

(19)



(10)

**LT 4225 B**

(12)

## **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **4225**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C07K 16/28**

(21) Paraiškos numeris: **96-115**

**C12N 5/20**

**A61K 39/395**

**C07K 14/705**

(22) Paraiškos padavimo data: **1996 07 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 05 26**

(45) Patent paskelbimo data: **1997 10 27**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US95/01137**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 01 30**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1996 07 30**

(31, 32, 33) Prioritetas: **108501, 1994 01 31, IL**

(72) Išradėjas:

**Britta Hardy, IL**

**Avraham Novogrodsky, IL**

(73) Patent savininkas:

**MOR RESEARCH APPLICATIONS LTD, 11 Ben Gurion Street, 51905 Givat Shmuel, IL**

(74) Patentinis patikėtinis:

**Tania Sterlina, 37, Patentinių paslaugų agentūra "Intels",  
Naugarduko g. 34-213, 2600 Vilnius, LT**

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

**1-1397, Collection Nationale de Culture de Microorganismes Institut  
Pasteur, FR**

(54) Pavadinimas:

**Imunostimuliuojantys monokloniniai antikūnai**

(57) Referatas:

Monokloniniai antikūnai, pasižymintys imunostimuliuojančiu poveikiu, specifiskai rišasi prie B limfoblastoidinių ląstelių ir sukelia periferinių kraujo limfocitų proliferaciją bei aktyvaciją. Juos sušvirškus laboratoriniams gyvūnams, pastebimas priešvėžinis efektas.

## IŠRADIMO SRITIS

Pagrindinė šio išradimo sritis yra imunoterapija, būtent monokloniniai antikūnai, tokios terapijos rėmuose naudojami daugeliui ligų, pvz., vėžiui gydyti.

## PATIRTIS ŠIOJE SRITYJE ir IŠRADIMO PAGRINDAS

Įvairios vėžio formos yra svarbiausia žmonių mirties priežastis. Viena trečioji JAV gyventojų suserga vėžiu, o 20 % miršta nuo vėžio (494 000 individų per 1988).

Labiausiai paplitę vėžio gydymo būdai yra chirurgija, švitinimas bei chemoterapija. Pastaraisiais metais buvo pasiūlytas kitas gydymo būdas, pagrįstas biologinio atsako modifikatorių (BAM) naudojimu. Dažniausiai naudojami BAM yra citokinai (pvz.: interleukinas 2 (IL-2) ir  $\alpha$ -interferonas ( $\alpha$ -IFN)), aktyvuotos vienbranduolės ląstelės (pvz.: limfokinais aktyvuotos kilerinės ("žudikės") ląstelės (LAK) bei antikūnai. BAM tiesiogiai veikia auglius ir netiesiogiai stiprina nespecifinius ar specifinius imunologinius bei citotoksinius mechanizmus.

Kol kas BAM naudojimas nedavė jokio realaus klinikinio efekto, svarbiausia to priežastis yra jų toksiškumas bei sukeliami pašaliniai reiškiniai. Buvo išbandyta ir aktyvi imunizacija prieš vėžį, tačiau šis metodas taip pat pasirodė esąs neaktyvus. Kai kurie monokloniniai antikūnai (mAk) yra tinkami vėžio diagnostikai bei gydymui, tačiau lig šiol nėra įrodymų, kad nors vieni mAk būtų efektyvūs standartinės vėžio gydymo procedūros rėmuose.

Nustatyta, kad įvairūs mAk, gebantys susirišti su determinantėmis, esančiomis ant T-ląstelių paviršiaus, sukelia šių ląstelių proliferaciją, aktyvaciją bei diferenciaciją (Clark, E.A. and Ledbetter, J.A., Amplification of the immune response by agonistic antibodies, *Immunol., Today*, 7:267-270, 1986.). Buvo pastebėta, kad mAk, prisirišantys prie CD3/TCR komplekso ant T-ląstelių (Meuer, S.C., Huspey, R.E., Cantrell, D.A., Hodgdon, J.C., Schlornman, S.F.,

Smith, K.A. and Reinberg, E.L., Triggering of the T3-T1 antigen-receptor complex results in clonal T cell proliferation through an interleukin-2 dependent autocrine pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **31**:1509-1513, 1984., Van Wauve, J.P., De Mey, J.R. and Gooser, J.G., OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody and potent mitogenic properties, *J. Immunol.*, **124**:2708-2713, 1980., Jung, G., Martin, D.E. and Muller-Eberhard, J.H., Induction of cytotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells by monoclonal antibody OKT3, *J. Immunol.*, **139**:639-644, 1987.) paviršiaus, bei mAk, prisirišantys prie CD2 (Van Lier, R., Blocmena, E., Brouwer, M., Van Heijm, J., Weinreich, S. and Aarden, L., Studies on monocyte dependence on T-cell proliferation induced by monoclonal antibodies directed against region I and II of CD2 antigen, *Immunology*, **67**:333-338, 1989.) antigeno receptoriaus ant T-ląstelių, o taip pat abiejų rūšių aukščiau paminėtų antikūnų prisirišimas prie T-ląstelių sukelia T-ląstelių proliferaciją, IL-2 receptoriaus ekspresiją ir IL-2 sintezę T-ląstelėse, skatinančią citolitinį procesą. Buvo parodyta, kad CD3 mAk sužadina priešvėžinį aktyvumą *in vivo* gyvūnų modelyje (Ellenhorn, J.D., Hirsch, R., Schreiber, H. and Bluestone, J.A., *In vivo* administration of an anti-CD3 prevents malignant progressor tumor growth, *Science* (Washington DC), **242**:569-571, 1988., Gallinger, S., Hoskins, D.W., Mullen, J.B.M., Wong, A.H.C. and Roder, J.C., Comparison of cellular immunotherapies and anti-CD3 in the treatment of MCA-38-LD experimental hepatic metastases in C57BL/6 mice, *Cancer Res.*, **50**:2476-2480, 1990)

Yra paskelbta apie įvairius kitus antikūnus prieš T-limfocitų antigenus, kurie, susirišę su ląstelėmis, jas aktyvuoja, pvz.: mAk prieš CD5 (Van Lier, R., Blocmena, E., Brouwer, M., Van Heijm, J., Weinreich, S. and Aarden, L., Studies on monocyte dependence on T-cell proliferation induced by monoclonal antibodies directed against region I and II of CD2 antigen, *Immunology*, **67**:333-338, 1989.), prieš CD69 (Moretta, A., Goggi, A., Pende, D., Tripodi, G., Orengo, A., Pella, N., Augugliaro, R., Bottino, C., Ciccone, E. and Moretta, I., CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocyte expressing T cell receptor  $\alpha/\beta$ , *J. Exp. Med.*, **174**:1393-1398, 1991.), ir prieš CD28 (Van Lier, R.A., Brouwer, M. and Aarden, L.A., Signals involved in T-cell activation. T cell proliferation induced through the synergistic action of anti-CD28 and anti-CD2 monoclonal antibodies, *Eur. J. Immunol.*, **13**:167-172, 1988., Jenkins, M.K., Taylor, P.S., Norton, S.D.

and Urdahl, K.B., CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells, *J. Immunol.*, **147**:2461-2466, 1991).

Paskelbti duomenys apie tai, kad anti-CD28 mAk sulėtina pelių melanomos augimą, nors visiškai ir nepašalina šio tipo auglių (Townsend, S.E. and Allison, J.P., Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells, *Science* (Washington DC), **259**:368-370, 1993).

Žinoma, kad mAk prieš žmogaus B limfoblastoidinių ląstelių liniją, vadinama "Daudi", stimuliuoja pelės limfocitus ir žmogaus periferines T- ląsteles (Hardy, B., Dotan, D. and Novogrodsky, A., A monoclonal antibody to human B lymphoblastoid cells activates human and murine T lymphocytes, *Cell Immunol.*, **118**:22-29, 1989).

## BENDRAS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šio išradimo svarbiausias aspektas yra monokloniniai antikūnai, pasižymintys imunostimuliuojančiu poveikiu, gebantys prisirišti prie B limfoblastoidinių ląstelių ir sukeliantys periferinių kraujo limfocitų proliferaciją bei aktyvaciją; monokloniniai antikūnai, pasižymintys šiomis savybėmis sušvirkštus juos laboratoriniams gyvūnams, turintiems auglius, sužadina priešvėžinį efektą šiems gyvūnams.

Priešvėžinis efektas yra biologinis efektas, kuris gali pasireikšti kaip auglio apimties sumažėjimas, metastazių skaičiaus sumažėjimas, gyvenimo trukmės pailgėjimas arba daugelio fiziologinių simptomų, susijusių su vėžiniu susirgimu, susilpnėjimas. Be to, priešvėžiniu efektu galima laikyti ir mAk savybę sustabdyti pirminio auglio atsiradimą. Dėl savo savybių šio išradimo mAk gali būti naudojami tiek ūmaus vėžio gydymui, tiek ir vėžio profilaktikai.

Šio išradimo antikūnai gali būti paruošiami, imunizuojant gyvūnus imunogenu, kuris yra B limfoblastoidinės ląstelės, lizuotos B limfoblastoidinės ląstelės arba jų membraninis preparatas. Po imunizacijos atsiradus imuninei reakcijai imunizuotuose gyvūnuose, B- limfocitai yra išskiriami iš gyvūnų kraujo, ląstelių linijos auginamos ir selekcionuojamos taip, kad būtų gauta linija, išskirianti antikūnus, gebančius prisirišti prie imunogeno. Tokie mAk toliau selekcionuojami ir atrenkami tie, kurie sugeba sukelti periferinių kraujo limfocitų proliferaciją ir aktyvaciją.

Tam, kad būtų gauti šio išradimo mAk, antikūnai, atrinkti aukščiau aprašytu būdu, toliau selekcionuojami ir atrenkami tie, kurie pasižymi priešvėžiniu efektu. Tam, kad būtų atrinkti tokie antikūnai, kaip taisyklė, taikomas gyvūnų vėžio modelis. Kartais efektas gali būti tiriamas ir įvairiuose *in vitro* modeliuose. Toks modelis, pavyzdžiui, gali būti bet koks laboratorinis gyvūnas, kuriam buvo sukeltas vėžys. Ypač tinkami, konkrečiai parenkant peles žmonių gydymo tikslams, yra modeliai, kuriuose auginami žmogaus augliai. Pastarojo tipo gyvūnų modelių pavyzdžiai yra pelės su susilpnintu imunitetu, pvz., SCID pelės arba pelės su pašalinta čiobrialiauke, kurioms buvo išvirkštos ar implantuotos vėžinės ląstelės ar audinys, paimtas iš onkologinių pacientų. Tokioje selekcijoje mAk sugebėjimas sumažinti auglio dydį, pailginti gyvenimo trukmę ir t.t. yra nustatomas lyginant su kontrole (panašus gyvūnas, turintis auglį, nepaveiktas mAk arba paveiktas kitu mAk).

Šiuo selekcijos procesu taip pat tikrinamas mAk sugebėjimas užkirsti kelią auglio atsiradimui atitinkamame modelyje. Pavyzdžiui, mAk gali būti suleidžiamas gyvūnams, turintiems įgimtą polinkį vėžiniams susirgimams, ir tada auglio atsiradimas bei gyvūnų grupės, paveiktos mAk, išgyvenimo lygis yra lyginamas su kontroline grupe, kurios gyvūnams nebuvo suleisti antikūnai, o laikymo salygos buvo tos pačios. mAk sugebėjimas užkirsti kelią auglio atsiradimui dar sėkmingiau gali būti tikrinamas įvairiuose kituose gyvūnuose, neturinčiuose įgimto polinkio vėžiniams susirgimams, iš pradžių paveikus gyvūnus mAk, o po to suleidžiant piktybines ląsteles.

Tam, kad būtų pasiektas toks priešvėžinis efektas, gyvūnas turi būti paveiktas efektyviu šio išradimo mAk kiekiu. Terminą „*efektyvus kiekis*“ reikėtų suprasti kaip tokį mAk kiekį, kuris sukelia terapinį efektą. Efektyvus kiekis, kurio reikia galutiniam terapiniam efektui gauti gali priklausyti nuo daugelio veiksnių, tokių kaip, pavyzdžiui, auglio tipas ar paciento būklės sunkumas (t.y. vėžio stadija), o taip pat nuo to, ar mAk vartojamas kartu su kita medžiaga, kuri kartu su mAk veikia papildančiai ar sinergetiškai (apie tokį dvigubą vartojimą žr. toliau).

Imortalizuota ląstelių linija, išskirianti šio išradimo mAk, gali būti išgauta daugeliu *per se* žinomų būdų, tokių kaip suliejimas su imortalizuota ląstelių linija taip, kad būtų gauta hibridoma, transformuojant EBV, genetiškai keičiant ląstelių linijas, pvz.: CHO ląstelių liniją, kurią galima išgauti daugeliu *per se* žinomu būdų ir t.t. Apskritai, imortalizuotų ląstelių linijų, išskiriančių monokloninius antikūnus, išgavimas šiandien yra rutininė, profesionalams žinoma procedūra, todėl ją aprašyti šiame dokumente nėra tikslinga.

Kaip taisyklė, jei mAk ketinamas naudoti žmonėms gydyti, imunogenas yra žmogaus kilmės. Vis dėlto kartais stebimas tarp-rūšinis kryžminis atsakas, ir retkarčiais įmanoma žmonėms taikyti mAk, gautus imunizavus ne žmogaus kilmės imunogenu, o, pvz., primatų kilmės.

Šio išradimo antikūnai - tai visuma monokloninių antikūnų, kurie gali priklausyti IgG ir IgM klasėms, gali būti šių antikūnų Fab fragmentai, F(ab')<sub>2</sub> fragmentai, viengrandžiai antikūnai ir pan. Be to, ne žmogaus kilmės antikūnai, pvz.: pelės, gali būti "sužmoginami" įvairiais genų inžinerijos metodais ("sužmogintas" antikūnas yra toks antikūnas, kuriame didesnioji molekulės dalis yra pakeista žmogaus kilmės molekulės dalimis).

Antikūnai, gauti pagal šį išradimą ir tinkami daugeliui terapinių indikacijų, naudojami vėžiui gydyti, pasirenkant tinkamiausią šiame išradime pateiktą kompoziciją. Nustatyta, kad monokloniniai antikūnai, gauti pagal šį išradimą, yra aktyvūs, mažinant daugelio auglių tumorigeniškumą.

Būdinga hibridominė ląstelių linija, gauta pagal šį išradimą, buvo deponuota Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institute Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, 757224, Paryžiuje, Cedex 15, deponavimo Nr. I-1397, 1994 metų sausio 28 dieną. Šios linijos ląstelės čia ir toliau žymimos "BAT-1 ląstelės", o atitinkami monokloniniai antikūnai - "BAT-1 mAk".

Monokloninių antikūnų, charakterizuojamų kaip BAT-1 mAk, ir būtent pačių BAT-1 mAk, panaudojimas yra tinkamiausias šio išradimo įgyvendinimas.

BAT-1 monokloniniai antikūnai buvo atrinkti pagal jų savybę prisirišti prie Daudi žmogaus limfoblastoidinės linijos ląstelių. Nustatyta, kad BAT-1 mAk rišasi prie baltyminės medžiagos (toliau žymima "BAT-1 rišantis baltymas"), kurios molekulinė masė pagal SDS-PAGE yra 48-50K daltonų.

BAT-1 rišantis baltymas suformuoja kitą šio išradimo aspektą. BAT-1 rišantis baltymas gali būti išskirtas naudojant įvairias *per se* žinomas priemones ir šio išradimo mAk. Tada BAT-1 rišančiu baltymu gali būti imunizuojami gyvūnai, tam, kad būtų gauti šio išradimo antikūnai.

Šis išradimas taip pat apima ir farmacinę kompoziciją, kurios veiklioji medžiaga yra šio išradimo mAk efektyvus kiekis bei fiziologiškai suderintas nešiklis.

Kitas šio išradimo aspektas yra išrasti mAk, skirti panaudoti efektyviais kiekiais gydyti imuninės sistemos sutrikimus, o ypač vėžį. mAk vartojami įprastais parenteraliniais būdais,

pvz., intraveniniu būdu (i.v.), leidžiami į pilvo ertmę (i.p.) ar į raumenis (i.m.). Tirpikliu gali būti bet kas iš žinomų *per se*, pvz.: NaCl tirpalas arba bet kuris kitas tinkamas fiziologinis tirpalas.

Pastebėta (kaip jau buvo minėta anksčiau), kad šio išradimo mAk yra aktyvūs, mažinant daugelio auglių tumorigeniškumą. Šio išradimo mAk efektyvumas, mažinant tumorigeniškumą, siejasi su jų sugebėjimu sužadinti citotoksinį limfocitų aktyvumą. Tam, kad būtų palaikytas šis aktyvumas, kartais palanku vartoti šio išradimo mAk kartu su kitais preparatais, kurie gali papildyti vienas kito veikimą ar veikti sinergetiškai. Kaip pavyzdį galima paminėti įvairius citokinus, tokius kaip IL-1 (interleukinas-1), IL-2, IL-6 ir  $\alpha$ -IFN ( $\alpha$ -interferonas).

Šio išradimo mAk gali būti naudingi ir kitoms, nevėžinėms, ligoms gydyti, kur aktyvacija ar kiti mAk poveikiai imuninės sistemos citotoksiniui aktyvumui gali turėti terapinį efektą. Tokios ligos, pavyzdžiui, gali būti ankstyvos ŽIV (virusas, sukeliantis įgytą imunodeficitą - AIDS) infekcijos stadijos, įvairūs autoimuniniai susirgimai ar kai kurie įgimto ar įgyto imunodeficitą atvejai.

Gydant vėžį, šie antikūnai gali būti naudojami vienu iš dviejų atvejų: diagnozavus pirminį ar antrinį auglį arba profilaktikos tikslais, kai yra didelė auglio atsiradimo rizika, pavyzdžiui, individams, patyrusiems apšvitinimą ar turintiems įgimtą polinkį. ŽIV infekuotiems asmenims šie mAk gali būti taikomi, kai dar nėra jokių ligos požymių, o taip pat ir ankstyvose ŽIV infekcijos proceso stadijose.

Toliau šis išradimas bus iliustruojamas įvairiais pavyzdžiais, aprašančiais eksperimentus, kurie demonstruoja priešvėžinį gydomąjį poveikį. Suprantama, pavyzdžiai pateikiami tiksliai iliustravimo tikslais ir jokių būdu nėra vieninteliai.

## TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Fig.1 rodo BAT monokloninių antikūnų (mAk) prisirišimo prie išgrynintų žmogaus T-limfocitų pratekančios citometrinės analizės rezultatus. BAT antikūnų prisirišimas buvo įvertintas antriniais antikūnais, žymėtais fluorescensine žyme - FITC-žymėti ožkos antikūnai prieš pelės antikūnus.

Fig.1a - fono reikšmė be BAT antikūnų;

Fig.1b - antikūnai prieš CD3;

Fig.1c - BAT-1;

Fig.1d - BAT-5;

Fig.1e - BAT-2;

Fig.1f - BAT-4;

Fig.2 rodo žmogaus periferinio kraujo monocitų (PKM) (kairioji plokštelė) ir Jurkat T ląstelių (dešinioji plokštelė), dvigubos žymės pratekančios citometrinės analizės rezultatus, kur pirminiai antikūnai yra arba BAT mAk, arba anti CD3 mAk, o antriniai antikūnai - FITC-konjuguoti ožkos antikūnai prieš pelės IgG.

Fig.2 A - neatskirtos ląstelės;

Fig.2 A(a) - PKM ląstelės, padengtos BAT mAk;

Fig.2 A(b) - PKM ląstelės, paveiktos anti-CD3 mAk;

Fig.2 A(c) - Jurkat T ląstelės, paveiktos BAT mAk;

Fig.2 A(d) - Jurkat T ląstelės, paveiktos anti-CD3;

Fig.2 B - atskirtos ląstelės;

Fig.2 B(a) - PKM ląstelės, suskirstytos į smulkias (R1) ir dideles (R2) ląsteles

Fig.2 B(b) - (R1) ląstelės, paveiktos BAT mAk;

Fig.2 B(c) - (R1) ląstelės, paveiktos anti-CD3 mAk;

Fig.2 B(d) - (R2) ląstelės, paveiktos BAT mAk;

Fig.2 B(e) - (R2) ląstelės, paveiktos anti-CD3.

Fig.3 rodo BAT surišančio baltymo paviršiaus ekspresijos ir CD3 ekspresijos ant žmogaus PKM dvigubai žymėtais antikūnais pratekančios citometrinės analizės rezultatus, kur BAT mAk žymėti FITC, o antikūnai prieš CD3 žymėti PE.

Fig.3 A - neatskirtos;

Fig.3 A(a) - Becton-Dikinson vienalaikė neigiama kontrolė;

Fig.3 A(b) - PE-antiCD3;

Fig.3 A(c) - FITC- BAT mAk;

Fig.3 A(d) - dvigubas žymėjimas FITC- BAT mAk ir PE-antiCD3;

Fig.3 B - atskirtos ląstelės;

Fig.3 B(a) PKM ląstelės, suskirstytos į smulkias (R1) ir dideles (R2) ląsteles;

Fig.3 B(b) (R1) ląstelės dvigubai žymėtos FITC- BAT mAk ir PE-antiCD3;

Fig.3 B(c) (R2) ląstelės dvigubai žymėtos FITC- BAT mAk ir PE-antiCD3;

Fig.4 rodo BAT-1 antikūnų prisirišimo prie įvairių Daudi ląstelių lizatų Western Blot analizę.

Fig.4(1) - Daudi ląstelių lizatai;

Fig.4(2) - lizatai paveikti neuraminidaze (0.2 v/ml);

Fig.4(3) - lizatai paveikti neuraminidaze (0.4 v/ml);

Fig.4(4) - lizatai paveikti Endo Hf (100 v/μg).

Fig.5 [<sup>3</sup>H]timidino įsijungimo į ląsteles, kurios buvo kultivuojamos šešias dienas, esant didėjančioms BAT mAk koncentracijoms, grafinis vaizdas: BAT-1 (- ▲ -), BAT-2 (- X -), BAT-3 (- • -), BAT-5 (- \* -), BAT-6 (- ↓ -), BAT-7 (- ■ -).

Fig.6 yra grafinis vaizdas eksperimento, kuriame citotoksinio aktyvumo indukcija buvo tirama PKM ląstelės, kurios buvo kultivuojamos su 2.5 μg/ml BAT mAk įvairius laiko intervalus. HT-29 (kairėje) ar RC 29 (dešinėje) ląstelės buvo parinktos kaip ląstelės taikiniai. Efektorių ir taikinių santykis buvo 20:1. Kontrolė (- 0 -), BAT-1 (- • -), BAT-2 (- X -), BAT-3 (- ▲ -).

Fig.7 rodo C57BL pelių, kurioms buvo suleistos B-16 melanomos ląstelės, plaučius: viršutinė eilė rodo pelių, kurioms buvo suleistos tik šios ląstelės, plaučius po 24 dienų; apatinė eilė rodo pelių, kurioms buvo suleistos B-16 melanomos ląstelės, o praėjus 14 dienų į veną suleista 10 μg f BAT-1 mAk, plaučius.

Fig.8 Eksperimentų, pademonstruotų Fig.7, grafinė santrauka, rodanti metastazių skaičių plaučiuose pelių, kurioms buvo suleista B-16 melanomos ląstelės, 3LL Lewis plaučių karcinomos ląstelės ar MCA 105 fibrosarkomos ląstelės, praėjus vienam mėnesiui. Rezultatai apibendrina 3-4 eksperimentus, atliktus su kiekviena iš auglių rūšių. 10 μg/pelei BAT-1 doze paveiktos (+) ar nepaveiktos (-) pelės, praėjus 2 savaitėms po vėžinių ląstelių suleidimo. Metastazė (•), nėra metastazių (0).

Fig.9 rodo pelių, kurioms buvo suleista 3LL Lewis plaučių karcinomos ląstelės, plaučius. Panašiai kaip ir Fig. 7, viršutinė eilė rodo pelių, kurioms buvo suleistos tik vėžinės ląstelės, o

apatinė eilė rodo pelių, kurioms praėjus 14 dienų į veną suleista 10 µg f BAT-1 mAk, plaučius.

Fig.10 rodo panašų į Fig. 9 parodytą eksperimentą, kur naudojamos vėžinės ląstelės yra MCA 105 fibroblastomos ląstelės.

## MEDŽIAGOS IR METODAI

### Monokloninių antikūnų gamyba

BALB/c pelės buvo imunizuotos membraniniu Daudi ląstelių preparatu. Daudi ląstelių membranos buvo paruoštos hipotoninio glicerolio šoko metodu (Jett, M., Seed, T.M., and Jamieson, G.A., *J.Biol.Chem.*, 252:2134, (1977)). Ant  $50-80 \times 10^6$  ląstelių, suspenduotų FBT ir inkubuotų, esant 37°C, buvo palaipsniui užsluoksniuotas 30 % glicerolis. Po 5 minučių inkubacijos ant ledo ląstelės buvo centrifuguojamos ir resuspenduojamos šaltame Tris lizuojančiame buferyje (10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4), maišomos 5 min., esant 4°C ir centrifuguojamos, esant 700 g. Supernatantas pašalinamas ir centrifuguojama, esant 3300 g (10 min., 4°C). Nuosėdos dar kartą praplaunamos, ir du supernatantai, turintys membraninę frakciją, suliejami į vieną. 260 µl membraninio preparato (3 mg/ml) emulguojami 260 µl pilno Freund'o adjuvanto ir sušvirkščiami BALB/c pelėms į pilvo ertmę. Po trijų savaičių pelių blužnis buvo išoperuotas. Splenocitai buvo sumaišyti su mielomos ląstelių linija NS-0 santykiu 10:1. Sumaišymui buvo naudojamas polietilenglikolis, ir šios hibridomos buvo auginamos selektyvioje terpėje pagal Kohler and Milstein (Kohler, G., and Milstein, C., *Nature*, (London) 256:495. (1975)).

Imobilizuotų ląstelių imunofermentinė analizė (IFA) ant Daudi ląstelių buvo taikoma augančių hibridomų supernatantų aktyvumui įvertinti (Glassy, M.C. and Surh, C.D., *J. Immunol. Method*, 81:115 (1985)). Teigiami hibridomų supernatantai toliau buvo selekcionuojami pagal jų sugebėjimą sužadinti žmogaus PKM proliferaciją, analizuojami pagal [<sup>3</sup>H]. Teigiami klonai buvo perklonuoti, naudojant ribinio praskiedimo metodą, pakartotinai patikrinti ir auginami.

Iš augimo terpės mAk buvo išskirti, išsodinant 50% amonio sulfate ir dializuojant FBT. Toliau gryninama afininės chromatografijos būdu, naudojant sefrozės kolonėlę, padengtą antikūnais prieš pelių imunoglobulinus.

#### Augimo terpė

Visos ląstelės buvo suspenduotos RPMI 1640 terpėje, papildytoje 10 % veršelio embriono serumu (VES), Na-piruvatu (1.1 mg/ml), L-glutaminu (0.3 mg/ml) ir antibiotikais (200 v/ml penicilino ir 10 µg/ml) ir inkubuojama drėgname inkubatoriuje, esant 5 % anglirūgšties.

IL-2 aktyvumas išreikštas Cetus vienetais (1 Cetus vienetas lygus 3 tarptautiniams vienetais).

#### Ląstelių paruošimas

Žmogaus periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės (PKVL) buvo gautos iš sveikų suaugusių donorų kraujo, centrifuguojant fikolio-hypaque tankio gradiente (Histopaque, Sigma). PKVL nuo monocitų buvo atskirtos naudojant Sephadex G10 kolonėles. T-ląstelės buvo atskirtos SRBC rozečių metodu. CD3-teigiamų ir Leu 19 teigiamų ląstelių išskyrimas buvo atliktas naudojant imunomagnetinę techniką. PKVL kultūra, 5-6 dienas inkubuota su BAT mAk ar kontrole, buvo plaunama FBT tris kartus. Į ląsteles pilnoje RPMI terpėje įdedami nekonjuguoti antikūnai prieš CD3 arba Leu19 (CD56) ir inkubuojami vieną valandą, esant 4° C. Įmagnetintos dalelės, padengtos antikūnais prieš pelės imunoglobulinus, įdedamos 30 min. Prie dalelių prilipusios ląstelės pašalinamos magnetu, ir toliau analizuojamas neprilipusių ląstelių citotoksinis aktyvumas ir dažoma pratekančios citometrijos metodais.

#### Citotoksiškumo analizė

Citotoksiškumo analizė atliekama pagal toliau pateiktą schemą:  $2-4 \times 10^6$  ląstelių-taikinių sumaišoma su 200 µCi  $^{51}\text{Cr}$ -chromato vienai valandai terpėje be serumo. Jos

plaunamos tris kartus pilna terpe ir galiausiai resuspenduojamos RPMI-10% FCS, tada išsėjama po  $10^4$  ląstelių į šulinėlį. Ląstelės-efektoriai yra kultivuojamos, limfocitai, gauti iš normalaus periferinio kraujo, inkubuojami įvairius laiko tarpus su skirtingais mAk, izotipinė kontrolė atliekama su IgG ir IL-2. Prieš analizę ląstelės plaunamos tris kartus RPMI terpe, gyvybingumui tikrinti jos dažomos 1% tripano mėliu, sumaišomos su ląstelėmis-taikiniais įvairiais efektoriaus/taikinio santykiais apvaliadugnėse mikrotitravimo plokštelėse ir inkubuojamos 3 valandas, esant  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ . Terpės supernatantai buvo atskirti ir nustatytas jų aktyvumas  $\beta$ -scinciliatoriniu skaitikliu. Maksimalus izotopų atsiskyrimas (MA) gaunamas inkubuojant ląsteles-taikinius su tritonu x-100. Spontaninis atsiskyrimas (SA) yra matuojamas inkubuojant taikinius tik su terpe. Ląstelių lizavimo procentas apskaičiuojamas pagal  $(\text{EA}-\text{SA}/\text{MA}-\text{SA})\times 100$ , kur EA yra eksperimentinis atsiskyrimas nuo efektorių.

Citotoksiškumo sužadinimas žmogaus limfocitų subpopuliacijoje

PKM ląstelės ( $4\times 10^6/\text{ml}$ ) buvo kultivuojamos 6 dienas kartu su BAT mAk. Po to ląstelės plaunamos tris kartus ir, naudojant įmagnetintas daleles, padengtas antikūnais prieš pelės  $\text{F(ab')}_2$ , atskiriamos CD3 ir Leu19 ląstelės ir tikrinamas citotoksiškumas prieš K562 ir Daudi ląsteles.

Pratekančioji citometrija

Ląstelės paviršiaus antigenai buvo nustatyti pratekančiosios citometrijos būdu, naudojant FACS 440 (Becton-Dickinson). Kiekvienai analizei imama  $10^6$  ląstelių. Ląstelės buvo dažomos, po to inkubuojamos, esant optimalioms pelės mAk prieš žmogaus CD3, IL-2 receptorių ar gautų mAk BAT 1-9 koncentracijoms. Šiame netiesioginiame dažyme ožkos antikūnai prieš pelės  $\text{F(ab')}_2$  konjuguoti su FITC buvo naudojami kaip antriniai antikūnai. Visos inkubacijos buvo atliktos FBT, pH 7.4, kuriame buvo 1% BSA ir 0.5% Na-azido, esant  $4^{\circ}\text{C}$ , inkubacijos trukmė - 30 min., po to plaunama tris kartus tuo pačiu buferiniu tirpalu. Analizuojama  $10^4$  nudažytų ląstelių.

### BAT mAk surišančių determinančių nustatymas

BAT mAk surišančių determinančių nustatymas ant Daudi B limfoblastoidinių ląstelių lizatų buvo atliktas naudojant Western Blot techniką. Trumpai tariant,  $50 \times 10^6$  ląstelių/ml, suspenduotų FBT, buvo laipsniškai užsluoksniuotos 30% gliceroliu, membranos atskirtos centrifuguojant.

Membraninių preparatų pavyzdžiai buvo atskirti SDS-PAGE (12%) ir perkelti ant nitroceliuliozės blotų, kurie buvo pamerkti į FBT su 1% nuriebinu pienu. BAT mAk surišančio baltymo nustatymas ant nitroceliuliozės blotų buvo atliktas, inkubuojant šiuos blotus su BAT mAk dvi valandas kambario temperatūroje, po to 30 min. inkubuojama su krienų peroksidaze konjuguotais antikūnais 70 prieš pelės IgG (Fab')<sub>2</sub>. Tada ląstelės buvo nuplaautos, o juostos išryškintos O-dianizidino substratu.

### Pelės auglio modelis

Eksperimente buvo naudojami trijų tipų pelių auglių modeliai: B-16 melanoma, Lewis plaučių karcinoma (3LL) ir metilcholantrenu sukelta fibrosarkoma (MCA 105). C57BL pelėms (8 savaičių amžiaus) į veną suleista  $50-200 \times 10^6$  ląstelių. Po dviejų savaičių buvo suleista 1-10 µg/pelei (i.v.) BAT-1, po 10 dienų pelės buvo išskrostos ir suskaičiuotos plaučių metastazės.

### PAVYZDŽIAI

#### 1 pavyzdys

##### a. Surišimo charakteristikos

Devyni monokloniniai antikūnai (mAk), pažymėti BAT 1-9 ir gauti imunizuojant B limfoblastoidinėmis ląstelėmis, buvo selekcionuojami, pirmiausia, pagal sugebėjimą prisirišti prie Daudi ląstelių, o paskui - pagal sugebėjimą indukuoti žmogaus periferinio kraujo limfocitų proliferaciją. Šie BAT mAk izotipai buvo nustatyti dviem būdais: IFA ir

Ochterlony metodu. Nustatyta, kad BAT1,2,3,6,7 ir 9 priklauso IgG1 klasei, tuo tarpu BAT 4 ir 5 priklauso IgM klasei. BAT8 buvo IgG2a.

Šių mAk prisirišimas prie išgrynintų periferinių žmogaus T ląstelių buvo išanalizuotas FACS, naudojant netiesioginį imunofluorescensinį dažymą. 1 pav. rodo tokio eksperimento FACS analizės rezultatus. Kaip matyti, BAT mAk rišasi prie periferinio kraujo CD3+ T ląstelių. Surišimo laipsnis svyravo nuo 44% BAT-2, 38% - BAT-5, 32% - BAT-1 iki šiek tiek silpnesnio surišimo - 13% - BAT-4. Išgryninti tų pačių donorų periferinio kraujo limfocitai nesuriša šių mAk (duomenys nepateikiami).

#### b. BAT mAk prisirišimas prie žmogaus limfocitų subpopuliacijos

Kaip matyti Fig. 2, tolesnė FASC analizė parodė, kad BAT-1 rišasi prie žmogaus PKM CD3+, o taip ir prie Jurkat T-ląstelių. Atradimas, kad BAT-1 rišasi prie PKM CD3+ ląstelių, buvo patvirtintas tolesne dvigubai žymėtų ląstelių FASC analize ( Fig.3 ).

Kaip parodyta 1 lentelėje, BAT-1 rišasi ne tik prie CD3 turinčių ląstelių, bet ir prie Leu 19/NK ląstelių.

1 lentelė

BAT-1 mAk susirišimas su žmogaus limfocitų subpopuliacijomis

|        | Teigiamos ląstelės (%)                  |             |
|--------|-----------------------------------------|-------------|
|        | Ląstelių subpopuliacijos praturtintos : |             |
| mAk    | CD3+                                    | Leu 19+     |
| CD3    | 66.4 (100%)                             | -           |
| Leu 19 | -                                       | 59.5 (100%) |
| BAT-1  | 19.8 (30%)                              | 42.2 (70%)  |

#### BAT-1 mAk susirišimas su įvairiais ląstelių tipais

Buvo ištirtas BAT-1 mAk susirišimas su įvairiais ląstelių tipais. Kaip parodyta 2 lentelėje, be PBL, Daudi ir Jurkat T-ląstelių linijos BAT-1 mAk rišasi prie K562, eritroleukemijos ląstelių linijos, MCF7, žmogaus krūties karcinomos ląstelių linijos. Surišimo laipsnis svyruoja tarp BAT mAk ir tirtų ląstelių tipų, prie pelės inkstų karcinomos

(MR28) mAk 2-9 rišasi tik labai silpnai. BAT-8 rišasi prie MEL (pelės eritroleukemija) labai silpnai.

## 2 lentelė

BAT-1 mAk susirišimas su įvairiais ląstelių tipais

| Ląstelės | BAT mAk |    |     |     |   |     |
|----------|---------|----|-----|-----|---|-----|
|          | 1       | 2  | 4   | 5   | 8 | 9   |
| Žmogaus  |         |    |     |     |   |     |
| Daudi    | +++     | ++ | ++  | +++ | ± | +++ |
| Jurkat   | +       | ±  | +++ | +++ | - | +++ |
| PBL      | +++     | ±  | +   | +   | ± | ±   |
| K562     | +++     | +  | +++ | +++ | ± | +++ |
| MCF7     | ±       | ++ | +++ | +++ | + | +++ |
| Pelės    |         |    |     |     |   |     |
| MR28     | -       | ±  | +   | +   | ± | ±   |
| MEL      | -       | -  | -   | -   | ± | -   |

Susirišimas nustatytas IFA metodu ir pažymėtas:

+ (0.1-0.2 OT)

++ (0.2-0.3 OT)

+++ (daugiau už 0.3 OT)

## 2 pavyzdys

BAT mAk surišančios vietos analizė ir BAT-1 surišančio baltymo gryninimas

Tam, kad būtų nustatytas membraninio baltymo, sąveikaujančio su BAT-1 mAk, molekulinė masė, membraninis Daudi ląstelių preparatas buvo ištirpintas ir baltymas atskirtas SDS-PAGE. Perkelti nitroceliuliozės blotai buvo inkubuojami su BAT-1 mAk, po to inkubuojami su antikūnais prieš pelės IgG (Fab')<sub>2</sub> konjuguotais su krienų peroksidaze ir išryškinti O-dianizidino substratu. Nustatyta, kad BAT-1 rišančio baltymo molekulinė masė yra apie 48-50KDa (Fig.4 )

BAT mAk rišantis baltymas buvo išgrynintas naudojant BAT mAk konjugatą su sefaroze. Šis surišantis baltymas taip pat gali būti gautas, klonuojant molekulinės biologijos metodais. BAT-1 taikymas pelėms *in vivo* sužadino BAT antikūnų atsiradimą.

### 3 pavyzdys

#### Funkcinė BAT mAk charakteristika

##### a. BAT mAk sužadintas timidino įsijungimas

Žmogaus periferinio kraujo ląstelės buvo kultivuojamos 6 dienas, esant didėjančioms BAT mAk koncentracijoms, ir paveiktos [ $^3\text{H}$ ]timidinu 20 valandų prieš surinkimą.

Kaip matyti Fig.5, laipsniškas BAT mAk koncentracijos didinimas, nors ir nelabai stipriai, bet statistškai patikimai padidino [ $^3\text{H}$ ]timidino įsijungimą į PKM ląsteles. Vis dėlto, didelė antikūnų dozė susilpnino pasisavinimą. Kontroliniuose eksperimentuose pagal izotipą suporuoti antikūnai nepadidino [ $^3\text{H}$ ]timidino kiekio PBL ląstelėse. Tai rodo, kad agonistinis BAT mAk efektas priklausė nuo jų surišimo specifinių savybių. Pavyzdžiui, mūsų laboratorijoje paruoštas IgG1 izotipo mAk prieš kiaušidžių karcinomos ląsteles nesukėlė [ $^3\text{H}$ ]timidino pasisavinimo padidėjimo, skirtingai nuo BAT 1,2,3,6,7 ir 9 mAk, kurie irgi priklauso IgG1 klasei.

##### b. BAT mAk sužadina žmogaus PKM citotoksiškumą

Buvo tikrinamas žmogaus periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių kultūros, inkubuotos su BAT mAk įvairius laiko periodus, sugebėjimas lizuoti auglių ląstelių linijas.

Kaip matyti iš 3 lentelės, žmogaus PKM ląstelės vieną savaitę inkubuotos su BAT mAk buvo citotoksiškos K562, žmogaus eritroleukemijos (NK jautrios) ir RC-29, inkstų karcinomos ląstelių linijoms (NK atsparios).

Buvo tiriama citotoksinio žmogaus PKM, stimuliuotų BAT mAk, aktyvumo kinetika. Kaip parodyta Fig.6, maksimalus citotoksiškumas žmogaus storosios žarnos karcinomai (HT-29) ir inkstų ląstelių karcinomai (RC-29) buvo pasiektas 7 dienas žmogaus PKM inkubavus su BAT mAk.

3 lentelė

BAT mAk sužadina žmogaus PKM citotoksiškumą

| mAk           | Specifinis $^{51}\text{Cr}$ išskyrimas (%) |       |
|---------------|--------------------------------------------|-------|
|               | K562                                       | RC-29 |
| Nėra          | 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  |
| IL2 1000 u/ml | 57.6                                       | 36.9  |

\*Ląstelių taikinių lizavimo procentas, kai efektoriaus/taikinio santykis yra 5:1.

#### Limfocitų subpopuliacijos, jautrios BAT-sužadintam citotoksiškumui, charakteristika

Tam, kad būtų išaiškinta ar BAT mAk sukeltas žmogaus PKM citotoksinių aktyvumo sustiprėjimas priklauso nuo NK ląstelių aktyvacijos, T ląstelių aktyvacijos ar abiejų kartu, NK ir T ląstelės buvo išgrynintos ir nustatytas BAT mAk sąlygojamas jų citotoksiškumas. NK ir T ląstelių gryninimui Leu 19 ir CD3 monokloniniai antikūnai buvo inkubuojami su žmogaus PKM ląstelėmis, po to - su magnetinėmis dalelėmis, padengtomis antikūnais prieš pelės IgG. Tai leido identifikuoti ląstelių subpopuliacijas, susirišančias su tam tikrais antikūnais. Kaip matyti toliau pateiktoje 4 lentelėje, lizavimo vienetų skaičius išaugo ir CD3, ir Leu19 atskirtose ląstelių kultūrose. BAT 6 ir 8 buvo naudojami šiuose eksperimentuose, taikiniai buvo žmogaus eritroleukemijos (K562) ir žmogaus limfomos (Daudi) ląstelės.

4 lentelė

BAT mAk sužadina citotoksiškumą žmogaus limfocitų subpopuliacijose

|          | Lizavimo vienetai              |       |       |       |
|----------|--------------------------------|-------|-------|-------|
|          | ląstelės-taikiniai             |       |       |       |
|          | K562                           |       | Daudi |       |
|          | atskirtos ląstelės- efektoriai |       |       |       |
|          | CD3                            | Leu19 | CD3   | Leu19 |
| Kontrolė | 8                              | 4     | 10    | 3.8   |
| BAT6     | 25                             | 10    | 20    | 13    |
| BAT8     | 28                             | 12.5  | 26    | 20    |

4 pavyzdys

Sinergizmas tarp BAT mAk ir IL-2, sužadinant citotoksiškumą

Citotoksiškumo sužadinimas žmogaus PKM buvo tikrinamas, inkubuojant PKM ląsteles su BAT mAk ir IL-2 kombinacija. Suboptimali IL-2 koncentracija (1v/ml) buvo įdėta kartu su didėjančiomis BAT-2 mAk koncentracijomis. Citotoksiškumas buvo patikrintas po vienos savaitės K562 ir HT29 vėžinių ląstelių kultūrose. Kaip matyti iš 5 lentelės, nedidelės BAT-2 koncentracijos veikė sinergiškai su IL-2, sužadinant PKM ląstelių citotoksiškumą abiejų tipų ląstelėms-taikiniams.

Yra žinoma, kad  $\alpha$ -IFN stiprina MHC-1 klasės antigenų ekspresiją. Todėl  $\alpha$ -IFN taikymas turėtų skatinti priešvėžinį BAT efektą, kuris perduodamas per citotoksines ląsteles ir yra nukreiptas prieš įvairias auglių ląsteles (turinčias MHC klasės I antigeną).

Lentelė Nr.5

BAT-2 mAk ir IL2 sinergistinis citotoksiškumo indukcijos efektas žmogaus PKL

| BAT<br>(µg/ml) | Specifinis <sup>51</sup> Cr išskyrimas (%) |          |          |          |
|----------------|--------------------------------------------|----------|----------|----------|
|                | ląstelės-taikiniai                         |          |          |          |
|                | HT29                                       |          | K562     |          |
|                | IL-2 (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 | 12.1±0.4 | 29.6±1.6 |
| 4              | 16.7±0.6                                   | 27.3±1.0 | 13.3±0.6 | 18.5±1.2 |
| 8              | 22.0±1.0                                   | 15.1±0.6 | 19.9±0.7 | 12.5±0.4 |

5 pavyzdys

Imunostimuliacinis BAT-1 poveikis pelėms

a. In vitro tyrimai

BAT-1 mAk pasižymi stimuliuojančiomis savybėmis pelių splenocitų atžvilgiu, kurios panašios į žmogaus PKL. Tai yra:

- (i) padidinta splenocitų proliferacija *in vitro*, nustatoma pagal  $^3\text{H}$  timidino įsijungimą (6 Lentelė);
- (ii) sinergetinis stimuliuojantis poveikis, inkubuojant splenocitus su BAT-1 ir IL-2 kombinacija (6 Lentelė);

6 lentelė

| BAT-1<br>µg/ml | cpm [ $^3\text{H}$ ]Timidinas x $10^3$ |          |            |
|----------------|----------------------------------------|----------|------------|
|                | IL2                                    |          |            |
|                | -                                      | 1 U/ml   | 10 U/ml    |
| -              | 1.5±0.07                               | 16.0±0.9 | 67.5±1.6   |
| 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 |
| 0.001          | 10.5±0.1                               | 34.1±0.5 | 215.1±20.8 |
| 0.0001         | 2.6±0.1                                | 13.2±0.9 | 73.3±5.6   |

C57BL pelės splenocitai inkubuojami 5 dienas *in vitro* su įvairiomis BAT-1 koncentracijomis ir interleukinu 2 (1v ir 10 v per ml)

(iii) padidėjęs citotoksiškumas pelės splenocitų kultūrose su BAT-1 ir tolesnis citotoksiškumo didėjimas po inkubacijos su interleukinu 2 (7 Lentelė).

7 lentelė

| BAT-1<br>ng/ml | Specifinis $^{51}\text{Cr}$ išskyrimas (%) <sup>a</sup> |        |         |
|----------------|---------------------------------------------------------|--------|---------|
|                | Interleukinas-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    |

Citotoksiškumo indukcija C57BL pelių splenocitų kultūrose po 5 dienų inkubacijos *in vitro*, esant įvairioms BAT-1 koncentracijoms ir nedidelėms IL 2 dozėms.

<sup>a</sup> B16 melanomos ląstelės buvo naudojamos kaip taikiniai; efektorių ir ląstelių taikinių santykis - 50:1

Pelių auglių ląstelės-taikiniai, kurioms buvo priskiriamas kilerinis BAT-1 aktyvuotų splenocitų efektas, buvo šios: B16 melanoma, Lewis plaučių karcinoma (3LL), fibrosarkoma (MCA 105), inkstų ląstelių karcinoma (MR 28) ir limfoma (YAC) (8 Lentelė).

8 lentelė

BAT-1 sužadintas splenocitų citotoksiškumas prieš pelių auglių ląsteles  
(tyrimai *in vitro*)

| Pelių linija | Auglys-taikinys                  | Specifinis $^{51}\text{Cr}$ išskyrimas (%) <sup>a</sup> |      |
|--------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------|------|
|              |                                  | BAT-1                                                   |      |
|              | Ląstelės                         | -                                                       | +    |
| C57BL        | B16 melanoma                     | 5.4                                                     | 13.6 |
|              | Lewis plaučių karcinoma (3LL)    | 11.2                                                    | 24.0 |
|              | Fibrosarkoma (MCA 105)           | 27.0                                                    | 45.0 |
|              |                                  |                                                         |      |
| BALB/C       | Limfoma (YAC)                    | 8                                                       | 12.2 |
|              | Inkstų ląstelių karcinoma (MR28) | 0.1                                                     | 5.2  |

<sup>a</sup> Splenocitai buvo kultivuojami 5 dienas *in vitro* be BAT-1 mAk (1μg/ml) citotoksiškumas buvo nustatomas, esant efektoriaus/taikinio santykiui 60:1.

b. In vivo tyrimai

Kaip matyti 9 lentelėje, BAT-1 pasižymėjo imunostimuliuojančiu poveikiu *in vivo*. Šis poveikis apima:

- (i) [<sup>3</sup>H]timidino įsijungimo į pelių, kurioms prieš 10 dienų buvo suleista BAT-1, splenocitus stimuliacija (9A Lentelė). Maksimali stimuliacija (dešimtkartinė) buvo pasiekta, suleidus 10 µg/pelei BAT dozę.
- (ii) Citotoksiškumo indukcija pelių, kurioms buvo suleista BAT, splenocituose (9B Lentelė). Įvairios BAT-1 koncentracijos buvo švirkščiamos 10 dienų prieš atliekant citotoksiškumo analizę pelės melanomos (B16-F10) ląstelėms, inkstų ląstelių karcinomos (MR-28) ląstelėms ir limfomos (YAC) ląstelėms. Maksimalus efektas buvo pasiektas suleidus 10 µg/pelei BAT dozę.

9 lentelė

Pelių, kurioms buvo suleista BAT mAk, splenocitų proliferacija ir citotoksiškumas

| [ <sup>3</sup> H]Timidino įsijungimas<br>cpm x 10 <sup>3</sup> ± SEM | BAT<br>µg/pelei | Specifinis <sup>51</sup> Cr išskyrimas (% ± SEM) |                               |                                |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                                                                      |                 | Tiriamos ląstelės                                |                               |                                |
|                                                                      |                 | B16                                              | MR28                          | YAC                            |
| 9.9±1.5<br>(n=16)                                                    | 0               | 3.9±1.4<br>(n=10)                                | 16.0±2.7<br>(n=8)             | 3.3±0.4<br>(n=6)               |
| 15.3±2.3<br>(n=12)<br>p < 0.1                                        | 1               | 13.2±1.4<br>(n=6)<br>p < 0.001                   | 31.7±2.8<br>(n=8)<br>p < 0.01 | 16.7±1.6<br>(n=6)<br>p < 0.001 |
| 20.0±4.0<br>(n=14)<br>p < 0.05                                       | 10              | 14.0±1.2<br>(n=6)<br>p < 0.001                   | 25.2±2.1<br>(n=8)<br>p < 0.02 | 19.0±2.6<br>(n=6)<br>p < 0.001 |

C57BL ir BALB/c pelėms į veną buvo suleistos skirtingos BAT mAk koncentracijos. Po 10 dienų splenocitai buvo išskirti ir nustatytas citotoksiškumas bei [<sup>3</sup>H]timidino įsijungimas. C57BL splenocitai buvo tikrinami, naudojant B16 melanomos ląsteles-taikinius, o BALB/c splenocitai buvo tikrinami su MR-29 ir YAC ląstelėmis

(efektoriaus/taikinio santykis - 50:1). Kiekviena grupė buvo sudaryta iš 6-16 pelių, atlikta 3-4 eksperimentai. Citotoksiškumo bei [ $^3\text{H}$ ]timidino įsijungimo analizė kiekvienai pelei buvo pakartota 3 kartus ir paskaičiuotas aritmetinis vidurkis. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis  $\pm$  standartinė paklaida nuo pelių skaičiaus  $n$ ,  $p$  reikšmės skirtumui tarp kontrolinių ir BAT paveiktų gyvūnų nepateikiamos.

6 pavyzdys

Imunoterapinis BAT-1 poveikis pelėms, turinčioms auglius

Kaip parodyta 10 lentelėje, BAT-1 taikymas pelėms, kurioms buvo suleistos melanomos ląstelės praėjus 14 dienų po vėžinių ląstelių suleidimo, sumažino metastazių skaičių pelių, turinčių B16, 3LL ir MCA auglius, plaučiuose.

a1 BAT-1 panaikina pelių, kurioms buvo suleistos B16 melanomos ląstelės, plaučių metastazes, naudojant nustatytą plaučių metastazių modelį

C57BL pelėms į veną buvo suleista  $50 \times 10^3$  B16 melanomos ląstelių (10 lentelė). Po 24 dienų plaučiuose atsirado daugybė metastazių (beveik pasiektas didžiausias tankis, Fig.7, viršutinė eilė). Tuo tarpu Fig.7, apatinėje eilėje, matome pelių, kurioms buvo suleista BAT-1 (10  $\mu\text{g}$ /pelei), praėjus 2 savaitėm po B16 melanomos suleidimo, plaučius, kuriuose praktiškai nėra metastazių.

Fig.8 apibendrina šešių skirtingų eksperimentų rezultatus, atliktus esant panašioms į aukščiau aprašytas sąlygas.

10 lentelė

## Priešvėžinis BAT mAk efektas

## BAT-sužadintas plaučių metastazių sumažėjimas

|                                     | Augliai <sup>a</sup>         |                |             |                |            |                |
|-------------------------------------|------------------------------|----------------|-------------|----------------|------------|----------------|
|                                     | B16                          |                | 3LL         |                | MCA        |                |
| Metastazių<br>skaičius <sup>c</sup> | BAT poveikis <sup>b</sup>    |                |             |                |            |                |
|                                     | -<br>(n=24) <sup>d</sup>     | +<br>(n=27)    | -<br>(n=11) | +<br>(n=11)    | -<br>(n=8) | +<br>(n=9)     |
| Nėra                                | 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              |
| Plaučių svoris (g)                  | 0.803 <sup>e</sup> ±0.<br>26 | 0.315±0.6<br>6 | 1.014±0.21  | 0.364±0.0<br>6 | 0.836±0.31 | 0.328±0.<br>06 |

<sup>a</sup> auglio ląstelės sušvirkštos pelei dieną 0.

<sup>b</sup> BAT mAk (10 µg/pelei) suleistas į veną 14-tą dieną.

<sup>c</sup> Plaučių metastazės suskaičiuotos praėjus 24 dienoms po vėžinių ląstelių suleidimo, naudojant Zeiss erdvinį mikroskopą.

<sup>d</sup> pelių skaičius.

<sup>e</sup> pelių (n) plaučių svorio vidurkis ± SD.

a2. Priešvėžinis BAT-1 mAk, suleistų skirtingais laiko intervalais, poveikis B16 melanomos ląstelėms

11 lentelė rodo, kad pelėms, kurioms buvo suleista BAT-1 mAk, praėjus 10-14 dienų po melanomos ląstelių suleidimo metastazių plaučiuose praktiškai nebuvo diagnozuota, plaučių svoris buvo normalus. Nemažas, nors ir ne visiškas, metastazių pelių plaučiuose sumažėjimas buvo pastebėtas praėjus 5 dienoms po vėžinių ląstelių suleidimo ir iki 19 dienų po to. BAT-1, suleisti tą pačią dieną kaip ir vėžinės ląstelės, terapiniu efektu nepasizymėjo.

11 lentelė

Priešvėžinis BAT-1 mAk, suleistų skirtingais laiko intervalais, poveikis, B16 melanomos ląstelėms

| Diena <sup>f</sup> | Pelių skaičius | Metastazių skaičius | Plaučių svoris (g) |
|--------------------|----------------|---------------------|--------------------|
| Nėra               | 10             | 155.0±28            | 0.892±0.19         |
| -6                 | 3              | 61.0±0.8            | 0.983±0.1          |
| 0                  | 7              | 148.0±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±0.24         |

<sup>f</sup> BAT mAk suleidimo diena, skaičiuojant nuo nulinės vėžinių ląstelių suleidimo dienos

b. BAT-1 panaikina pelių, kurioms buvo suleistos Lewis plaučių karcinomos (3LL) ląstelės, plaučių metastazes, naudojant nustatytą plaučių metastazių modelį

Eksperimento sąlygos panašios į aprašytas B16 melanomai (žr. aukščiau), išskyrus tai, kad buvo suleista  $2 \times 10^5$  3LL ląstelių. Fig. 9, viršutinėje dalyje matyti pelių, kurioms buvo suleista 3LL ląstelės, plaučiai su daugybe metastazių. Fig.9 apatinėje eilėje galima matyti pelių, kurioms buvo suleista BAT-1, plaučius praėjus 14 dienų po vėžinių ląstelių suleidimo. Plaučiuose metastazių beveik nėra.

c. BAT panaikina pelių, kurioms buvo suleistos MCA plaučių fibrosarkomos (MCA 105) ląstelės, plaučių metastazes, naudojant nustatytą plaučių metastazių modelį

Eksperimento sąlygos panašios į aprašytas 3 LL Lewis plaučių karcinomos modelio atveju (žr. aukščiau). Fig.10, viršutinėje eilėje matyti pelių, kurioms buvo suleista MCA 105 ląstelės, plaučiai su daugybe metastazių. Fig.10 apatinėje eilėje galima matyti pelių, kurioms buvo suleista BAT-1, plaučius, praėjus 14 dienų po vėžinių ląstelių suleidimo. Plaučiuose metastazių beveik nėra.

## 7 pavyzdys

BAT gydo peles, turinčias B16 ir 3LL auglius

Pelės, kurioms suleista B16 melanomos ar 3LL ląstelės, kaip jau buvo minėta, miršta per 25-35 dienas po vėžinių ląstelių suleidimo. Priešingai tam (Fig.11), visos pelės, kurioms buvo suleista BAT-1 (10  $\mu$ g/pelei), praėjus 14 dienų po vėžinių ląstelių suleidimo išgyveno daugiau nei 100 dienų. Dauguma gyvūnų, kurie buvo stebėti 5 mėnesius, nesirgo ir jų skrodimo metu metastazių nepastebėta.

## 8 pavyzdys

Pelių, kurioms buvo suleista BAT-1 mAk, adaptacinis splenocitų perkėlimas

Pelių, kurioms buvo suleista vien tik BAT-1 mAk arba iš pradžių B16 melanomos ląstelės, o po to BAT-1 mAk, splenocitai buvo perkelti recipientinėms pelėms. Recipientinėms pelėms buvo sušvirkštos B16 melanomos arba 3LL vėžinės ląstelės. Kaip matyti 12 lentelėje, splenocitų perkėlimas iš pelių, kurioms buvo suleista BAT-1 mAk, sukėlė auglio regresiją pelėms, gavusioms perkeltus splenocitus. Efektyviausias gydymas buvo pasiektas, kai  $10^3$  splenocitų, gautų iš pelių, kurioms buvo suleista BAT-1 praėjus 14 dienų po B16 melanomos ląstelių suleidimo, buvo perkelta recipientinėms pelėms, turinčioms auglius. Kaip matyti 12 lentelėje, šiuo atveju melanomos ląstelės buvo visiškai pašalintos iš B16 auglių turinčių recipientų ir stebima didelė 3LL auglių regresija, apie kurią galima spręsti iš metastazių skaičiaus o taip pat ir plaučių svorio.

Šie rezultatai rodo, kad splenocitai, gauti iš pelių, paveiktų B16 ir BAT-1 pasižymi priešvėžiniu poveikiu B16 ir 3LL augliams. Todėl įmanoma, kad BAT-1 stiprina nespecifinius ląstelinius efektorinius mechanizmus. Be to, auglio buvimas skatina tokių efektorinių ląstelių, kurias indukuoja BAT-1, susidarymą.

12 Lentelė

Perkeltų ląstelių sukurta auglių regresija

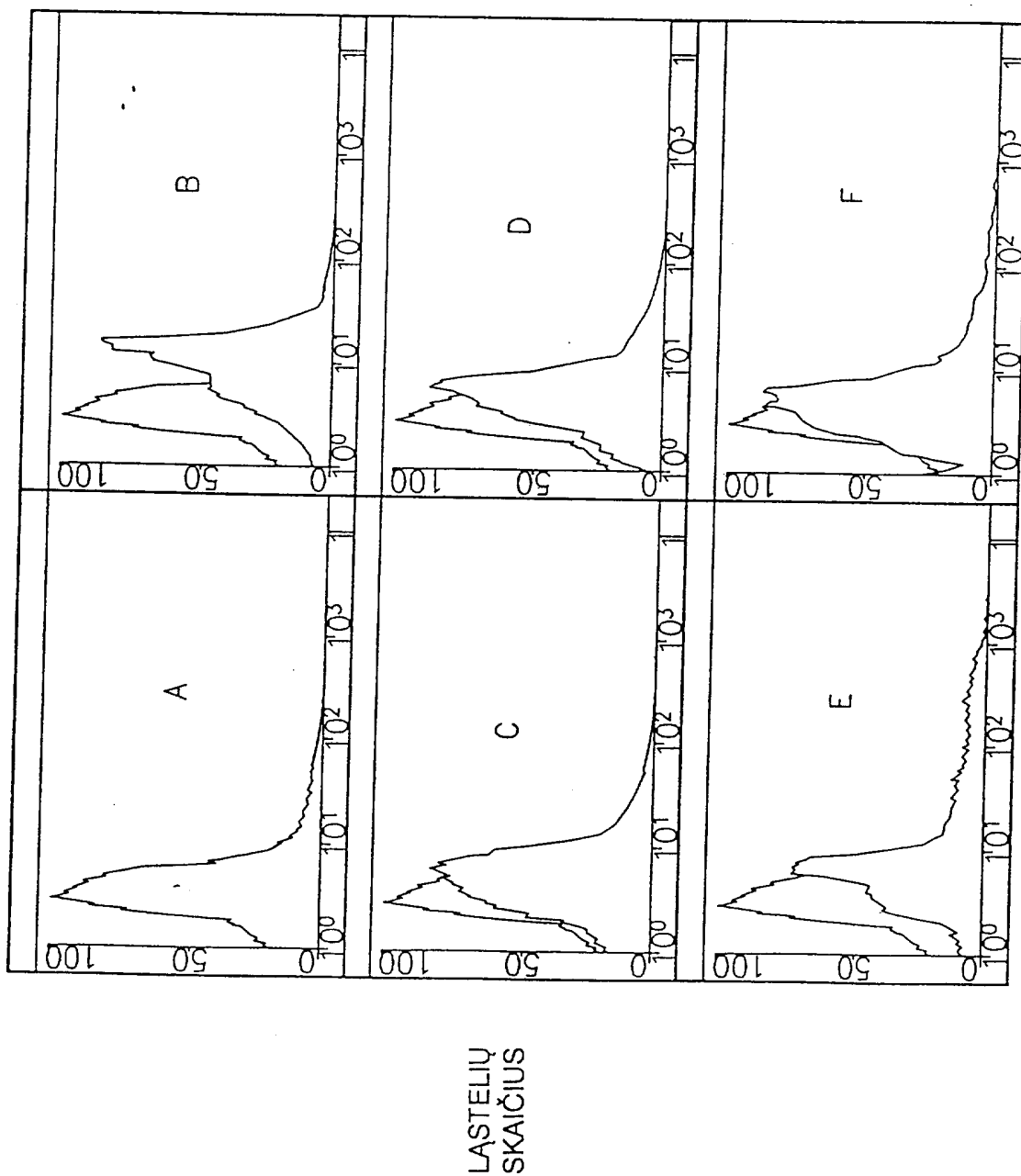
| PELĖS, KURIOMS BUVO SULEISTOS VĖŽINĖS LĄSTELĖS |                    |             |                 |             |                 |             |                 |             |  |
|------------------------------------------------|--------------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|--|
| B16                                            |                    |             |                 |             | 3LL             |             |                 |             |  |
| perkeltų splenocitų skaičius                   |                    |             |                 |             |                 |             |                 |             |  |
| Donorų grupė                                   | 10 <sup>7</sup>    |             | 10 <sup>8</sup> |             | 10 <sup>7</sup> |             | 10 <sup>8</sup> |             |  |
|                                                | Metastazių sk.     | Plaučių sv. | Metastazių sk.  | Plaučių sv. | Metastazių sk.  | Plaučių sv. | Metastazių sk.  | Plaučių sv. |  |
| A. nepaveikti                                  | > 250              | 1.09±0.9    | > 250           | 1.12±0.04   | > 250           | 1.05±0.16   | > 250           | 1.12±0.16   |  |
| B. paveikti BAT <sup>b</sup>                   | 89±10 <sup>d</sup> | 0.67±0.04   | 28±4.3          | 0.41±0.19   | 134±15          | 0.87±0.29   | 134±19          | 0.77±0.31   |  |
| C. paveikti B16 <sup>c</sup> ir BAT            | 4±4                | 0.32±0.01   | 0±0.0           | 0.31±0.01   | 3.6±2.9         | 0.34±0.06   | 2.6±1.1         | 0.36±0.03   |  |

<sup>a</sup> trijų pelių grupių (A, B, C) splenocitai buvo sušvirkšti į veną recipientinėms pelėms, praėjus 14 dienų po vėžinių ląstelių suleidimo.<sup>b</sup> splenocitai perkelti iš pelių praėjus 20 dienų po i.v. BAT injekcijos (10 µg/pelėi).<sup>c</sup> sąlygos, kaip ir <sup>b</sup>, išskyrus tai, kad pelėms buvo suleista BAT, praėjus 14 dienų po B16 melanomos ląstelių suleidimo.<sup>d</sup> trijų pelių plaučių metastazių vidurkis ± SD<sup>d</sup> trijų pelių plaučių svorio vidurkis ± SD

## Išradimo apibrėžtis

1. Monokloninis antikūnas arba jo antigeną rišantis fragmentas, kuris yra:
  - i) monokloninis antikūnas, išskirtas hibridominės ląstelių linijos, deponuotos Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), deponavimo Nr. I-1397, arba
  - ii) monokloninis antikūnas, kuris rišasi prie to pat antigeno, kaip ir i) antikūnas.
2. Monokloninis antikūnas arba jo fragmentas pagal 1 punktą, **besiskiriantis tuo**, kad juos išskiria hibridominė ląstelių linija, deponuota CNCM, deponavimo Nr. I-1397.
3. Imortalizuota ląstelių linija, išskirianti antikūną pagal 1 arba 2 punktą.
4. Imortalizuota ląstelių linija pagal 3 punktą, **besiskirianti tuo**, kad ji yra hibridominė ląstelių linija.
5. Hibridominė ląstelių linija pagal 4 punktą, **besiskirianti tuo**, kad ji yra hibridominė ląstelių linija, deponuota CNCM, deponavimo Nr. I-1397.
6. Monokloninis antikūnas arba jo fragmentas pagal 1 arba 2 punktą, skirti panaudoti imuninės sistemos paveikimui.
7. Monokloninis antikūnas arba jo fragmentas pagal 1 arba 2 punktą, skirti panaudoti individo imuninės sistemos citotoksinio aktyvumo stimuliacijai.
8. Monokloninis antikūnas arba jo fragmentas pagal 1 arba 2 punktą, skirti panaudoti priešvėžinių preparatų gamybai.
9. Farmacinė kompozicija, **besiskirianti tuo**, kad jos sudėtyje kaip veiklioji medžiaga yra monokloninio antikūno pagal 1 arba 2 punktą efektyvus kiekis bei fiziologiškai suderintas nešiklis.
10. Farmacinė kompozicija pagal 9 punktą, **besiskirianti tuo**, kad savo sudėtyje turi kitą nei minėtas antikūnas medžiagą, kuri gali sužadinti citotoksinį limfocitų aktyvumą, veikdama papildančiai arba sinergetiškai su minėtu antikūnu.
11. Baltyminė medžiaga, prie kurios specifiškai rišasi monokloninis antikūnas pagal 1 arba 2 punktą.
12. Medžiaga pagal 11 punktą, **besiskirianti tuo**, kad jos molekulinė masė, nustatyta pagal gel-elektroforezę, yra 48-50 K daltonų.

FIG.1



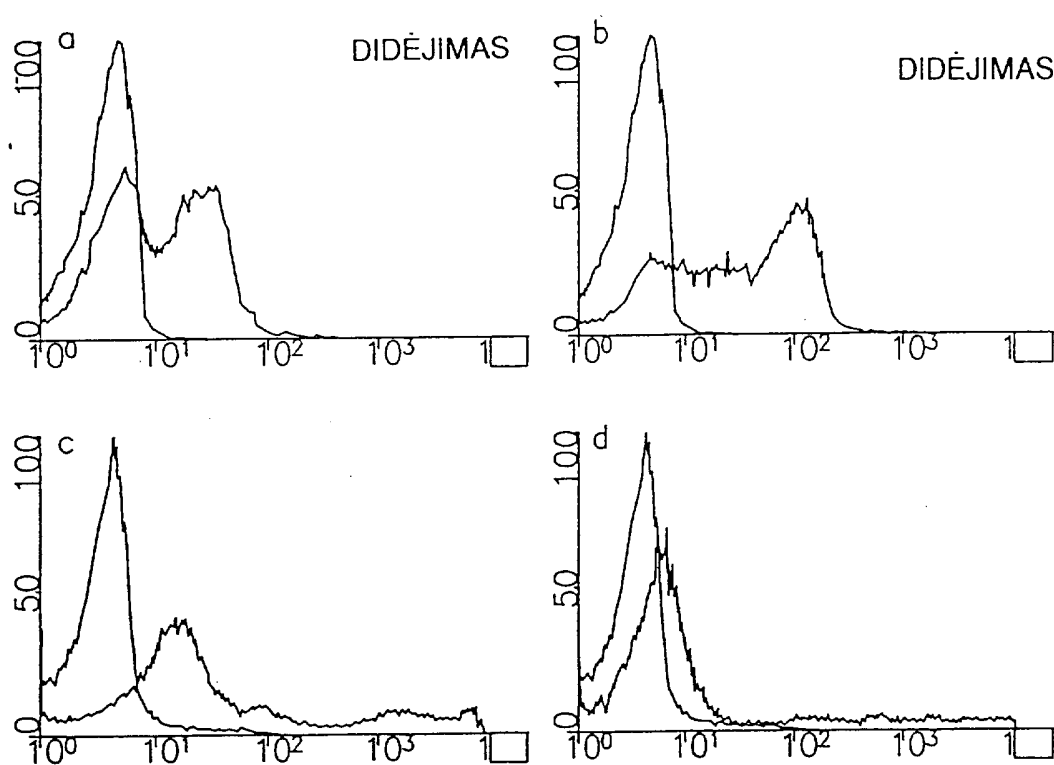
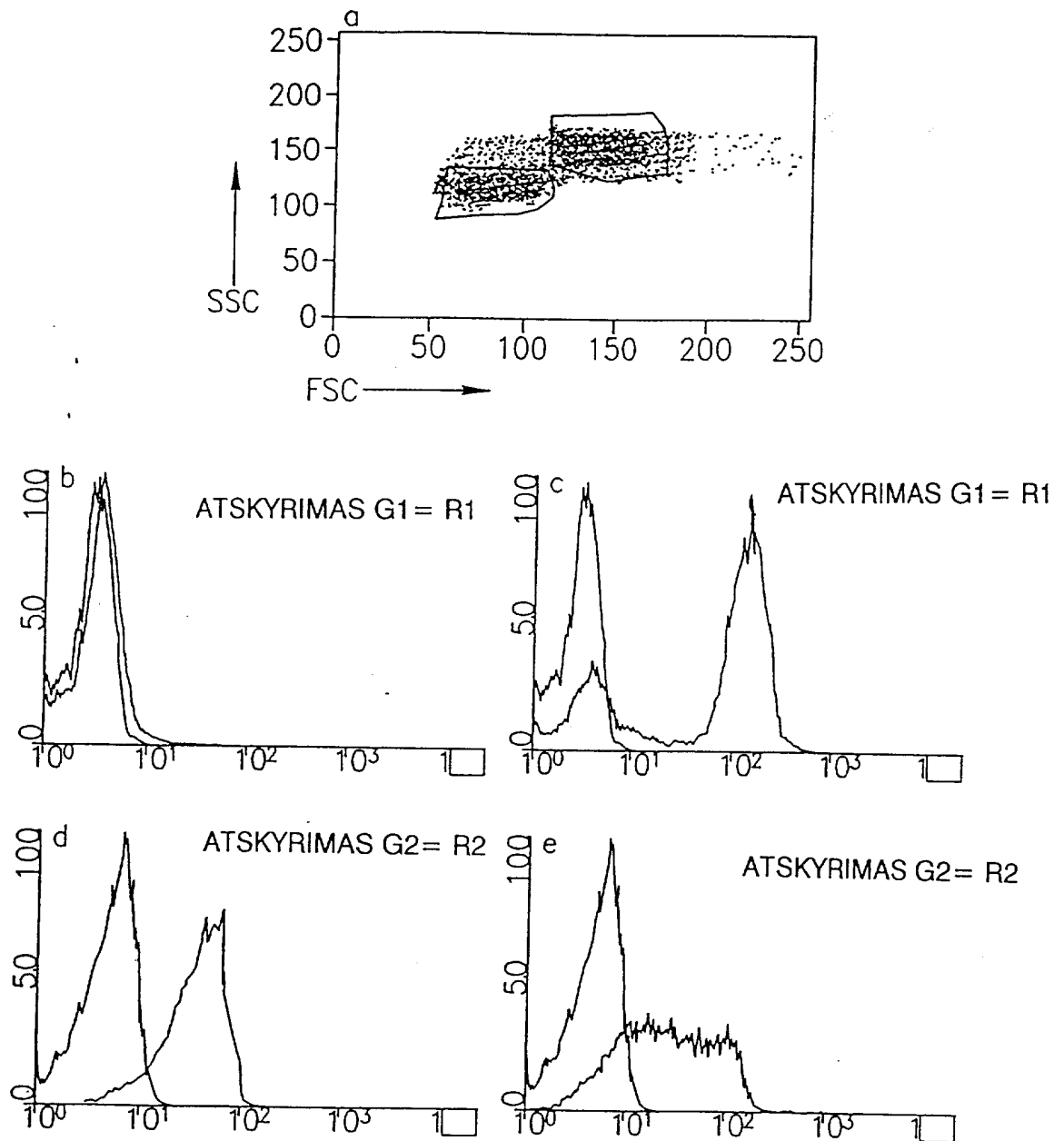


FIG.2A



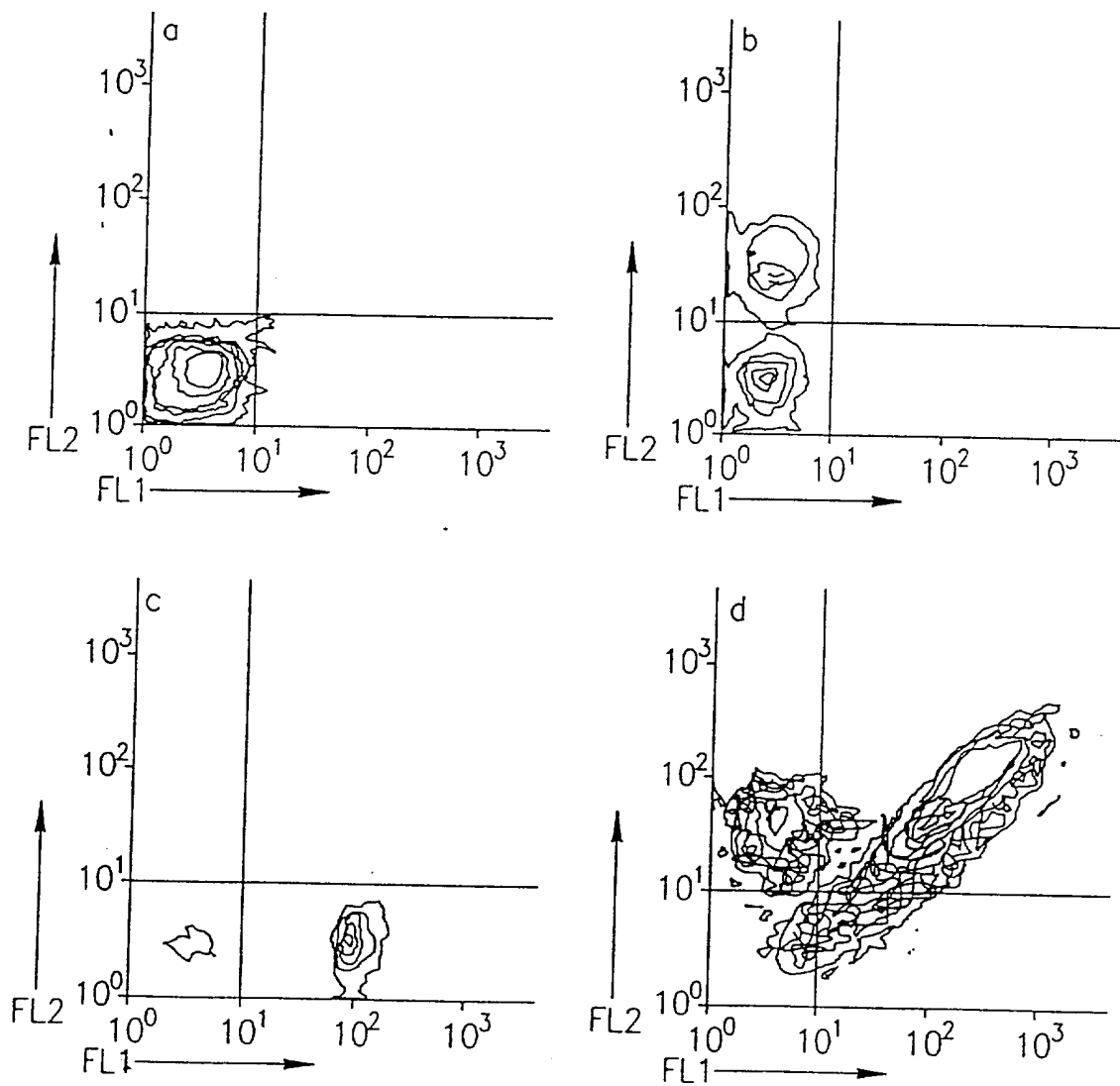


FIG.3A

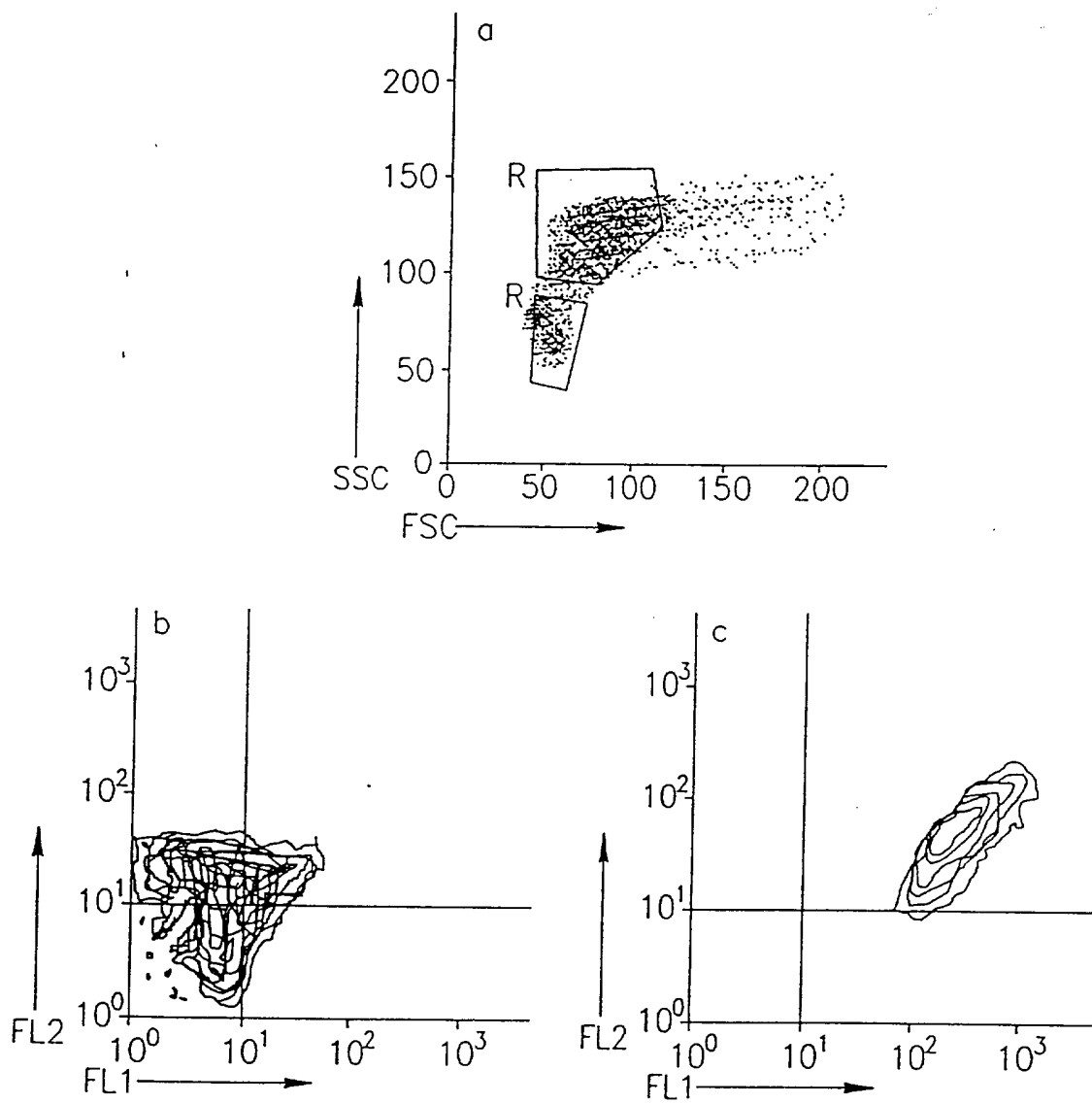


FIG.3B

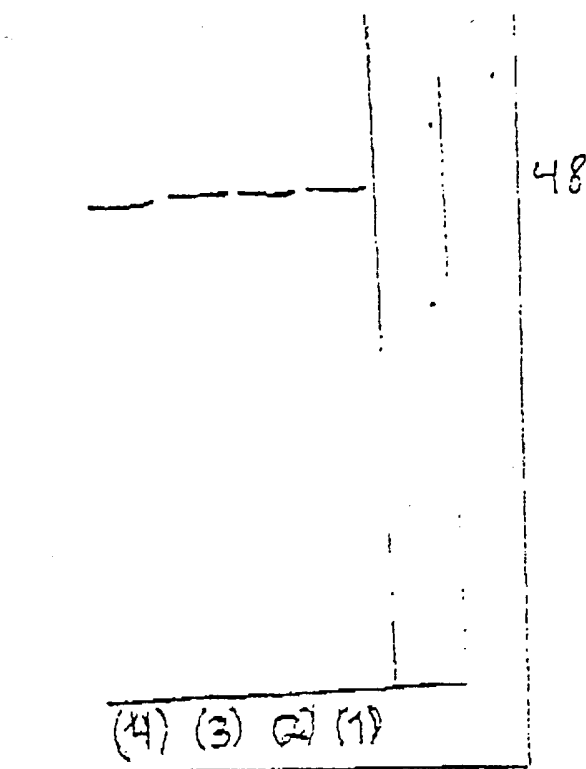


FIG.4 susideda iš FIG. 4(1)  
FIG. 4(2)  
FIG. 4(3)  
FIG. 4(4)

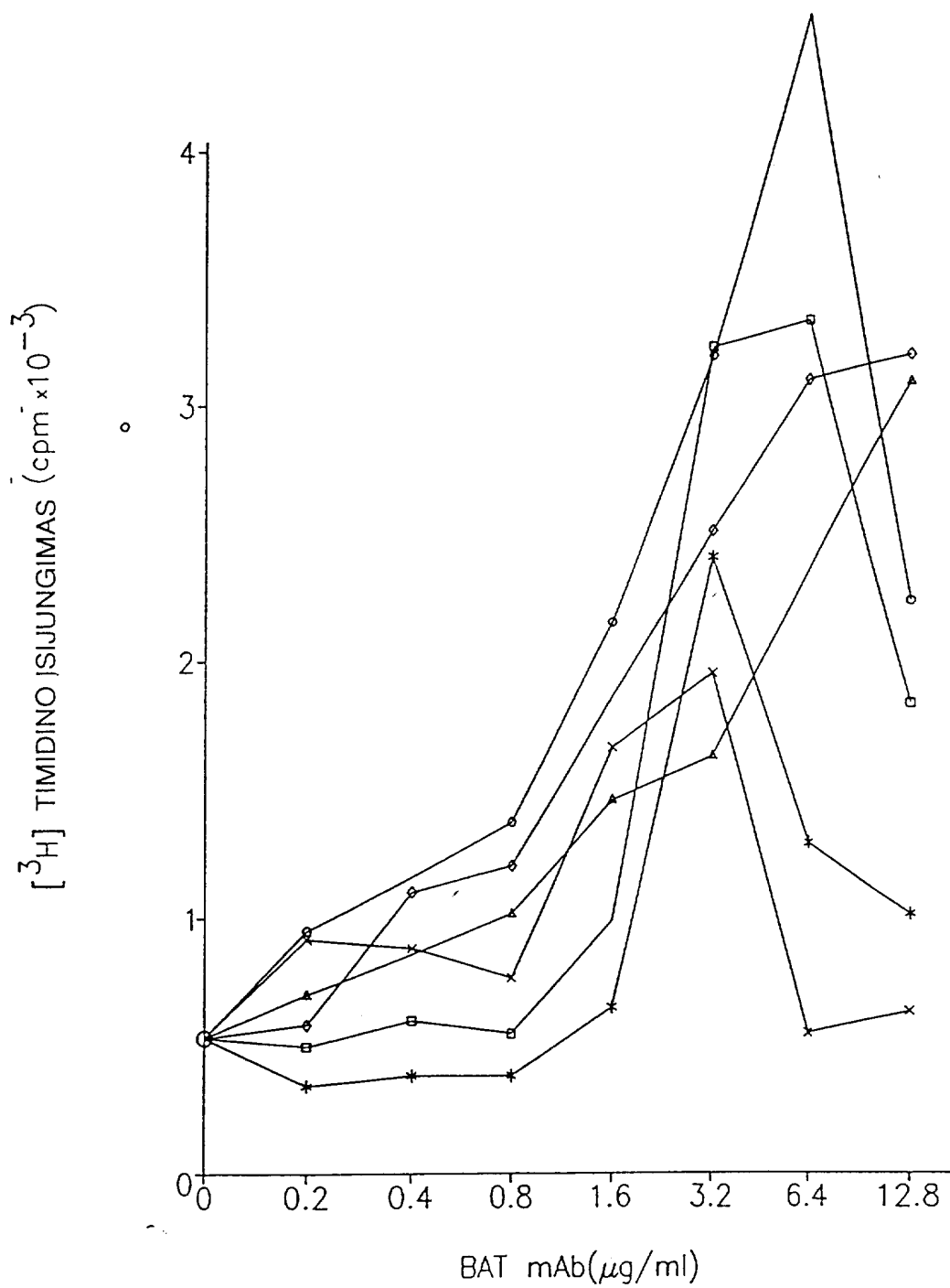


FIG.5

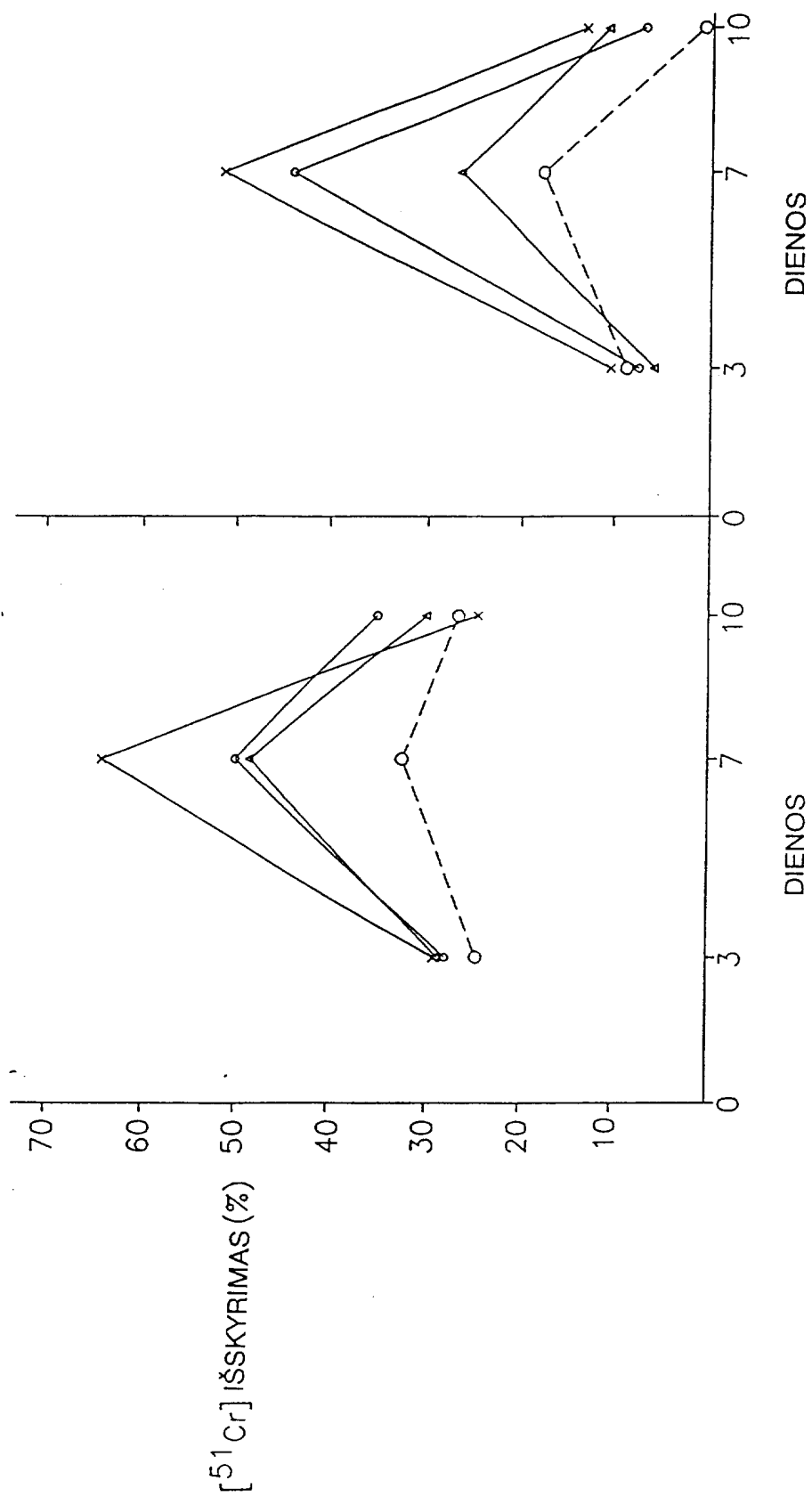


FIG.6

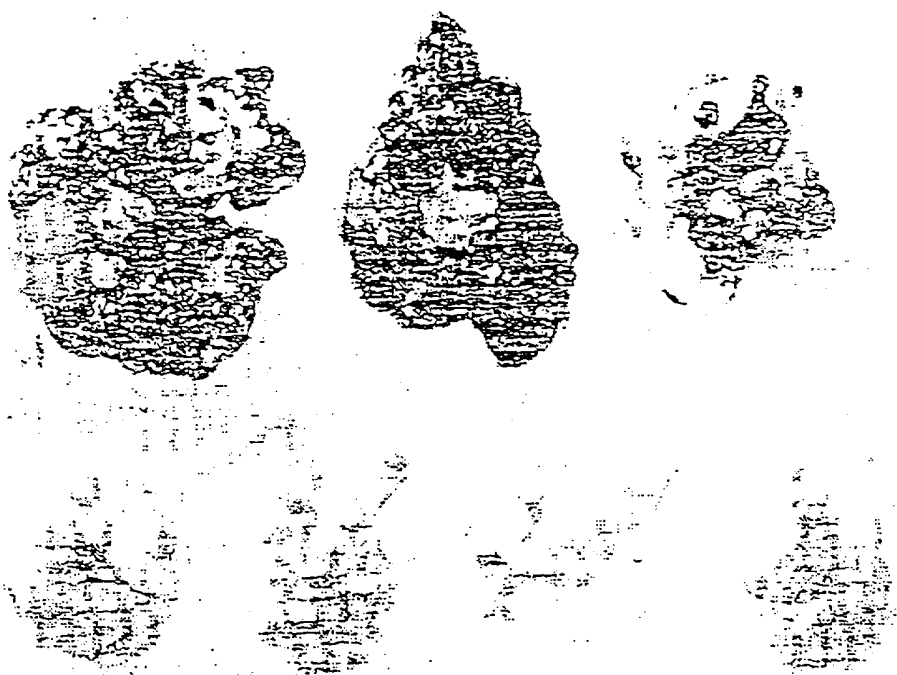


Fig. 7

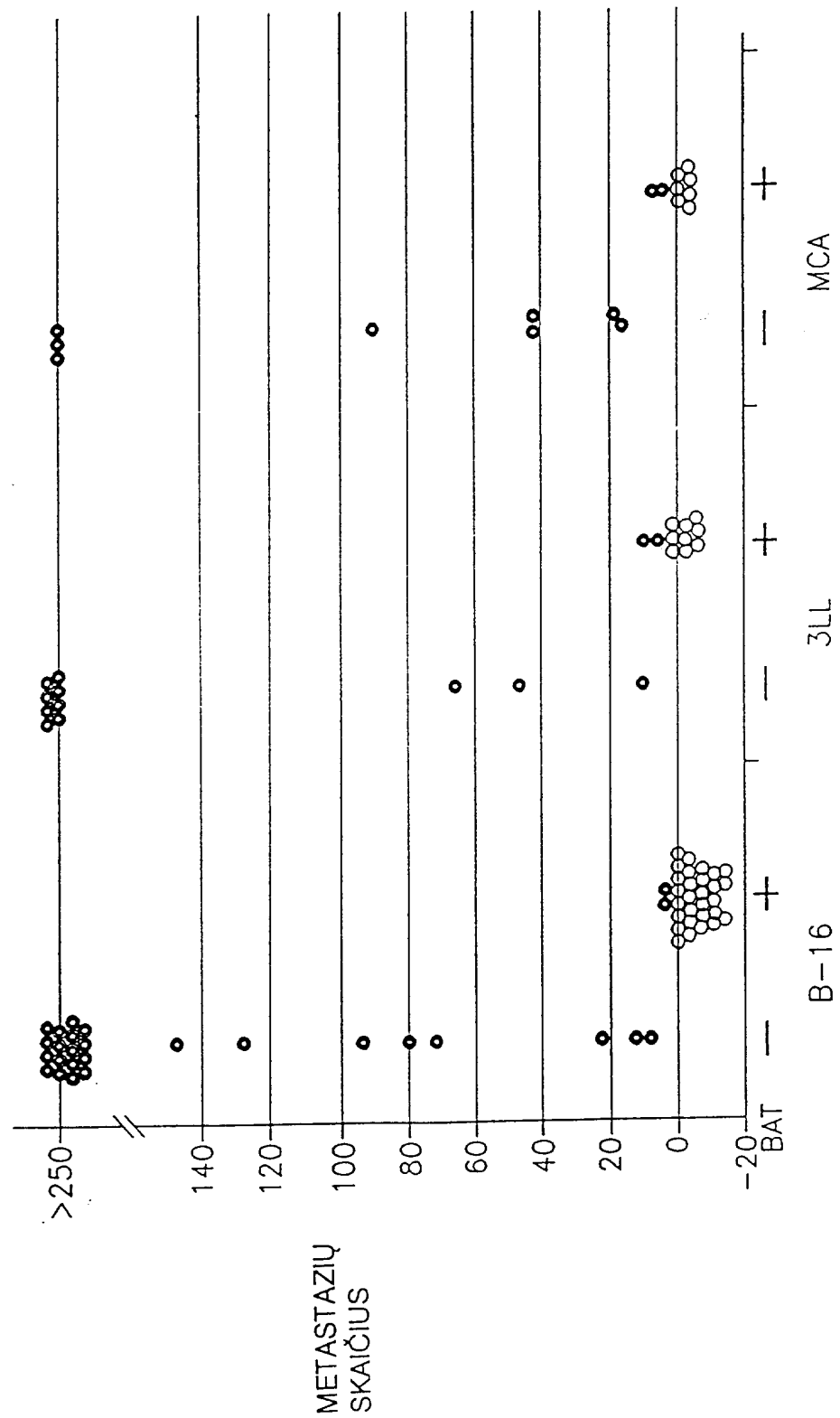


FIG.8

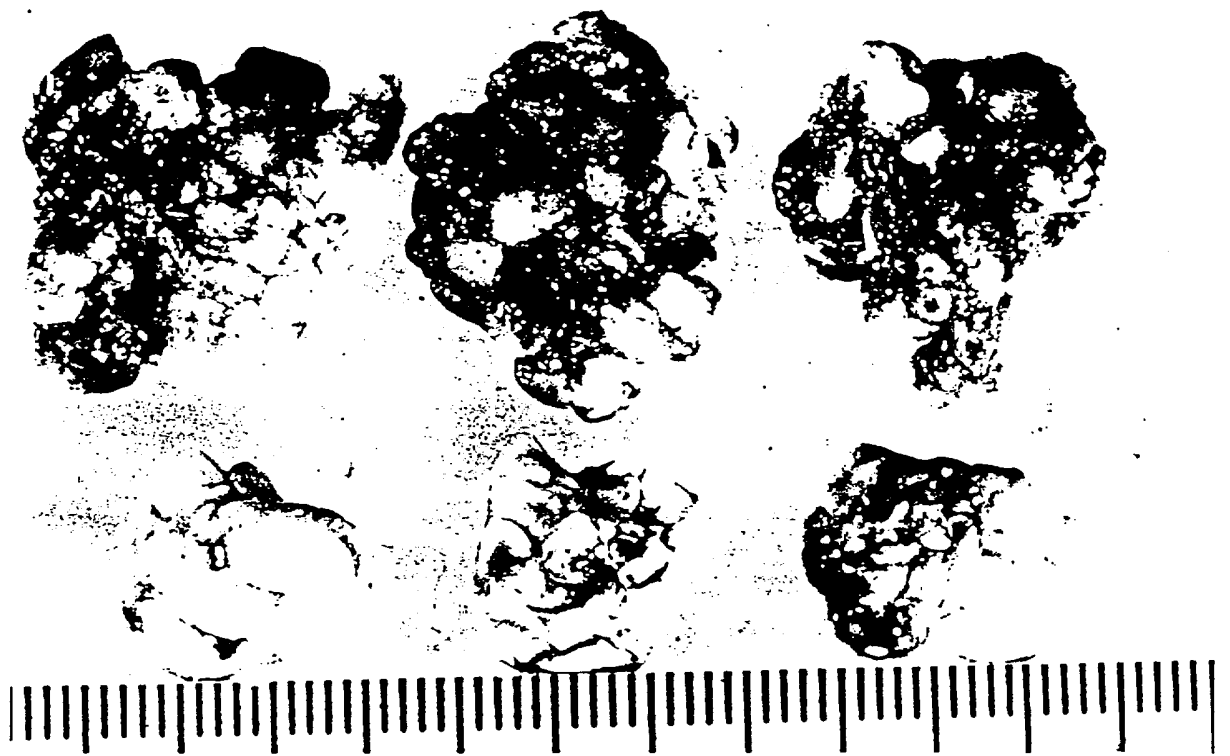


Fig. 9



Fig. 10