a colorat la 1.5 cm de la capătul unei fâșii de hârtie ITLC SG de 1x5cm. Hârtia s-a dezvoltat prin cromatografie ascendentă folosind acetat de amoniu 10% în metanol: apă (1:1 v/v).

Fâșia s-a uscat, s-a tăiat în jumătăți transversale și s-a determinat radioactivitatea asociată cu fiecare secțiune prin numărare gama. Radioactivitatea asociată cu jumătatea superioară a fâșiei (radioactivitatea asociată proteinei) s-a exprimat ca un procent al radioactivității totale determinate prin însumarea valorilor atât de la bază cât și de la vârful jumătăților (date neprezentate).

Activitățile specifice s-au determinat prin măsurarea radioactivității unui alicvot corespunzător al conjugatului marcat cu izotopi radioactivi. Această valoare s-a corectat pentru eficiența numărătorii (de regulă 75%) și s-a raportat la concentrația proteinei conjugatului, determinată anterior prin absorbanta la 280 nm și valoarea rezultată s-a exprimat ca mCi/mg proteină.

Pentru câteva experimente, 2B8-MX-DTPA s-a radiomarcate cu indiu [111] urmând un protocol similar cu unul dintre cele descrise mai sus, dar fără purificare prin HPLC: aceasta a fost denumit protocol "mix-and-shoot".

vii. Prepararea de 2B8-MX-DTPA marcat cu ytriu [90] ("y2B8")

Pentru prepararea de conjugat 2B8-MX-DTPA marcat cu ytriu [90] ("y2B8") s-a urmat același protocol descris pentru prepararea lui 12B8, cu excepția că nu s-a folosit HCL 2 ng; toate preparatele conjugatelor marcate cu ytriu s-au purificat prin cromatografie de excludere după mărime așa cum s-a descris mai sus.

c. Studii pe animal non-uman

i. Biodistribuția lui 2B8-MX-DTPA marcat cu izotopi radiomarcate

S-a evaluat 12B8 pentru biodistribuția tisulară la șoarecii BALB/c de 6 - 8 săptămâni. Conjugatul marcat cu izotopi radioactivi s-a preparat folosind 2B8-MX-DTPA grad clinic, urmând protocolul "mix-and-shoot", descris mai sus. Activitatea specifică a conjugatului a fost 2.3 mCi/mg și conjugatul s-a formulat în PBS, pH 7.4 care conține HSA 50 mg/ml. Șoarecii s-au injectat intravenos cu 100 μl de 12B8 (aproximativ 21 μCi) și grupuri de câte 3 șoareci s-au sacrificat prin dislocare cervicală la 0, 24, 48 și 72 ore. După sacrificare s-au păstrat coada, inima, plămânii, ficatul, rinichii, splina, mușchii și femurul care s-au spălat și s-au cântărit. De asemenea, s-a recuperat pentru analiză o probă



de sânge. radioactivitatea asociată cu fiecare specimen s-a determinat prin numărare gama și ulterior s-a determinat procentul dozei injectate /g de țesut. Nu s-a acordat atenție contribuției scăderii activității reprezentată prin sângele asociat cu organele individuale.

Într-un protocol separat s-au incubat probe alicvot de 2B8-MX-DTPA la 4°C și 30°C timp de 10 săptămâni și s-au radiomarcate cu indiu [111] pentru activitate specifică de 2.1 mCi/mg pentru ambele preparate. Aceste conjugate s-au folosit apoi în studiile biodistribuției la șoareci așa cum s-a descris mai sus.

Pentru determinări dozimetrice s-a radiomarcate 2B2-MX-DTPA cu indiu [111] până la activitate specifică de 2.3 mCi/mg și s-au injectat aproximativ 1.1 μCi în fiecare din 20 șoareci BALB/c. În continuare, grupuri de câte 5 șoareci s-au sacrificat la 1, 24, 48 și 72 ore, organele fiind păstrate și preparate pentru analiză. Suplimentar, s-au recuperat porțiuni de piele, mușchi și os și s-au prelucrat pentru analize; de asemenea, s-au colectat urina și fecalele și s-au analizat pentru momentele 24 și 72 ore.

Folosind o abordare similară, 2B8-MX-DTPA s-a radiomarcate, de asemenea, cu ytriu [90] și distribuția sa biologică s-a evaluat la șoarecii BALB/c după o perioadă de timp de 72 ore. După purificare prin cromatografie HPLC de excludere după mărime, 4 grupe de 5 șoareci fiecare s-au injectat i.v. cu aproximativ 1 μCi de conjugat formulat clinic (activitate specifică: 12.2 mCi/mg); grupele au fost apoi sacrificate la 1, 24, 48 și 72 ore, organele și țesuturile lor fiind analizate cum s-a descris mai sus. Radioactivitatea asociată cu fiecare specimen de țesut s-a determinat prin măsurarea energiei radiației de frânare cu un contor de scintilație gama. Valorile activității au fost exprimate ulterior ca procent doză injectată per gram țesut sau procent doză injectată per organ. Deoarece organele și alte țesuturi s-au clătit repetat pentru îndepărtarea sângelui superficial, organele nu au fost perfuzate. Astfel, valorile activităților organului nu au scăzut din contribuția de activitate reprezentată de către sângele intern asociat.

#### ii. Localizarea tumorală a I2B8

Localizarea 2B8-MX-DTPA marcat cu izotopi radioactivi s-a determinat la șoareci purtători de tumori ale celulei B atimice Ramos. Șoarecii atimici în vârstă de 6...8 săptămâni s-au injectat subcutanat (în partea dorsală stângă) cu 0.1 ml de RPMI-1640, conținând  $1.2 \times 10^7$  celule tumorale Ramos care au fost anterior adaptate pentru creștere în șoareci atimici. Tumorile s-au dezvoltat în două săptămâni și au fost cuprinse în domeniul de greutate de la 0.07 până la 1.1 g. Șoarecii s-au injectat intravenos cu 100 μl de 2B8-MX-DTPA marcat cu indiu [111] (16.7 μCi) și grupuri de câte 3 șoareci s-au sacrificat prin dislocare cervicală la 0, 24, 48 și 72 ore. După sacrificare s-au recuperat coada, inima, plămâni, ficatul, rinichii, splina, mușchii, femurul și tumoarea, fiind spălate și cântărite; de asemenea, s-a prelevat pentru analiză o probă de sânge. S-a determinat radioactivitatea asociată cu fiecare specimen prin numărare gama și s-a determinat procentul dozei injectată/g țesut.

#### iii. Studii privind biodistribuția și localizarea tumorală cu 2B8-MX-DTPA

După experimentul preliminar asupra biodistribuției descris mai sus (Exemplul I.B.viii.a) s-a radiomarcate conjugatul 2B8 cu indiu [111] până la o activitate specifică de 2.3 mCi/mg și aproximativ 1.1 μCi s-au injectat în fiecare din 20 de șoareci BALB/c pentru a determina biodistribuția materialului marcat. În continuare, s-au sacrificat grupuri de 5 șoareci la 1, 24, 48 și 72 ore, iar organele lor și o porțiune de piele, mușchi și os s-au oprit și s-au prelucrat pentru analize. În plus, s-a colectat urina, fecalele și s-au analizat pentru momentele de timp 24 la 72 ore. Nivelul radioactivității în sânge a scăzut de la 40.3% doză injectată per gram la o oră, până la 18.9% la 72 ore (datele nu s-au prezentat). Valorile pentru inimă, rinichi, mușchi și splină au rămas în domeniul 0.7-0.9% de-a lungul experimentului. Nivelurile de radioactivitate găsite în plămâni au scăzut de la 14.2% la 1 oră până la 7.6% la 72 ore; în mod asemănător, respectiv doza injectată per gram în ficat a scăzut de la 10.3% la 9.9%. Aceste date s-au folosit în determinarea dozei de radiații absorbită estimată I2B8 descrisă mai jos.

Biodistribuția conjugatului marcat cu ytriu [90] având o activitate specifică de 12.2 mCi/mg anticorp s-a evaluat la șoareci BALB/c. S-au obținut radioîncorporări de peste 90% și anticorpii marcați cu izotopi radioactivi s-a purificat prin HPLC. Depozitul tisular de radioactivitate s-a evaluat în organele principale și piele, mușchi, os, urină și fecale după 72 ore și s-a exprimat ca procent doză injectată/g țesut. Rezultatele (neprezentate) au evidențiat că în timp ce nivelurile de radioactivitate asociată cu sângele au scăzut de la aproximativ 39.2% doză injectată/g la o oră până la aproximativ 15.4% după 72 ore, nivelurile radioactivității asociate cu coada, inima, rinichiul, mușchiul și splina au rămas îndeajuns de constante la 10.2% sau mai mici în cursul experimentului. Important a fost faptul că radioactivitatea asociată cu osul a fost în domeniul de la 4.4% de doză injectată/g la 1 oră, până la 3.2% la 72 ore. Toate acestea, luate împreună, sugerează că puțin ytriu liber s-a asociat cu conjugatul și că puțin radiometal liber s-a eliberat în timpul desfășurării studiului. Aceste date s-au folosit pentru determinarea dozei de radiații absorbită pentru Y2B8 descris mai jos.

Pentru studii asupra localizării tumorale, s-a preparat 2B8-MX-DTPA și s-a marcat radioactiv cu indiu [111] până la o activitate specifică de 2.7 mCi/mg. În continuare s-au injectat 100 μl de conjugat marcat (aproximativ 24 μCi) în fiecare din 12 șoareci atimici purtători de tumori ramos ai celulei B. Tumorile au aparținut în greutate domeniului de la 0.1 până la 1.0 g. La momentele de timp 0, 24, 48 și 72 ore după injecție s-au prelevat 50 μl de sânge prin puncție retro-orbitală, șoarecii s-au sacrificat prin dislocare cervicală și s-au reținut coada, inima, plămâni, ficatul, rinichii, splina, mușchii, femurul și tumoarea. După prelucrarea și cântărirea țesuturilor s-a determinat radioactivitatea asociată cu fiecare tip de țesut folosind un contor gama și valorile s-au exprimat ca procent doză injectată/g.

Rezultatele (neprezentate) au evidențiat că concentrațiile tumorale ale 2B8-MX-DTPA marcat cu indiu [111] au crescut constant în cursul experimentului. Din doza injectată 13% s-au acumulat în tumoare după 72 ore. În contrast,

nivelurile sangvine au scăzut în timpul experimentului de la peste 30% la momentul 0, până la 13% la 72 ore. Toate țesuturile (excepție mușchiul) au conținut între 1.3 și 6.0% doză injectată/g țesut la sfârșitul experimentului; țesutul muscular a conținut aproximativ 13% din doza injectată/g.

#### D. Studii umane

##### i. 2B8 și 2B8-MX-DTPA: studii imunohistologice cu țesuturi umane

Reactivitatea tisulară a anticorpului monoclonal murin 2B8 s-a evaluat folosind o gamă de 32 țesuturi umane diferite fixate cu acetonă. Anticorpul 2B8 reacționează cu antigenul anti-CD20 care are o imagine foarte restrictivă a distribuției tisulare, fiind observat doar într-un subset de celule în țesuturi limfoide inclusiv cele de origine hematopoetică.

În ganglionii limfoizi s-a observat imunoreactivitate într-o populație de limfocite B corticale mature la fel de bine ca și în celulele proliferative din centrele germinale. De asemenea, s-a observat reactivitate pozitivă în sângele periferic, ariile de celule B ale amigdalelor, pulpa albă a splinei și cu 40...70% din limfocitele medulare găsite în timus. De asemenea, s-a observat reactivitate pozitivă în foliculii laminei propria (Peyer's Patches) ale intestinelor mari. În final, au fost de asemenea pozitive cu anticorpul 2B8 celule grupate sau izolate în stroma diferitelor organe, inclusiv vezica urinară, sân, col uterin, esofag, plămân, parotidă, prostată, intestin subțire și stomac (datele nu s-au prezentat). Toate celulele epiteliale simple precum și epiteliul stratificat și epiteliul diferitelor organe s-au găsit a fi nereactive în mod asemănător, nu s-a observat reactivitatea cu celulele neuroectodermale, inclusiv cele din creier, coardă spinală și nervii periferici. De asemenea, s-au găsit a fi negative elementele mezenchimale precum celulele musculare, scheletice și netede, fibroblastele, celulele endoteliale și celulele polimorfonucleare inflamatoare (nu s-au prezentat datele).

Reactivitatea tisulară a conjugatului 2B8-MX-DTPA s-a evaluat folosind o gamă de 16 țesuturi umane care s-au fixat cu acetonă. Așa cum s-a demonstrat anterior cu anticorpul nativ (date neprezentate), conjugatul 2B8-MX-DTPA a recunoscut antigenul CD20 care a prezentat o imagine a distribuției strict restricționată fiind găsit doar un subset de celule de origine limfoidă.

În ganglioni limfoizi s-a observat imunoreactivitate în populația de celule B. Reactivitate puternică s-a văzut în pulpa albă a splinei și în limfocitele medulare ale timusului. De asemenea, s-a observat imunoreactivitatea în limfocite izolate din vezica urinară, inimă, intestinele groase, ficat, plămâni și uter și s-a atribuit prezenței celulelor inflamatoare aflate în aceste țesuturi. Ca și în cazul anticorpului nativ, nu s-a observat reactivitatea cu celule neuroectodermale sau cu elemente ale mezenchimului (datele nu s-au prezentat).

##### ii. Analiza clinică a I2B8 (formare de imagine) și Y2B8 (terapie)

###### a) Experiment clinic faza I/II, studiu terapeutic cu doză unică

În mod curent, s-a efectuat o analiză clinică faza I/II a I2B8 (formare de imagine) urmată de tratament cu o doză terapeutică unică de Y2B8. Pentru studiul cu doza unică s-a folosit următoarea schemă:

1. Recoltare cu eliminare de celule stemice periferice (PSC) sau măduvă osoasă (BM);
2. Formare de imagine I2B8;
3. Terapie Y2B8 (trei niveluri de doză); și
4. Transplantare PSC sau BM autologă (dacă este necesar, pe baza numărării neutrofilelor sub 500/mm<sup>3</sup> timp de trei zile consecutive, sau plachete sangvine sub 20000/mm<sup>3</sup> fără evidențiere de recuperare a măduvei osoase).

Nivelurile dozei de Y2B8 au fost precum urmează:

Nivelul dozei	Doza (mCi)
1.	20
2.	30
3.	40

Au fost tratați trei pacienți la fiecare din nivelurile de doză pentru determinarea unei doze maxime tolerate ("MTD"). Studiile privind formarea de imagine (dozimetria) s-au condus după cum urmează: fiecare pacient s-a cuprins în două studii *in vivo* asupra biodistribuției folosind I2B8. În primul studiu se administrează ca infuzie intravenoasă (i.v.) timp de 1 oră o cantitate de 2 mg I2B8 (5 mCi); o săptămână mai târziu se administrează 2B8 (adică anticorp neconjugat) prin i.v. la o rată care nu depășește 250 mg/oră urmat imediat de 2 mg de I2B8 (5 mCi) administrat prin i.v. pe parcursul unei ore. În ambele studii, imediat după infuzia I2B8, fiecare pacient se supune formării unei imagini și aceasta se repetă la momentul t=14-18 ore (dacă s-a indicat), t=24 ore; t=72 ore și t=96 ore (dacă s-a indicat). S-au determinat timpii de retenție medii pentru indiu [111] marcat pentru întregul corp, de asemenea, s-au făcut astfel de determinări pentru recunoașterea organelor sau leziunilor tumorale ("regiuni de interes"). Regiunile de interes s-au comparat la concentrațiile marcajului din întregul corp; pe baza acestei comparații se poate determina o estimare a localizării și concentrației lui Y2B8 folosind protocoale standard. Dacă doza cumulativă estimată a lui Y2B8 este mai mare decât  $\delta$  x doza estimată pentru întregul corp, sau dacă doza cumulativă estimată pentru ficat depășește 1500 cGy, nu va avea loc nici un tratament cu Y2B8.

Dacă studiile de formare a imaginii sunt acceptabile, se administrează prin i.v. 0,1 sau 1.0 mg/kg greutate corporală a pacientului 2B8 la o rată de infuzie care nu depășește 250 mg/oră.

Aceasta este urmată de administrarea Y2B8 (10, 20 sau 40 mCi) la o rată de infuzie de 20 mCi/oră.

###### b) Experiment clinic faza I/II: studiu terapeutic cu doză multiplă

S-a condus în mod curent o analiză clinică faza I/II a Y2B8. Pentru studiul dozei multiple s-a folosit următoarea schemă:

1. Prelevare PSC sau MB;
2. Formare de imagine I2B8;
3. Terapie Y2B8 (trei niveluri de doză) pentru patru doze sau o doză cumulativă totală de 80mCi; și
4. Transplantare PSC sau BM autologă (pe baza deciziei medicului practicant).

Nivelurile dozei de Y2B8 au fost după cum urmează:

Nivelul dozei	Doza (mCi)
1	10
2	15
3	20

Au fost tratați trei pacienți la fiecare din nivelurile de doză pentru determinarea unui MTD.

Studiile privind formarea de imagine (dozimetrie) s-au condus după cum urmează: s-a determinat cu primii 2 pacienți o doză preferată asupra formării imaginii pentru anticorpus nemarcat (adică, 2B8). Primii 2 pacienți au primit 100 mg de 2B8 nemarcat în 250 cm<sup>3</sup> în soluție salină normală pe parcursul a 4 ore, urmat de 0.5 mCi de I2B8; s-a recoltat sânge pentru datele de biodistribuție la momentele t=0, t=10 min, t=120 min, t=24 ore și t=48 ore. Pacienții au fost scanați cu o cameră pentru imagini gama din regiuni multiple la momentele t=2 ore, t=24 ore și t=48 ore. După scanare, la 48 ore, pacienții au primit 250 mg 2B8 așa cum s-a descris, urmat de 4.5 mCi de I2B8. Așa cum s-au descris, au urmat recoltarea de probe de sânge și scanarea.

Dacă 100 mg 2B8 produc imagini superioare, atunci următorii 2 pacienți vor primi 50 mg de 2B8 așa cum s-a descris, urmat de 0,5 mCi de I2B8, urmat 48 ore mai târziu de 100 mg 2B8 și apoi cu 4,5 mCi de I2B8. Dacă 250 mg de 2B8 produc imagini superioare, atunci următorii 2 pacienți vor primi 250 mg de 2B8 așa cum s-a descris, urmat de 0.5 mCi de I2B8, urmat 48 ore mai târziu cu 500 mg 2B8 și apoi cu 4.5 mCi de I2B8. Următorii pacienți vor fi tratați cu cele mai scăzute cantități de 2B8 care furnizează formarea optimă de imagini. Formarea optimă de imagini va fi definită prin: (1) cea mai eficientă formare de imagine cu cea mai lentă dispariție a anticorpusului; (2) cea mai bună distribuție care micșorează repartizarea într-un singur organ; și (3) cea mai bună rezoluție subiectivă a leziunii (tumoare/evoluția comparată).

Pentru primii 4 pacienți, prima doză terapeutică de Y2B8 va începe 14 zile după ultima doză de I2B8; pentru următorii pacienți prima doză terapeutică de Y2B8 va începe între 2 ... 7 zile după I2B8.

Înainte tratamentul cu Y2B8, pentru pacienții alții decât primii 4, 2B8 se va administra așa cum s-a descris urmat de infuzie i.v. de Y2B8 după 5...10 min. Se vor recolta probe de sânge pentru biodistribuție la momentele t=0, t=10 min, t=120 min, t=24 ore și t=48 ore. Pacienții vor primi doze respective de Y2B8 (aceeași doză administrată ca și în cazul primei doze), aproximativ în fiecare 6...8 săptămâni pentru un maxim de 4 doze sau în total doza cumulată de 80 mCi. Cel mai adesea este de preferat ca pacienții să nu primească următoarea doză de Y2B8 până când WBC-ul pacienților este mai mare decât sau egal cu 3000 și AGC este mai mare sau egal cu 100000.

După completarea studiului nivelului celor trei doze se va defini un MTD. Apoi, în studiu vor fi cuprinși pacienți suplimentari și aceștia vor primi MTD-ul.

## II. PRODUCEREA DE ANTICORP HIMERIC ANTI-CD20 ("C2B8")

### A. Construcția vectorului de expresie DNA a imunoglobulinei himerice anti-CD20

S-a izolat RNA de la celulele hibridomice de șoarece 2B8 [Chomczynski, P. et al., Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction" Anal. Biochem., vol. 162, 1987, p. 156-159 ] și s-a preparat de la aceasta cDNA. DNA-ul regiunii variabile a catenei ușoare de imunoglobulină de șoarece s-a izolat de la cDNA prin reacție de polimerizare de lanț folosind un set de primeri ai DNA-ului cu omologie la secvențele semnale ale catenei ușoare de șoarece la capătul 5' și regiunea j a catenei ușoare de șoarece la capătul 3'. Secvențele primer au fost după cum urmează:

1. V<sub>L</sub> sens (secvența ID nr. 3)

5' ATC AC AGATCT CTC ACC ATG GAT TTT CAG GTG CAG

ATT ATC AGC TTC 3'

(Porțiunea subliniată este un sit Bgl II; porțiunea subliniată mai sus este cordonul de start).

2. V<sub>L</sub> Antisens (Secvența ID nr. 4)

5' TGC AGC ATC CGTACG TTT GAT TTC CAG CTT 3'

(Porțiunea subliniată mai sus este un sit Bsi WI)

Vezi fig. 1 și 2 pentru situsurile corespunzând la Bgl II și Bsi WI în TCAE 8, și fig. 3 pentru situsurile corespunzătoare în anti-CD20 din TCAE 8.

Acest fragment DNA rezultat s-a clonat direct în vectorul TCAE 8 în fața domeniului constant al catenei ușoare kapa umane și s-a divizat în secvențe. Secvența DNA determinată pentru regiunea variabilă a catenei ușoare murine este menționată în fig. 4 (Secvența ID nr. 5); de asemenea, vezi fig. 3 nucleotidele 978 până la 1362. Fig. 4 asigură

suplimentar secvența aminoacidă de la această regiune variabilă murină, CDR-ul și regiunile cadru. Regiunea variabilă a catenei ușoare de șoarece de la 2B8 este din familia kapa VI de șoarece. Vezi Kabat de mai sus.

Regiunea variabilă a catenei grele de șoarece s-a izolat în mod asemănător și s-a clonat în fața domeniilor constante IgG1. Primerii au fost după cum urmează:

1. V<sub>H</sub> Sens (Secvența ID nr. 6)

5' GCG GCT CCC ACGCGT GTC CTG TCC CAG 3'

(Porțiunea subliniată este un sit Mlu I).

2. V<sub>H</sub> Antisens (Secvența ID nr. 7)

5' GC(G/C) TGT TGT GCTAGC TG(A/G) (A/G)GA GAC (G/A)GT GA 3'

(Porțiunea subliniată este un sit Nhe I)

Vezi fig. 1 și 2 pentru siturile corespunzătoare Mlu I și Nhe I din TCAE 8 și fig. 3 pentru siturile corespunzătoare în anti-CD20 din TCAE 8.

Secvența pentru această catenă grea de șoarece este prezentată în fig. 5 (Secvența ID nr. 8), vezi, de asemenea, fig. 3, nucleotidele 2401 până la 2820. De asemenea, fig. 5 dă secvența aminoacidă de la această regiune variabilă murină, CRD-ul și regiunile cadru. Regiunea variabilă a catenei grele de șoarece de la 2B8 este din familia VH 2B de șoarece. Vezi Kabat de mai sus.

#### B. Prepararea de anti-CD20 himeric produs de transfectoamele CHO și SP2/0

S-au crescut celule de DG44 dintr-o linie celulară ovariană de hamster chinezesc ("CHO") în mediu SSFM II fără hipoxantină și timidină [Gibco, Grand Island, NY, Form 91-0456PK]; celule mielomice de șoarece SP2/0 s-au crescut pe mediul Eagles modificat după Dulbecco ("DMEM") [Irvine Scientific, Santa Ana, Ca., Cat. nr.9024], având adăugat 5% ser fetal bovin și 20 ml/l glutamină. S-au supus electroporării 4 milioane celule cu plasmidă DNA fie din 25 μg CHO fie din 50 μg SP2/0 restricționat cu Not I folosind un sistem de electroporare BTX 600 (BTX, San Diego, Ca) în cuve de 0.4 ml jetabile. Condițiile au fost fie 210 V pentru CHO, fie 180 V pentru SP2/0, 400 μF, 13 ohmi. Fiecare electroporat s-a depus în 6 plăci cu 96 de godeuri (cca 7000 celule pe godeu). Plăcile au fost alimentate cu mediu conținând G418 [GENETICIN, Gibco, cat. nr. 860-1811], la 400μg/ml de compus activ pentru CHO (mediul a inclus suplimentar 50 μM hipoxantină și 8 μM timidină) sau 800 μg/ml pentru SP2/0, electroporările s-au efectuat în următoarele două zile și apoi 2 sau 3 zile până la formarea coloniilor. supernatantele de la colonii s-au examinat pentru prezența de imunoglobulină himerică pe calea unei ELISA specifică pentru anticorp uman. Coloniile care produc cea mai ridicată cantitate de imunoglobulină au fost extinse și depuse în plăci cu 96 godeuri, conținând mediu plus metotrexat (25 nM pentru SP2/0 și 5 nM pentru CHO), fiind alimentate cu mediu fiecare 2 sau 3 zile. Supernatantele au fost cercetate ca mai sus și de asemenea au fost examinate coloniile care produc cea mai ridicată cantitate de imunoglobulină. din supernatant s-a purificat anticorpul himeric anti-CD20 folosind cromatografia de afinitate a proteinei A.

anti-CD20 himeric purificat s-a analizat prin electroforeză în geluri poliacrilamidice și s-a estimat a fi mai pur decât cca 95%. Afinitatea și specificitatea anticorpului himeric s-a determinat pe baza 2B8. Anticorpul himeric anti-CD20 s-a testat în încercări de legare directă și competitivă, când comparându-se cu anticorpul anti-CD20 monoclonal murin 2B8, a manifestat afinitate și specificitate relativă pentru un număr de linii celulare B pozitive CD20 (datele nu s-au prezentat). constanta ("Kap") afinității aparente a anticorpului himeric s-a determinat prin legare directă de anti-CD20 himeric radiomarcant I<sup>125</sup> și s-a comparat cu 2B8 radiomarcant prin graficul Scatchard; Kap-ul estimat pentru anti-CD20 himeric obținut din CHO a fost 5.2x10<sup>-9</sup> M și pentru anticorpul obținut din SP2/0 a fost 7.4x10<sup>-9</sup> M. Kap-ul estimat pentru 2B8 a fost 3.5x10<sup>-9</sup> M. S-a utilizat competiția directă la radioimunotest pentru a confirma atât specificitatea cât și menținerea de imunoreactivitate a anticorpului himeric prin compararea capacității lui de a concura eficient cu 2B8. Au fost necesare cantități suficiente echivalente de anticorpi himerici anti-CD20 și 2B8 pentru a produce 50% inhibare a legării cu antigenii CD20 pe celule B (date neprezentate), adică, s-a observat o pierdere minimă de activitate de inhibare a anticorpilor anti-CD20, probabil, datorită himerizării.

Rezultatele de la Exemplul II.B indică, printre altele, că anticorpii himerici anti-CD20 s-au obținut din transfectoamele CHO și SP2/0 folosind vectori TCAE 8. acești anticorpi himerici au avut în principal aceeași specificitate și capacitate de legare ca anticorpul anti-CD20 monoclonal murin 2B8.

#### C. Determinarea activității imunologice a anticorpilor himerici anti-CD20

##### i. Analiza Clq uman

Anticorpii himerici anti-CD20 produși atât prin linia celulară CHO cât și SP2/0, s-au evaluat pentru legarea Clq uman într-un test de curent citometric folosind Clq marcat cu fluoresceină (Clq s-a obținut de la Quidel, Mira Mesa, CA, Prod. nr. A400 și marcajul FITC de la Sigma, St. Louis MO, Prod. nr. F-7250; FITC) [Selected Methods in Cellular Immunology, Michell & Shiigi, Ed. W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1980, p.292]. Marcarea lui Clq s-a realizat conform protocolului cunoscut [Selected Methods In Cellular Immunology, Michell & Shiigi, Ed. (W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1980, p. 292)]. Rezultatele analitice s-au derivat folosind un citometru de flux Decton Dickinson FACScan<sup>TM</sup> (fluoresceina s-a măsurat pe un domeniu de 515...545 nm). S-au incubat cantități echivalente de anticorp himeric anti-CD20, IgG1 uman, proteină K mielomică (Binding Site, San Diego, CA, Prod. Nr. BP078) și 2B8 cu un număr echivalent de celule SB, CD20 pozitive, urmat de o etapă de spălare cu tampon FACS (2% BSA în PBS, pH 7.4, 0.02% azotură de sodiu) pentru îndepărtarea anticorpului neatașat, urmată de

incubare cu Clq marcat FITC. După o incubare de 30...60 min, celulele s-au spălat din nou. cele trei condiții, inclusiv Clq marcat FITC drept martor, s-au analizat pe FACScan™ urmând instrucțiunile fabricantului. Rezultatele sunt prezentate în fig. 6.

Așa cum rezultă din fig. 6, s-a observat o creștere semnificativă în fluorescență numai pentru condiția anticorp himeric anti-CD20; adică, numai celulele SB cu anticorp himeric anti-CD20 aderent au fost Clq pozitive, în timp ce alte condiții au produs aceeași imagine ca și martorul.

#### ii. Lize celulare dependente de complement

Anticorpii himerici anti-CD20 s-au analizat pentru capacitatea lor de a supune lizei linii celulare de limfom în prezența serului uman (sursa de complement). Celulele SB, CD20 pozitive, s-au marcat cu  $^{51}\text{Cr}$  prin amestecarea a 100  $\mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  cu  $1 \times 10^6$  celule SB timp de 1 oră la  $37^\circ\text{C}$ ; celulele SB marcate au fost incubate apoi în prezența unor cantități echivalente de complement uman și cantități echivalente (0...50  $\mu\text{g/ml}$ ) de anticorpi himerici anti-CD20 sau 2B8 timp de 4 ore la  $37^\circ\text{C}$  [Brunner, K.T. et al., "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on  $^{51}\text{Cr}$ -labeled allogeneic target cells *in vitro*". Immunology 14: 181-189 (1968)]. Rezultatele sunt prezentate în fig. 7. Rezultatele din fig. 7 indică că în aceste condiții anticorpii himerici anti-CD20 au produs liză semnificativă (49%).

#### iii. Examinarea citotoxicității celulare efector în funcție de anticorp

Pentru acest studiu s-au folosit celule pozitive CD20 (SB) și celule negative CD20 (celule T, linie leucemică HSB [Adams, Richard, "Formal Discussion", Can.Res. 27: 2479-2482 (1967)]; depozit ATCC nr. ATCC CL 120.1); ambele s-au marcat cu  $^{51}\text{Cr}$ . Analizele au urmat protocolul cunoscut [Brunner, K.T. et al., "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on  $^{51}\text{Cr}$ -labeled allogeneic target cells *in vitro*". Immunology 14: 181-189 (1968)]; s-a observat liză celulară substanțială a celulelor țintă SB pozitive CD20 (marcate cu  $^{51}\text{Cr}$ ) mediată de anticorpii himerici anti-CD20 la sfârșitul incubării timp de 4 ore la  $37^\circ\text{C}$ . acest efect s-a observat pentru ambii anticorpi obținuți din CHO și SP2/0 (celulele-efectoare au fost limfocitele periferice umane; raportul celule-efectoare : țintă a fost 100:1) Liza eficientă a celulelor țintă s-a obținut la 3.9  $\mu\text{g/ml}$ . Invers, în aceleași condiții, anticorpii anti-CD20 monoclonal murin 2B8 a avut un efect statistic nesemnificativ și celulele CD20 negative HSB nu au fost supuse lizei. Rezultatele sunt prezentate în fig. 8.

Rezultatele exemplului II indică că anticorpii himerici anti-CD20 din exemplul I au fost imunologic activi.

### III. REDUCEREA *IN VIVO* A CELULELOR B FOLOSIND ANTI-CD20

#### A. Studiul primatelor non-umane

S-au efectuat 3 studii separate ale primatelor neumane. Pentru conveniență, acestea au fost numite aici ca "anti-CD20 himeric : CHO și SP2/0"; "anti-CD20 himeric : CHO"; și "Dozaj ridicat de anti-CD20 himeric". Condițiile au fost precum urmează:

Anti-Cd20 himeric : CHO și SP2/0

Șase maimuțe *cynomolgus* cu greutatea cuprinsă între 4.5 și 7 kg [White Sands Research Center, Alamogordo, NM] s-au divizat în trei loturi a câte 2 maimuțe. Ambele animale din fiecare lot au primit aceeași doză de anticorp himeric anti-CD20 imunologic activ. Un animal din fiecare lot a primit anticorp purificat produs prin transfectom CHO; altul a primit anticorpii produs prin transfectom SP2/0. Cele trei loturi au primit doze de anticorp constituind la 0.1 mg/kg, 0.4 mg/kg și 1.6 mg/kg în fiecare zi timp de 4 zile consecutive. Anticorpii himerici anti-CD20 imunologic activ amestecat cu soluție fiziologică sterilă s-a administrat prin infuzie intravenoasă. Înainte de fiecare infuzie au fost prelevate probe de sânge. probe suplimentare de sânge s-au prelevat începând de la 24 ore după ultima injecție (T=0) și apoi în zilele 1, 3, 7, 14 și 28. Apoi au fost prelevate probe de sânge la intervale bisăptămânale până la finalizarea studiului la 90 de zile.

S-au centrifugat aproximativ 5 ml din sângele integral de la fiecare animal la 2000 rot./min timp de 5 min. S-a recuperat plasma pentru examenul nivelurilor de anticorp himeric anti-CD20 solubil. Precipitatul (conținând leucocite din sânge periferic și eritrocite sangvine) s-au resuspendat în ser fetal de mână pentru analiza anticorpului marcat fluorescent ["Fluorescent Antibody Labeling of Lymphoid Cell Population"].

Anti-CD20 himeric : CHO

Șase maimuțe *cynomolgus* cu greutatea cuprinsă între 4...6 kg (White Sands) s-au divizat în 3 loturi a câte 2 maimuțe. Toate animalele s-au injectat cu anticorpi himerici anti-CD20 imunologic activi produși de transfectomul CHO (în soluție fiziologică sterilă). Aceste trei loturi s-au divizat după cum urmează: sublotul I a primit injecții intravenoase zilnice de 0.01 mg/kg anticorp cu interval de 4 zile; sublotul II a primit zilnic injecții intravenoase de 0.4 mg/kg anticorp cu interval de 4 zile; sublotul III - injecție intravenoasă unică de 6.4 mg/kg anticorp. De la toate trei subloturi s-au prelevat probe de sânge înaintea inițierii tratamentului; de asemenea, s-au prelevat probe suplimentare de sânge la T=0, 1, 3, 7, 14 și 28 zile după ultima injecție. aceste probe s-au prelucrat pentru analiza anticorpului marcat fluorescent ["Fluorescent Antibody Labeling of Lymphoid Cell Population"]. Pe lângă cuantificarea celulelor B din sângele periferic, s-au prelevat biopsii din ganglionii limfatici la 7, 14 și 28 zile după ultima injecție și s-a colorat o piesă dintr-o singură celulă pentru cuantificarea populațiilor de limfocite prin citometrie în flux.

Dozaj ridicat de anti-CD20 himeric

două maimuțe *cynomolgus* (White Sands) s-au infuzat cu 16.8 mg/kg anticorpi himerici anti-CD20 imunologic activi produși din transfectom CHO (în soluție fiziologică sterilă) săptămânal timp de 4 săptămâni consecutive. La încheierea tratamentului ambele animale au fost anesteziate pentru înlăturarea măduvei osoase; de asemenea, s-au

prelevat biopsii din ganglionii limfatici. Ambele serii de țesuturi s-au colorat pentru determinarea prezenței de limfocite B, folosind Leu 16 prin citometrie în flux conform protocolului cunoscut [Ling, N.R., et al., "B-cell and plasma cell antigens "Leucocyte Typing III White Cell Differentiations Antigens, A.J. McMichael, Ed. Oxford University Press, Oxford UK, 1987, p. 302;].

Marcarea fluorescentă a anticorpilor populației celulare limfoide

După îndepărtarea plasmei leucocitele s-au spălat de 2 ori cu soluție salină echilibrată Hanks ("HBSS") și s-au resuspendat într-un volum echivalent de plasmă de ser fetal bovin (inactivată termic la 56°C timp de 30 min). S-a distribuit un volum de 0.1 ml piesă celulară la 6 eprubete conice de centrifugă de 15 ml.

În 3 eprubete s-au adăugat anticorpi monoclonali marcați cu fluoresceină pentru markerii limfocitari umani de suprafață CD20 (AMAC, Westbrook, ME), CD20 (Becton Dickinson) și IgM uman (Binding Site, San Diego, CA) pentru identificarea populațiilor de limfocite T și B. Toți reactivii au fost testați anterior ca pozitivitate la antigenii corespunzători limfocitelor de maimuță. Legarea anticorpului himeric anti-CD20 la CD20 de la suprafața celulei B de maimuță s-a observat în eprubeta 4 folosind anticorp policlonal de capră anti-IgG uman cuplat cu ficoeritrină (AMAC). Acest reactiv s-a preadsorbit pe o coloană de sefaroză Ig maimuță pentru a preveni reactivitatea încrucișată la Ig maimuță, permițând astfel detectarea specifică și cuantificarea anticorpului himeric anti-CD20 legat la celule. A 5-a eprubetă a inclus reactivi anti-IgM și anti-IgG umani pentru colorație dublă a populației de celule B. A 6-a probă nu a inclus nici un reactiv pentru a se putea determina autofluorescența. Celulele s-au incubat cu anticorpi fluorescenți timp de 30 min, s-au spălat și s-au fixat cu 0.5 ml soluție-tampon de fixare (NaCl 0.15M, paraformaldehidă 1%, pH 7.4) și s-au analizat pe un instrument Becton Dickinson FACScan™. Populațiile limfocitare s-au identificat inițial prin sens direct: contra unghiului drept al luminii difuze într-un raster punctiform cu leucocite nemarcate. Apoi, s-a izolat populația totală de limfocite prin eliminarea tuturor celorlalte populații. Măsurările ulterioare de fluorescență au reflectat doar evenimentele specifice limfocitelor selectate.

Distrugerea limfocitelor B din sângele periferic.

Nu s-a putut stabili nici o diferență observabilă între eficiența anticorpilor produși din CHO și SP2/0 în distrugerea *in vivo* a celulelor B, deși o ușoară creștere în recuperarea celulelor B a început după 7 zile pentru maimuțele injectate cu anticorpi himerici anti-CD20 derivați de la transfectom CHO la nivel de dozare echivalent cu 1.6 mg/kg și 6.4 mg/kg, observându-se pentru maimuțele injectate cu anticorp produs din SP2/0 la nivelul de dozare de 0.4 mg/kg. Fig. 9A, b și C prezintă rezultatele obținute în studiul anti-CD20 himeric : CHO și SP2/0, fig. 9A se referă la nivelul dozei de 0.4 mg/kg; fig. 9B - nivelul dozei de 1.6 mg/kg și fig. 9C - 6.4 mg/kg.

Așa cum este evident din fig. 9, a existat o descreștere dramatică în nivelul celulelor B periferice (>95%) după tratamentul terapeutic față de toate domeniile de doză testată. Aceste niveluri s-au menținut până la 7 zile postinfuzie; după această perioadă, celulele B au început să se recupereze, și momentul inițierii recuperării a fost independent de nivelurile dozei.

În studiul anti-CD20 himeric : CHO s-a utilizat o concentrație de dozare a anticorpului de 10 ori mai scăzută (0.01 mg/kg) o perioadă de timp de 4 injecții zilnice (total 0.04 mg/kg). Fig. 10 prezintă rezultatele acestui studiu. Acest dozaj a distrus populația de celule sangvine B periferice până la aproximativ 50% din nivelurile normale estimate fie cu antigen de suprafață IgM, fie cu anticorp Leu 16. De asemenea, rezultatele indică saturația antigenului CD20 pe populația limfocitară B care nu s-a obținut cu anticorpul himeric anti-CD20 imunologic activ la această perioadă de timp pentru primate non-umane. limfocitele B acoperite cu anticorpi s-au detectat în primele 3 zile ale tratamentului terapeutic. Totuși, de la a 7-ea zi nu s-au mai detectat celule acoperite cu anticorp.

Tabelul 1 rezumă rezultatele acțiunii anticorpului himeric anti-CD20 imunologic activ în doză unică și doze multiple asupra populațiilor sangvine periferice. Doză unică a fost 6.4 mg/kg; doza multiplă a fost 0.4 mg/kg timp de 4 zile consecutive (aceste rezultate au fost derivate de la maimuțele descrise mai sus).

Tabelul 1

Studiul C2B8 din populația sangvină periferică de la primate

Maimuță	Doză	Zi	CD20	Anti-IgG uman
A	0.4 mg/kg (4 doze)	sânge prelevat anterior	81.5	–
		0	86.5	0.2
		7	85.5	0.0
		21	93.3	–
		28	85.5	–
B	0.4 mg/kg (4 doze)	sânge prelevat anterior	81.7	–
		0	94.6	0.1
		7	92.2	0.1
		21	84.9	–
		28	84.1	–
C	6.4 mg/kg (1 doză)	sânge prelevat anterior	77.7	0.0

		7 21 28	85.7 86.7 76.7	0.1 – –
D	6.4 mg/kg (1 doză)	sânge prelevat anterior 7 21 28	85.7 94.7 85.2 85.9	0.1 0.1 – –

Maimuță	Anti-IgG uman Anti-IgM uman*	Leu-16	Distrugerea celulei B, %
A	–	9.4	0
	0.3	0.0	97
	0.1	1.2	99
	–	2.1	78
	–	4.1	66
B	–	14.8	0
	0.2	0.1	99
	0.1	0.1	99
	–	6.9	53
	–	8.7	41
C	0.2	17.0	0
	0.1	0.0	99
	–	14.7	15
	–	8.1	62
	D	0.1	14.4
0.2		0.0	99
–		9.2	46
–		6.7	53

\* Colorarea dublă a populației care indică gradul de acoperire a celulei B cu anti-CD20 himerici.

Datele rezumate în tabelul 1 arată că distrugerea celulelor B din sângele periferic în condițiile excesului de anticorpi se produce rapid și eficient indiferent de nivelurile de dozare unice sau multiple. Suplimentar, s-a observat distrugere la cel puțin 7 zile după ultima injecție, cu recuperarea parțială de celule B observată la 21 zile.

Tabelul 2 rezumă efectul anticorpilor himerici anti-CD20 imunologic activi asupra populațiilor celulare ale ganglionilor limfatici folosind regimul de tratament din tabelul 1 (4 doze zilnice de 0.4 mg/kg; o doză de 6.4 mg/kg); de asemenea, se dau valori comparate pentru ganglionii limfatici normali (mămuța martor, axilar și inghinal) și măduva osoasă normală (2 maimuțe).

Tabelul 2

*Populația celulară a ganglionilor limfatici*

Maimuță	Doză	Zi	CD20	anti-IgM uman
A	0.4 mg/kg (4 doze)	7	66.9	–
		14	76.9	19.6
		28	61.6	19.7
B	0.4 mg/kg (4 doze)	7	59.4	–
		14	83.2	9.9
		28	84.1	15.7
C	6.4 mg/kg (1 doză)	7	75.5	–
		14	74.1	17.9
		28	66.9	23.1
d	6.4 mg/kg (1 doză)	7	83.8	–
		14	74.1	17.9
		28	84.1	12.8

Maimuță	Anti-IgG uman + Anti-IgM uman	Leu-16	Distrugerea limfocitelor B, %
A	7.4	40.1	1
	0.8	22.6	44
	–	26.0	36
B	29.9	52.2	0

	0.7 –	14.5 14.6	64 64
C	22.3 1.1 –	35.2 23.9 21.4	13 41 47
D	12.5 0.2 –	19.7 8.7 12.9	51 78 68

	CD2	Anti-IgG uman+ Anti-IgM uman	Anti-IgM uman	Leu-16	Distrugerea limfocitelor B, %
Ganglioni limfatici normali					
Martor 1	55.4	25.0	–	41.4	datele lipsesc
Axilar	52.1	31.2	–	39.5	
Inghinal	65.3	19.0	–	11.4	
Măduvă osoasă normală	29.8	28.0	–	16.6	
Martor 2 Martor 3					

Rezultatele din tabelul II evidențiază reducerea eficiență a limfocitelor B pentru ambele regimuri de tratament. Tabelul II indică suplimentar că pentru primatele non-umane nu s-a atins saturația completă a celulelor B din țesutul limfatic cu anticorp himeric anti-CD20 imunologic activ; în plus, s-a observat acoperirea celulelor cu anticorp după 7 zile de tratament, urmată de o reducere marcată a celulelor B din ganglionii limfatici începând din ziua a 14-a.

Pe baza acestor date, studiul, la care s-a făcut referire sus ca doză unică de anti-CD20 himeric, s-a efectuat în principal spre determinarea farmacologică / toxicologică. Adică, acest studiu s-a orientat spre evaluarea oricărei toxicități asociate cu administrarea anticorpului himeric, precum și a eficienței distrugerii celulelor B din sângele periferic, ganglionii limfatici și măduva osoasă. Suplimentar, deoarece datele din tabelul II arată că pentru acest studiu majoritatea celulelor B din ganglionii limfatici au fost distruse între 7 și 14 zile de tratament, un regim de dozare săptămânal poate avea rezultate mai eficiente. Tabelul III prezintă rezultatele studiului dozei ridicate de anti-CD20 himeric.

*Tabelul 3*

*Populația celulară a ganglionilor limfatici și măduvei osoase*

Populații limfocitare (%)

Maimuță	CD2	CD20 <sup>a</sup>	IgM+anti- C2B8 <sup>b</sup>	C2B8 <sup>c</sup>	zile <sup>d</sup>
Ganglionii limfatici inghinali					
E	90.0	5.3	4.8	6.5	22
F	91.0	6.3	5.6	6.3	22
G	89.0	5.0	3.7	5.8	36
H	85.4	12.3	1.7	1.8	36
Măduva osoasă					
E	46.7	4.3	2.6	2.8	22
F G H	41.8	3.0	2.1	2.2	22
	35.3	0.8	1.4	1.4	36
	25.6	4.4	4.3	4.4	36

<sup>a</sup> Indică populația colorată cu Leu 16.

<sup>b</sup> Indică populația colorată dublu, pozitivă pentru celulele IgM de suprafață și celulele acoperite cu anticorpi himerici.

<sup>c</sup> Indică colorația completă a populației pentru anticorp himeric, inclusiv colorația dublă a celulelor IgM pozitive de suprafață și colorația unică (celule IgM negative de suprafață).

<sup>d</sup> Numărul zilelor după injectarea dozei finale de 16.8 mg/kg.

Ambele animale evaluate la 22 zile după încetarea tratamentului au conținut mai mic de 5% de celule B comparativ cu 40% conținute în ganglionii limfatici din martor (vezi tabelul 2). Asemănător, în măduva osoasă a animalelor tratate cu anticorp himeric anti-CD20, nivelurile celulelor CD20 pozitive au fost mai mici decât 3% comparativ cu 11...15% la animalele normale (vezi tabelul 2). Din animalele evaluate la 36 zile după încetarea tratamentului, unul din animale (H) a avut aproximativ 12% celule B în ganglionii limfatici și 4.4% celule B în măduva osoasă, în timp ce altul (G) a avut aproximativ 5% celule B în ganglionul limfatic și 0.8% în măduva osoasă. aceste date confirmă o distrugere semnificativă a celulelor B.



Rezultatele din exemplul III.A. confirmă că dozele scăzute de anti-CD20 himeric imunologic activ conduc pe termen lung la distrugerea celulelor B din sângele periferic la primate. De asemenea, datele arată că distrugerea semnificativă a populațiilor de celule B s-a atins în ganglionii limfatici periferici și măduva osoasă când s-au administrat repetat doze mari de anticorp. Continuarea urmăririi testului pe animale a arătat că chiar cu o asemenea distrugere severă de limfocite B periferice în timpul primei săptămâni de tratament nu au apărut alte efecte adverse. Mai mult ca atât, s-a observat o recuperare a populației de celule B, fiind posibilă concluzia că celulele stemice pluripotente ale acestor primate nu au fost afectate în mod advers prin tratament.

#### B. Analiza clinică a C2B8

##### i. Test clinic, faza I/II, al C2B8: studiul terapiei cu doză unică

S-au tratat cu C2B8 într-un test clinic, faza I/II, 15 pacienți având documentația histologică de recădere în limfom a celulei B. Fiecare pacient a primit 1 singură doză de C2B8 într-un studiu cu doză crescătoare, au fost trei pacienți/doză; 10 mg/m<sup>2</sup>; 50 mg/m<sup>2</sup>; 100 mg/m<sup>2</sup>; 250 mg/m<sup>2</sup> și 500 mg/m<sup>2</sup>. Tratamentul a fost prin infuzie i. v. printr-un filtru în linie de 0.22 μ cu C2B8 diluat într-un volum final de 250 cm<sup>3</sup> sau o concentrație maximă de 1 mg/ml în soluție fiziologică standard. Rata inițială a fost 50 cm<sup>3</sup>/h în prima oră; dacă nu s-a observat nici o toxicitate doza ratei s-a mărit până la un maxim de 200 cm<sup>3</sup>/h.

Toxicitatea (așa cum s-a indicat de către clinician) a fost de la “nici una”, la “febră” și la “moderat” (2 pacienți), la “severă” (1 pacient); toți pacienții au primit tratamentul terapeutic complet. S-au analizat limfocitele sangvine periferice pentru a determina impactul C2B8 asupra celulelor T și celulelor B. Consecutiv, pentru toți pacienții limfocitele B din sângele periferic au fost distruse după infuzie cu C2B8 și asemenea distrugere s-a menținut în exces timp de 2 săptămâni.

Unul dintre pacienți (doza de 100 mg/m<sup>2</sup> de C2B8) a evidențiat un răspuns parțial la tratamentul cu C2B8 (reducere mai mare de 50% în suma produselor diametrelor perpendiculare ale tuturor indicatorilor măsurabili ai leziunilor după mai mult de 4 săptămâni, timp în care nu au mai apărut leziuni noi și nici nu au mai existat leziuni mai mari); la cel puțin un pacient (care a primit 500 mg/m<sup>2</sup>) s-a evidențiat un răspuns minor la tratamentul cu C2B8 (reducere mai mică decât 50%, dar cel puțin 25% în suma produselor celor două diametre perpendiculare celor mai lungi ale tuturor indicatorilor măsurabili ai leziunii). Pentru eficiența sugerată rezultatele PBL-urilor sunt prezentate în fig. 14; datele pentru pacientul care evidențiază un PR sunt prezentate în fig. 14A; pentru pacientul care evidențiază un MR, datele sunt prezentate în fig. 14B; în fig. 14, sunt aplicabile următoarele: =limfocite; =CD3+celule (celule T); Δ =CD20+celule; CD19+celule; o =kapa; Δ =lambda și ◇ =C2B8.

Evident că markerii celulei B CD20, Cd19, kapa și lambda s-au distrus după o perioadă depășind 2 săptămâni; în timp ce a existat o reducere ușoară inițială în numărul celulelor T, acestea au revenit la un nivel aproape inițial într-un timp-cadru relativ rapid.

##### ii. Test clinic, faza I/II, al C2B8: studiul terapiei cu doză multiplă

Pacienți având limfom al celulei B confirmat histologic cu boala în progres vizibil, au fost aleși pentru acest studiu care este împărțit în două părți: în faza I, constând dintr-o doză crescătoare pentru caracterizarea toxicităților dozelor limită și determinarea nivelului dozei active tolerate biologic, loturi de câte 3 pacienți au primit săptămânal infuzii i.v. de C2B8 pentru un total de 4 infuzii separate. Doza cumulată la fiecare dintre cele 3 niveluri a fost după cum urmează: 500 mg/m<sup>2</sup> (125 mg/m<sup>2</sup>/infuzie); 1000 mg/m<sup>2</sup> (250 mg/m<sup>2</sup>/infuzie); 1500 mg/m<sup>2</sup> (375 mg/m<sup>2</sup>/infuzie). Se definește o doză activă tolerată biologic și se va determina ca cea mai scăzută doză având atât toxicitate tolerabilă cât și activitate adecvată. În faza II, pacienții suplimentari vor primi doza activă tolerată biologic cu subliniere asupra determinării activității pentru cele 4 doze de C2B8.

#### IV. TERAPIE COMBINATĂ: C2B8 și Y2B8

S-a investigat o abordare terapeutică combinată folosind C2B8 și Y2B8 într-un model șoarece xenografic (șoareci nu/nu, femele de aproximativ 10 săptămâni ca vârstă), utilizând o tumoră limfoblastoidă de celulă B (celule tumorale Ramos). Pentru scopuri comparative, s-au tratat suplimentar, de asemenea șoareci, cu C2B8 și Y2B8.

Celulele tumorale Ramos (ATCC, CRL 1596) s-au menținut în cultură, folosind PRMI-1640 suplimentar cu 10% ser fetal de vițel și glutamină la 37°C și 5% CO<sub>2</sub>. S-au inițiat tumori la 9 femele de șoareci lipsiți de păr, în vârstă de aproximativ 7...10 săptămâni, prin injectare subcutanată de 1.7x10<sup>6</sup> celule Ramos într-un volum de 0.10 ml (HBSS) folosind o seringă de 1cm<sup>3</sup>, prevăzută cu ac 25 g. Toate animalele s-au manipulat într-o hotă cu flux laminar și toate cuștile, așternuturile, alimentele și apa s-au autoclavat. Celulele tumorale s-au recuperat prin excizarea tumorilor și trecerea acestora printr-o sită de 40 cel. Celulele s-au spălat de 2 ori cu 1xHBSS (50 ml) prin centrifugare (1300 rpm), s-au resuspendat în 1xHBSS de la 10x10<sup>6</sup> celule/ml și s-au înghețat la -70°C până la folosire.

Pentru condițiile experimentale s-au dezghețat celule din câteva loturi înghețate, s-au prelevat prin centrifugare (1300 rot./min) și s-au spălat de 2 ori cu 1xHBSS. Apoi, celulele s-au resuspendat până la aproximativ 2.0x10<sup>6</sup> celule/ml. S-au injectat aproximativ 9...12 șoareci cu 0.10 ml suspensie celulară (s.c.) folosind o seringă de 1 cm<sup>3</sup> prevăzută cu un ac de 25 g; injecțiile s-au făcut pe partea stângă a animalului aproximativ pe porțiunea mediană. Tumorile s-au dezvoltat în aproximativ 2 săptămâni. S-au excizat tumorile și s-au prelucrat cum s-a descris mai sus. Șoarecii luați în studiu s-au injectat cum s-a descris mai sus cu 1.67x10<sup>6</sup> celule în 0.10 ml HBSS.

Pe baza experimentelor preliminare de dozare, s-a determinat că s-ar putea utiliza pentru studiu 200 mg de C2B8 și 100 μCi Y2B8. S-au injectat 90 femele de șoareci nu/nu (în vârstă de aproape 10 săptămâni) cu celule tumorale. După aproape 10 zile, s-au desemnat 24 șoareci pentru 4 loturi de studiu (6 șoareci/lot), urmând în acest timp

menținerea unei distribuții a mărimii tumorilor comparabilă în fiecare lot (mărimia medie a tumorii, exprimată ca produs dintre lungimea și lățimea tumorii a fost aproximativ de 80 mm<sup>2</sup>). Următoarele loturi s-au tratat cum s-a indicat pe calea injecțiilor în vena cubitală, folosind o seringă Hamilton de 100 μl prevăzută cu un ac de 25 g:

A. Soluție fiziologică standard,

B. Y2B8 (100 μCi),

C. C2B8 (200 μg) și

D. Y2B8 (100 μCi) + C2B8 (200 μg).

Loturile testate cu C2B8 au primit a doua injecție de C2B8 (200 μg/șoarece) 7 zile după injecția inițială. Măsurările tumorii s-au făcut la fiecare 2...3 zile folosind un șubler.

Prepararea materialelor pentru tratament s-au făcut conform următoarelor protocoale:

A. Preparare de Y2B8

S-a transferat clorură de ytriu [90] la o eprubetă de propilenă și s-a ajustat pH-ul la 4.1-4.4 folosind acetat de sodiu 2M lipsit de metal. S-a adăugat 2B8-DTPA (0.3 mg în soluție fiziologică standard; vezi mai sus prepararea 2B8-MX-DTPA) și s-a amestecat cu grijă prin turbionare. După 15 min de incubare, reacția s-a oprit prin adăugarea a 0.05x20 mM volum EDTA și 0.05x2M volum acetat de sodiu. Radioactivitatea concentratului s-a determinat prin diluarea a 5.0 μl de amestec de reacție în 2.5ml 1xPBS care conține 75 mg/ml HSA și 1 mM DTPA ("formulare-tampon"); număratoarea s-a realizat prin adăugarea de 10.0 μl la 20 ml de amestec de scintilație Ecolume™. Amestecul reactiv rămas s-a adăugat la 3.0 ml formulare tampon, s-a filtrat steril și s-a depozitat la 2...8°C până la utilizare. S-a calculat activitatea specifică (14 mCi/mg la momentul injectării), folosind concentrația de radioactivitate și concentrația proteinei calculate pe baza cantității anticorpului adăugat la amestecul de reacție. Radioactivitatea asociată proteinei s-a determinat folosind cromatografia instantanee în strat subțire. Radioactivitatea a fost de 95%. S-a diluat Y2B8 în formularea-tampon imediat înaintea folosirii și s-a filtrat steril (concentrația radioactivității finale a fost 1.0 mCi/ml).

B. Preparare de C2B8

C2B8 s-a preparat cum s-a descris mai sus C2B8 s-a asigurat ca reactiv steril în soluție fiziologică normală la 5.0 mg/ml. Înainte de injectare C2B8 s-a diluat în soluție fiziologică normală până la 2.0 mg/ml și s-a filtrat steril.

C. Rezultatele

După tratament mărimea tumorii s-a exprimat ca un produs al lungimii și lățimii, și măsurările s-au făcut în zilele indicate în fig. 11 (Y2B8 în comparație cu soluția fiziologică); fig. 12 (C2B8 în comparație cu soluția fiziologică) și fig. 13 (y2B8 + C2B8 în comparație cu soluția fiziologică). De asemenea, s-a determinat eroarea standard.

Așa cum s-a indicat în fig. 13, combinația Y2B8 și C2B8 prezintă efecte tumoricide comparabile efectelor manifestate fie de către Y2B8, fie de C2B8.

V. Strategii de terapie alternativă

Strategiile terapeutice alternative recunoscute în optica exemplelor anterioare sunt evidente. O asemenea strategie constă în utilizarea unei doze terapeutice de C2B8 urmată în cca 1 săptămână de o combinație fie de 2B8, fie de 2B8 radiomarcant (de exemplu Y2B8); sau 2B8, C2B8 și, de exemplu, Y2B8; sau C2B8 și, de exemplu, Y2B8. O strategie suplimentară este utilizarea de C2B8 radiomarcant. O asemenea strategie permite utilizarea avantajelor porțiunii active imunologic a C2B8 plus acele avantaje asociate cu un marcaj radioactiv. Marcajele radioactive preferate includ: ytriu-90 care dă o viață de înjumătățire a C2B8 în circulație mai mare față de anticorpurile murine 2B8. Datorită capacității C2B8 de a distruge celulele B și avantajelor de a fi derivat de la folosirea unui marcaj radioactiv, o strategie alternativă preferată este de a trata pacientul cu C2B8 (fie cu o doză unică, fie cu doze multiple), astfel încât majoritatea, dacă nu toate celulele periferice B să fie distruse. Aceasta ar fi apoi urmată de utilizarea 2B8 radiomarcant, datorită distrugerii celulelor periferice B, 2B8 radiomarcant menține o șansă crescută de țintire a celulelor tumorale. Este preferată utilizarea lui 2B8 marcat cu iod [131] dat fiind tipurile rezultatelor raportate în literatura de acest marcaj (vezi [Kaminski, M.G. et al., "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with (<sup>131</sup>I) anti-B1 (Anti-CD20) Antibody" NEJM 329/7 (1993) (iodine-131 labeled anti-CD20 antibody B1; hereinafter "Kaminski")]).

O preferință alternativă implică utilizarea unui 2B8 radiomarcant (sau C2B8) inițial într-un efort de creștere a permeabilității unei tumori urmat de tratamente unice sau multiple cu C2B8; intenția acestei strategii este creșterea șanselor lui C2B8 de a ajunge atât în exteriorul, cât și în interiorul masei tumorale. O strategie ulterioară implică utilizarea agenților chemoterapeutici în combinație cu C2B8. Aceste strategii includ așa-numitele tratamente "înșelătoare", adică, tratament cu agent chemoterapeutic urmat de tratament cu C2B8, urmat de o repetiție a acestui protocol.

Alternativ, este viabil tratamentul inițial cu o doză unică sau doze multiple C2B8, după care urmează tratamentul chemoterapeutic. Agenți chemoterapeutici preferați, includ, dar nu se limitează la, ciclofosamidă; doxorubicină; vincristină și prednison [Armitage, J.O. et al., Cancer, vol. 50, 1982, 1695].

Strategiile terapeutice alternative descrise mai sus nu au intenția să fie limitate, ci mai degrabă sunt prezentate ca fiind reprezentative.

## LISTA SECVENȚELOR

## (1) INFORMAȚII GENERALE

(i) SOLICITANT: Darrell Anderson, Nabil Hanna, John Leonard, Roland Newman and Mitchel Reff and William H. Rastetter

(ii) TITLUL INVENȚIEI: Metode de tratament al limfomului celulelor B, anticorpi anti-CD20, hibridom.

(iii) NUMĂRUL SECVENȚELOR: 8

(iv) ADRESA PENTRU CORESPONDENȚĂ: (A) ADRESANT: IDEC Pharmaceutical Corporation (B) STRADA: 11011 Torreyana Road (C) ORAȘ: San Diego (D) STATUL: California United states (E) ȚARA: SUA (F) ZIP: 92121

(v) FORMA CITIBILĂ PE COMPUTER: (A) TIP SUPORT: 3.5 inch, 1.44 Mb (dischetă) (B) COMPUTER: Macintosh (C) SISTEM DE OPERARE: MS.DOS (D) Software: Microsoft Word

(vi) INFORMAȚII MANDATAR: (A) NUMELE: BURGOON, RICHARD PÂNĂ. JR (B) NUMĂR DE ÎNREGISTRARE: 34,787

(vii) INFOPRMAȚII PENTRU TELECOMUNICAȚII: (A) TELEFON: (619) 550-8500 (B) TELEFAX: (619) 550-8750

## (2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 1

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

(A) LUNGIME: 8540 baze

(B) TIP: acid nucleic

(C) IMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: circulară

(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)

(iii) IPOTETIC: da

(iv) ANTI-SENS: nu

(v) DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvență ID nr.1 (3) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 2

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

(A) LUNGIME: 9209 baze

(B) TIP: acid nucleic

(C) IMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: circulară

(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)

(iii) IPOTETIC: da

(iv) ANTI-SENS: nu

DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvență ID nr.2

## (4) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 3

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

(A) LUNGIME: 54 baze

(B) TIP: acid nucleic

(C) IMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)

(iii) IPOTETIC: da

(iv) ANTI-SENS: nu  
DESCRIEREA SECVENTEI: Secvență ID nr.3

(5) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 4  
(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:  
(A) LUNGIME: 30 baze  
(B) TIP: acid nucleic  
(C) IMPLETIRE: simplă  
(D) TOPOLOGIE: lineară  
(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)  
(iii) IPOTETIC: da  
(iv) ANTI-SENS: da  
DESCRIEREA SECVENTEI: Secvență ID nr.4

(6) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 5  
(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:  
(A) LUNGIME: 384 baze  
(B) TIP: acid nucleic  
(C) IMPLETIRE: simplă  
(D) TOPOLOGIE: lineară  
(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)  
(iii) IPOTETIC: da  
(iv) ANTI-SENS: nu  
DESCRIEREA SECVENTEI: Secvență ID nr.5

(7) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 6  
(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:  
(A) LUNGIME: 27 baze  
(B) TIP: acid nucleic  
(C) IMPLETIRE: simplă  
(D) TOPOLOGIE: lineară  
(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)

(iii) IPOTETIC: da

(iv) ANTI-SENS: nu

DESCRIEREA SECVENTEI: Secvență ID nr.6

(8) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 7

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

(A) LUNGIME: 29 baze

(B) TIP: acid nucleic

(C) IMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)

(iii) IPOTETIC: da

(iv) ANTI-SENS: da

DESCRIEREA SECVENTEI: Secvență ID nr.7

(9) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 8

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

(A) LUNGIME: 4204 baze

(B) TIP: acid nucleic

(C) IMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)

(iii) IPOTETIC: da

(iv) ANTI-SENS: nu

DESCRIEREA SECVENTEI: Secvență ID nr.8