

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Obținerea unei linii celulare imortalizate, secretând mAbs, conform invenției, poate fi efectuată prin procedee cunoscute *per se*, așa ca: conjugarea liniei imortalizate cu o cultură de hibridom; transformarea EBV; construirea

liniei celulare cu ajutorul ingineriei genetice, adică linia celulară CHO, care poate fi obținută prin diferite procedee cunoscute; *per se* etc. În general, procedeul de obținere a unor linii celulare imortalizate secretând anticorpi monoclonali, actualmente prezintă o procedură de rutină cunoscută specialiștilor și descrierea ei este dată după prezentul studiu.

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

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

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

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

Celulele acestei linii sunt numite uneori "celule BAT-1" și anticorpii monoclonali "mAbs BAT-1".

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

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

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

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

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

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

Anticorpii monoclonali, conform invenției, pot fi folosiți în tratamentul diferitelor boli, altele decât cancerul, în care ridicarea activității citotoxice a sistemului imun poate fi stimulată cu mAbs, de ex., în stările primare ale infecției HIV (SIDA), în diferite dereglări autoimune, sau în unele cazuri de imunodeficiențe genetice sau acute.

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

Efectul antitumoral este un efect biologic, care se manifestă prin micșorarea mărimilor tumorii, reducerea metastazelor, prolongarea sau ameliorarea vieții în diferite stări fiziologice, asociate cu prezența cancerului.

Anticorpii solicitați, prin posibilitatea de a preveni apariția tumorii în localizarea primară, manifestă efectul antitumoral și astfel pot fi folosiți atât în tratamentul cancerului acut, cât și în prevenirea cancerului.

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

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

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

fig. 1a, vederea fondului fără anticorpii BAT;

fig. 1b, anticorpii anti-CD3;

fig. 1c, BAT-1;

fig. 1d, BAT-5;

fig. 1e, BAT-2;

fig. 1f, BAT-4.

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

Fig. 2A, celulele necernute;

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

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

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

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

Fig. 2B, celulele cernute;

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

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

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

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

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

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

Fig. 3A, celulele necernute;

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

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

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

Fig. 3B, celulele cernute;

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

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 5, reprezentarea grafică a rezultatelor încorporării [³H]Timidinei în celule, cultivate pentru 6 zile în mediu cu concentrație ascendentă de mAbs BAT; BAT-1 (-Ū-), BAT-2 (-X-), BAT-3 (-Z-), BAT-5 (-«-), BAT-6 (-↓-), BAT-7 (-n-).

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

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

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

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

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

Metode și materiale

Producerea anticorpilor monoclonali

Șoarecii BALB/c au fost imunizați cu preparat membranos de celule Daudi. Membranele celulelor Daudi au fost preparate prin metoda șocului hipotonic, cu glicerol [1]. 50-80 x 10⁶ celule suspendate în PBS și incubate la temperatura de 37°C au fost saturate treptat cu glicerol, de 30%. Peste 5 min de incubare pe gheață, ele au fost centrifugate și resuspendate în lizatul-tampon Tris (care conține: 10 mM de Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ cu pH 7.4), amestecate 5 min la 4°C și centrifugate la 700 g. Supernatantul a fost extras și centrifugat la 3300 g (10 min la 4°C). Precipitatul a fost spălat încă o dată și ambii supernatanți, conținând fracții de membrane, au fost îmbinați. 260 ml de preparat membranos (3 mg/ml) au fost emulsionate cu 260 ml de adjuvant complet Freund și injectate i.p. șoarecilor BALB/c. Peste trei săptămâni de la șoareci au fost extrase splinele. Splenocitele au fost introduse în linia NS-0 celulară de mielom în raportul 10:1. Fuziunea a fost efectuată cu folosirea polietilenglicolului și hibridoamele au fost crescute în mediu selectiv după Kohler și Milstein [2].

Pentru screeningul supernatanților din hibridoamele în creștere a fost folosită celula legată prin analiza imunisorbentă enzimatică (ELISA), care se leagă cu celulele Daudi. Supernatanții hibridomului pozitiv au fost

selecția prin proprietatea lor de a induce proliferarea PBM umane utilizând proba de capturare a [³H]Timidinei. Liniile pozitive au fost subclonate prin diluare limitată, testate repetat, extinse și crescute în cultură. Anticorpii monoclonali au fost purificați din mediul cultural prin precipitare cu sulfat de amoniu 50% și cu dializa extensivă împotriva PBS. Purificarea ulterioară a fost efectuată prin cromatografia afinității la sefaroză (marcă înregistrată a firmei Pharmacia, Suedia) legată cu coloanele anticorpilor antimurini.

Mediul cultural

Toate celulele au fost suspendate în mediul RPMI 1640, completat cu ser fetal de vițel 10% (FCS) Na-piruvat (1,1 mg/ml), L-glutamină (0,3 mg/ml) și antibiotice (penicilină 200 u/ml și streptomycină 10 m/ml), și incubate în incubator umed cu CO₂ 5%.

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

Prepararea celulelor

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

PBM au fost purificate de monocite cu coloane de sefadex G10 (Sephadex, marcă înregistrată, Pharmacia, Suedia). Celulele T au fost separate prin metoda rozetelor SRBC (eritrocite de berbec). Purificarea celulelor CD3 pozitive și Leu19 pozitive a fost efectuată prin tehnologie imunomagnetică. Culturile de PBM, incubate pentru 5-6 zile cu mAbs BAT sau cu martorul, au fost spălate de trei ori cu PBS. Anticorpii neconjugați la CD3 sau Leu19 (CD56) au fost adăugați la celule în mediul complet RPMI și incubate timp de o oră la 4°C. Pentru 30 min au fost adăugate globule magnetice, acoperite cu anticorpi antimurini. Celulele alipite la globule, au fost înlăturate cu un magnet și celulele nealipite au fost analizate la activitate citotoxică și marcate prin citometrie curgătoare.

Analiza citotoxicității

Analizele citotoxicității au fost efectuate în următorul mod: 2-4 x 10⁶ de celule-țintă au fost amestecate cu 200 mC de ⁵¹Cr-cromat timp de o oră în mediu fără ser. Ele au fost spălate de trei ori cu mediul complet și în fine resuspendate în RPMI - 10% FCS și plasate în godeuri câte 10⁴ celule. Celulele efectoare au fost cultivate, limfocitele au fost preparate din sânge periferic normal, incubat în diferite perioade de timp cu diferiți mAbs, martorul izotopic IgG sau cu IL-2. Până la analiză celulele au fost spălate de trei ori în mediul RPMI, vopsite pentru viabilitatea celulelor cu tripan albastru 1%, amestecate cu celulele-țintă în diferite proporții efector-țintă în plăci pentru microtitrare cu fund rotund și incubate timp de 3 ore la 37°C în CO₂ 5%. Supernatanții cultivați au fost colectați și estimați în scintilatorul b. Eliberarea maximă de izotop (MR) a fost produsă prin incubarea celulelor-țintă cu triton x-100 (marcă înregistrată, Sigma, St. Louis, Missouri, SUA). Eliberarea spontană (SR) a fost înregistrată prin incubarea celulelor-țintă în mediu curat. Procentajul lizei celulare se calculează prin formula (ER-SR/MR-SR)x100, în care ER este eliberarea experimentală a efectorului.

Inducerea citotoxicității la subpopulațiile limfocitelor umane

Celulele PBM (4 x 10⁶ ml) au fost cultivate timp de 6 zile în prezența mAbs BAT. Apoi celulele au fost spălate de trei ori și purificate de celulele CD3 și Leu19 cu folosirea globulelor magnetice acoperite cu f(ab')₂ antimurini și testate la citotoxicitate împotriva celulelor K562 și Daudi.

Citometrie curgătoare

Antigenii de suprafață ai celulelor au fost observați prin citometrie curgătoare folosind FACS 440 (Becton - Dickinson). Pentru fiecare analiză au fost folosite câte 10⁶ celule. Celulele au fost vopsite prin incubare consecventă cu o concentrație optimă de mAb murin în CD3 umane, receptorii de IL-2 sau mAb BAT 1-9, care au fost produse. În această vopsire indirectă, F(ab')₂ antimurin de țap FITC-conjugat a fost anticorpusul a doilea. Fiecare incubare a fost menținută în PBS cu pH 7.4, conținând BSA 1% și azotură de Na 0.5% la 4°C timp de 30 min, și apoi a fost spălată de trei ori în același tampon. Au fost analizate 10⁴ celule vopsite.

Determinarea saiturilor de legare a mAb BAT

Determinarea saiturilor de legare pe lizatele celulelor B limfoblastoide de tip Daudi a fost efectuată cu folosirea tehnicii Western Blot. În scurt, 50x10⁶ celule/ml suspendate în PBS au fost treptat saturate cu glicerol 30%, și membranele au fost separate prin centrifugări consecvente.

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

Modele de tumori la șoareci

Au fost folosite trei modele de tumori la șoareci: B16 melanom, carcinom pulmonar Lewis (311) și fibrosarcom indus cu metilcolantren (MCA 105). 50 - 200x10⁶ de celule au fost injectate i.v. la șoareci C57BL (în vârstă de 8 săptămâni). Peste două săptămâni a fost injectat (i.v.) BAT-1 1-10 mg/șoarece și peste 10 zile șoarecii au fost sacrificați și s-au calculat metastazele pulmonare depistate.

Exemple

Exemplul 1.

a. Caracteristicile legării.

Nouă anticorpi monoclonali (mAbs), semnați BAT 1-9, obținuți prin imunizarea celulelor B limfoblastoide, au fost selectați după legarea cu celulele Daudi și apoi după inducerea proliferării limfocitelor umane ale sângelui periferic. Izotipurile mAbs BAT au fost determinate ca și analizele ELISA și Ochterlony. A fost depistat că: BAT 1, 2, 3, 6, 7 și 9 sunt de clasa IgG1, dar BAT 4 și 5 de clasa IgM. BAT 8 a fost IgG2a.

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

b. Legarea mAb BAT-1 cu subpopulațiile limfocitelor umane

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

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

Tabelul 1

Legarea mAb BAT-1 cu subpopulații limfoide umane

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

c. Legarea mAbs BAT cu diferite tipuri de celule

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

Tabelul 2

Legarea mAbs BAT-1 cu diferite tipuri de celule

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

Exemplul 2.

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

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

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

Exemplul 3.

Caracteristicile funcționale ale mAbs BAT

a. Încorporarea timidinei indusă cu mAbs BAT

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

Cum este arătat în Fig. 5, mărirea treptată a concentrației de mAbs BAT rezultă o creștere moderată, dar considerabilă a încorporării [³H]Timidinei în celulele PBM. O doză mare de anticorpi a cauzat descreșterea capturării. În experimentele de control, anticorpii izotipic marcați n-au ridicat cantitatea [³H]Timidinei în celulele

PBL, ceea ce indică că efectul agonistic al lui mAbs BAT depinde de proprietăți specifice ale legării. De exemplu, mAb al izotipului IgG1, care a fost indus în laboratorul nostru contra celulelor carcinomului ovarian, n-a cauzat acapararea [³H]Timidinei spre deosebire de mAbs BAT 1, 2, 3, 6, 7 și 9 care tot aparțineau clasei IgG1.

b. Citotoxicitatea indusă cu mAbs BAT la PBM umane.

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

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

Tabelul 3

Sporirea citotoxicității la PBM uman de către mAbs BAT

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

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

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

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

Tabelul 4

Inducerea citotoxicității la subpopulațiile limfocitelor umane cu mAbs BAT

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

Exemplul 4

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

Inducerea citotoxicității în PBM umane a fost studiată prin incubarea celulelor PBM cu mAb BAT în combinație cu IL-2. IL-2 a fost adăugat în concentrații suboptimale (1 U/mL) împreună cu concentrații ascendente de mAb BAT-2. Citotoxicitatea culturii împotriva liniilor celulelor tumorale K562 și HT29 a fost testată peste o săptămână. Astfel cum este arătat în tabelul 5 mai jos, concentrațiile mici de BAT-2 se asociază cu IL-2 în inducerea citotoxicității la celulele PBM împotriva ambelor tipuri de celule-țintă.

Anterior a fost depistat că Inf-a mărește expresia antigenilor de clasa MHC-1. Apoi a fost determinat că administrarea Inf-a potențază efectul antitumoral al BAT, care a fost condiționat de celulele citotoxice direcționate contra diverselor celule tumorale (care au MHC antigeni de clasa I).

Tabelul 5

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

BAT (mg/ml)	Eliberarea 51Cr specifică (%)	
	Celule-țintă	
	HT29	K562
	IL-2 (1 u/ml)	

	-	+	-	+
0	5.8±0.1	7.5±0.3	3.7±0.1	6.9±0.4
2	14.8±1.3	37.6±2.0	12.0±0.4	29.6±1.6
4	16.7±0.6	27.3±1.0	13.3±0.6	18.5±1.2
8	22.6±1.0	15.1±0.6	19.9±0.7	12.5±0.4

Exemplul 5

Efecte imunostimulatoare ale BAT-1 murin:

a. Studii *in vitro*

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

- (1) Creșterea proliferației splenocitelor *in vitro*, cum este măsurat prin încorporarea ³H-Timidinei (Tabelul 6);
- (2) Efectul stimulator sinergic al incubăției splenocitelor în combinarea BAT-1 și IL-2 (Tabelul 6);

Tabelul 6

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

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

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

Tabelul 7

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

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

În calitate de celule-țintă au fost folosite celulele melanomului B16. Relația efectori:țintă a fost 50:1.

Celulele-țintă tumorale murine, care au fost susceptibile la efectul citotoxic al splenocitelor activate de BAT-1, sunt: melanomul B16, carcinomul pulmonar Lewis (3LL), fibrosarcomul (MCA 105), carcinomul celulelor rinichiului (MR 28) și limfomul (YAC) (Tabelul 8).

Tabelul 8

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

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

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

b. Studii *in vivo*

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

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

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

Tabelul 9

Proliferarea și citotoxicitatea splenocitelor de la șoareci injectați cu mAb BAT

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

Șoarecii C57BL și BALB/c au fost injectați i.v. cu diferite concentrații de mAb BAT. Citotoxicitatea și încorporarea [³H]Timidinei au fost determinate peste 10 zile la splenocitele izolate. Splenocitele de la șoarecii C57BL au fost testate pe melanom B16, iar splenocitele de la șoarecii BALB/c au fost testate pe celulele MR-29 și YAC (relație efectori:țintă - 50:1). Fiecare lot conținea 6-16 șoareci în 3-4 experimente separate. Citotoxicitatea și încorporarea [³H]Timidinei au fost efectuate de trei ori la fiecare șoarece și a fost calculată media. Rezultatele sunt prezentate în formă de medie±eroare standard la n șoareci, P-rezultate sunt date pentru diferența între martor și animalele tratate cu BAT.

Exemplul 6

Efectul imunoterapeutic a lui BAT-1 împotriva tumorilor șoarecilor

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

a1. Înlăturarea metastazelor pulmonare ale melanomului B16 la șoarecii infectați folosind modelul metastazelor pulmonare rezistente

Șoarecii C57BL au fost infectați (i.v.) cu celulele melanomului B16 în cantitate de 50x10³ (Tabelul 10). Peste 24 de zile după injecție în plămâni s-au dezvoltat metastaze multiple (practic confluențe), vezi Fig. 7, rândul de sus.

Dar, la șoarecii, care peste două săptămâni după infectare au fost injectați cu BAT-1 (10 mg/murin), plămâni practic au fost fără metastaze ale melanomului B16.

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

Tabelul 10

Efectul antitumoral al mAbs BAT

Reducerea metastazelor pulmonare, indusă cu BAT

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

a. Tumorile au fost injectate la ziua 0.

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

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

d. Numărul șoarecilor.

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

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

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

Tabelul 11

Administrarea BAT în timp diferit relativ la infectarea cu melanomul B16

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

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

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

Condițiile experimentale au fost similare și sunt descrise la melanomul B16 (vezi mai sus), în afară de faptul că au fost injectate cu 2×10^3 de celule. În Fig. 9, în rândul de sus sunt arătați plămânii șoarecilor infectați cu 3LL cu metastaze multiple. Rândul de jos în Fig. 9 arată plămânii șoarecilor, la care după infectare a fost administrat tratamentul cu BAT-1, și care, cum se vede, sunt fără metastaze.

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

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

Exemplul 7

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

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

Exemplul 8

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

Splenocitele șoarecilor, tratați numai cu mAb BAT-1 sau în primul rând infectați cu celulele melanomului B16 și apoi tratați cu mAb BAT-1, au fost transferate la șoarecii recipienți. Șoarecii recipienți au fost infectați cu celulele tumorale ale melanomului B16 sau 3LL. Cum este arătat în tabelul 12 mai jos, transferarea adoptivă a splenocitelor de la șoareci imunizați cu BAT-1, s-a indus un regres al tumorilor la șoarecii recipienți. Tratamentul cel mai eficient a fost obținut la transplantarea a 10^3 splenocite de la șoarecii infectați cu celulele melanomului B16 și peste 14 zile

injecțai cu BAT-1 la șoarecii-recipienti cu tumori. Cum se vede în tabelul 12, în acest caz, a fost obținută eliminarea completă a celulelor melanomului B16 și un regres considerabil al tumorii 3LL, care se manifestă în numărul metastazelor și în greutatea plămânilor.

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

Tabelul 12

Regresul tumorii induse prin transferarea adoptivă (a)

Grupa donatorului	Șoareci infectați cu tumoare (recipienti)					
	B16			3LL		
	Nr. splenocitelor transferate					
	10 ⁷		10 ⁸		10 ⁷	
Nr. Metas.	Greut. plăm.	Nr. Metas.	Greut. plăm.	Nr. Metas.	Greut. plăm.	
A. netrați	>250	1.09±0.9 (e)	>250	1.12±0.04	>250	1.12±0.04
B. tratați cu BAT (b)	89±10 (d)	0.67±0.04	28±4.3	0.41±0.19	134±15	0.41±0.19
C. injecțai cu B16 și tratați cu BAT (c)	4±4	0.32±0.01	0±0.0	0.31±0.01	3.6±2.9	0.31±0.01

- Splenocitele de la trei grupe de șoareci (A, B, C) au fost injectate i.v. la șoarecii-recipienti peste 14 zile după infectare.
- Splenocitele au fost transferate de la șoareci peste 20 zile după injecție i.v. cu BAT (10 mg/șoarece).
- Item (b), dar șoarecii au fost infectați cu melanom B16 14 zile înainte de administrarea de BAT.
- Numărul mediu al metastazelor pulmonare ±SD de la trei șoareci.
- Cantitatea medie a greutații plămânilor (g) ±SD de la trei șoareci.