

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. LUDWIKA HIRSZFELDA POLSKIEJ AKADEMII NAUK



Marta Lisowska

**„Wytworzenie i charakterystyka nowych przeciwciał monoklonalnych
swoistych wobec antygenów zgodności tkankowej DR psa (DLA-DR) jako
narzędzi w diagnostyce i eksperymentalnej terapii chłoniaków”**

"Generation and characteristics of novel monoclonal antibodies specific
to canine histocompatibility antigen DR (DLA-DR) as tools in diagnostics
and experimental therapy of lymphoma"

Rozprawa doktorska

napisana pod kierunkiem

prof. dr. hab. Arkadiusza Miążka

Wrocław 2019

Największe podziękowania kieruję do mojego promotora **prof. dr hab. Arkadiusza Miążka** za ogrom przekazanej wiedzy i umiejętności. Za olbrzymią pomoc w napisaniu niniejszej pracy oraz za każdą otrzymaną wskazówkę i radę, a także słowa konstruktywnej krytyki.

Chciałabym podziękować również:

dr Mikołajowi Kłossowiczowi, dr Bożenie Ścirce i dr Karolinie Marek Bukowiec za ogromną pomoc i przekazaną wiedzę w początkach mojej pracy naukowej,

Joannie Konstanciuk i Michałowi Zalasowi za niepowtarzalną atmosferę w laboratorium,

dr Agnieszce Łaskiewicz za wiele cennych naukowych dyskusji oraz wielokrotną pomoc w rozwiązywaniu problemów,

dr hab. Małgorzacie Cebrat, dr Joannie Niedbalskiej Tarnowskiej, dr Łukaszowi Śnieżewskiemu i Sylwii Janik za pomoc i współdzielenie laboratorium,

dr hab. Andrzejowi Rapakowi za umożliwienie bycia częścią projektu Tango oraz pomoc w badaniach,

dr Magdalenie Milczarek za wykonanie wszystkich procedur związanych z eksperymentami na zwierzętach,

dr Michałowi Majkowskiemu za wykonanie pięknych zdjęć z mikroskopu konfokalnego oraz za wsparcie i pomoc merytoryczną,

dr Wojciech Hildebrandowi oraz **dr hab. Aleksandrze Pawlak** za możliwość uzyskania próbek biologicznych.

W wyniku realizacji niniejszej pracy doktorskiej powstały następujące publikacje:

1. **Lisowska M**, Pawlak A, Kutkowska J, Hildebrand W, Ugorski M, Rapak A, Miazek A; Development of novel monoclonal antibodies to dog leukocyte antigen DR displaying direct and immune-mediated cytotoxicity toward canine lymphoma cell lines. *Hematol Oncol.* 36, 554–560 (2018).
2. **Lisowska M**, Milczarek M, Ciekot J, Kutkowska J, Rapak A, Miazek A; An antibody specific to dog leukocyte antigen DR (DLA-DR) and its novel methotrexate conjugate inhibit the growth of canine B cell lymphoma. *Cancers (Basel).* 11, 1–14 (2019).

Rezultaty pracy zaprezentowano również na pięciu konferencjach międzynarodowych i trzech krajowych:

1. **Marta Lisowska**, Aleksandra Pawlak, Andrzej Rapak, Wojciech Hildebrand, Arkadiusz Miazek; New monoclonal antibodies to cell surface antigens of canine B cell neoplasms; II meeting of the European Canine Lymphoma Network, Workshop on canine lymphoma; Lugano 2015
2. **Marta Lisowska**, Aleksandra Pawlak, Andrzej Rapak, Wojciech Hildebrand, Arkadiusz Miazek; Novel mouse antibodies recognizing canine B cell lymphoma/leukemia antigens; 5th European Veterinary Immunology Workshop; Wiedeń 2015
3. **Marta Lisowska**, Aleksandra Pawlak, Andrzej Rapak, Arkadiusz Miazek; Potencjał nowych przeciwciał monoklonalnych rozpoznających psie antygeny głównego układu zgodności tkankowej DR (DLA-DR) do diagnozy i terapii chłoniaków; II Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej i XI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Sekcji Immunotoksykologii i Immunomodulacji PTiDiK; Kościelisko 2016

4. Arkadiusz Miazek, **Marta Lisowska**, Aleksandra Pawlak, Wojciech Hildebrand, Andrzej Rapak; Monoclonal antibodies recognizing DLA-DR dimers and their use in rapid screening and experimental therapy of canine lymphoma; III meeting of the European Canine Lymphoma Network, Workshop on canine lymphoma; Lugano 2017
5. **Marta Lisowska**, Łukasz Bzdzion, Andrzej Małkowski, Andrzej Rapak, Arkadiusz Miazek; Monitoring canine joint inflammation with a novel DLA-DR based immunoassay; European Veterinary Immunology Workshop 2018; Utrecht 2018
6. **Marta Lisowska**, Aleksandra Pawlak, Andrzej Rapak, Arkadiusz Miazek; Focal Adhesion Kinase (FAK) inhibition potentiates the direct cytotoxic effect of an anti-major histocompatibility complex class II (MHC-II) antibody towards canine B cell leukemia/lymphoma lines; IV meeting of the European Canine Lymphoma Network, Workshop on canine lymphoma; Lugano 2019
7. **Marta Lisowska**, Justyna Kutkowska, Andrzej Rapak, Arkadiusz Miazek; Właściwości cytotoksyczne przeciwciał monoklonalnych rozpoznających psi antygen DLA-DR; IV Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej „Biologia-Medycyna-Terapia”; Szczawnica 2019
8. **Marta Lisowska**, Aleksandra Pawlak, Andrzej Rapak, Arkadiusz Miazek; Focal adhesion kinase (FAK) inhibition potentiates the direct cytotoxic effect of an anti-major histocompatibility complex class II DR (MHC-II) antibody towards canine B cell leukemia/lymphoma lines; 75-lecie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, 4th CONFERENCE “Current approach to health and diseases in animals and humans”; Lublin 2019.

Badania zrealizowano w ramach projektów:

Kierownik:

Preludium - 2016/21/N/NZ5/01942 „Epitopy konformacyjne cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej DR psa (DLA-DR) jako nowe cele w diagnostyce i terapii chłoniaków”

Wykonawca (grant dr hab. Andrzeja Rapaka):

Tango - TANGO2/340428/NCBR/2017 „Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w diagnostyce i celowanej terapii przeciwnowotworowej psich białaczek i chłoniaków”

SPIS TREŚCI

Streszczenie.....	10
Summary.....	12
Wykaz skrótów.....	14
1 Wstęp	17
1.1 Wprowadzenie	17
1.2 Chłoniaki	18
1.3 Chłoniaki u psów	19
1.4 Wykorzystanie psa jako modelu spontanicznych chłoniaków	20
1.5 Leczenie ludzkich chłoniaków nieziarniczych	21
1.6 Przeciwciała jako leki biologiczne.....	24
1.7 Leczenie psów.....	24
1.8 Metotreksat (MTX)	26
1.9 HLA-DR jako cel terapii	27
1.9.1 Przeciwciała anty HLA-DR.....	28
1.9.2 Przeciwciało L243	29
1.10 Biomarkery chłoniaków	30
1.11 Rozpuszczalne formy HLA-DR.....	31
2 Cel pracy	32
3 Materiały i metody	33
3.1 Materiały	33
3.1.1 Odczynniki	33
3.1.2 DNA.....	39
3.1.3 Bakterie	40
3.1.4 Linie komórkowe	40
3.1.5 Mysz.....	41
3.1.6 Próbki biologiczne	41
3.2 Metody	41
3.2.1 DNA.....	41
3.2.2 Hodowla komórkowa	42
3.2.3 Transfekcja.....	43

3.2.4	Cytometria przepływowa	43
3.2.5	Izolacja PBMC	43
3.2.6	Otrzymanie przeciwciał	43
3.2.7	Barwienia linii komórkowych i bioptatów	44
3.2.8	Testy cytotoksyczne.....	45
3.2.9	Wytworzenie linii CLBL1-LUC.....	45
3.2.10	Przedkliniczne badania aktywności przeciwnowotworowej przeciwciał	46
3.2.11	ELISA	47
3.2.12	Kaninizacja	47
3.2.13	Metody statystyczne	48
4	Wyniki.....	49
4.1	Otrzymanie przeciwciał reaktywnych wobec komórek psiego chłoniaka B-komórkowego	49
4.1.1	Uzyskanie hybridom	49
4.1.2	Identyfikacja epitopu rozpoznawanego przez przeciwciała B5 i E11 oraz potwierdzanie specyficzności	52
4.2	Testy cytotoksyczne.....	57
4.2.1	Analiza cytotoksyczności bezpośredniej przeciwciał.....	57
4.2.2	Analiza mechanizmu apoptozy wywoływanej przez przeciwciała B5 i E11.....	58
4.2.3	Cytotoksyczność zależna od układu odporności	62
4.3	Ocena przydatności przeciwciał B5 i E11 do diagnostyki psich chłoniaków metodą ELISA	65
4.3.1	Ocena poziomu ekspresji DLA-DR w lizatach i biopsjach węzłów chłonnych psów chorych na chłoniaki z limfocytów B.	66
4.3.2	Ocena poziomu rozpuszczalnej formy DLA-DR w surowicy psów chorych na chłoniaki	67
4.4	Otrzymanie i wstępna charakterystyka chimerowego kaninizowanego przeciwciała B5	68
4.5	Uzyskanie i właściwości koniugatu przeciwciała lek - B5-MTX	69
4.6	Ocena efektu terapeutycznego podania przeciwciała B5 lub koniugatu B5-MTX myszom obciążonym komórkami psiej linii CLBL1-LUC	71
4.6.1	Obrazowanie ognisk wzrostu nowotworu u myszy NOD-SCID obciążonych komórkami linii CLBL1-LUC.....	72
4.6.2	Analiza organów	75
4.6.3	Analiza poziomu sDLA-DR w mysiej surowicy krwi	76
5	Dyskusja i wnioski.....	78
5.1	Medycyna weterynaryjna – stosowane terapie	78

5.2	MHC-II.....	79
5.3	Przeciwciała i koniugaty w modelach in vivo	81
5.4	MHC-II jako marker	82
5.5	Potencjalne wykorzystanie przeciwciał u psów	83
5.6	Podsumowanie	84
6	Wnioski końcowe	85
7	Literatura	86
8	Spis tabel i rysunków	91

STRESZCZENIE

Chłoniaki nieziarnicze są corocznie przyczyną ponad 200 tysięcy zgonów na całym świecie. Pomimo znacznego postępu medycyny i powstawania wielu nowych leków oraz terapii, w tym bardzo ważnego w leczeniu chłoniaków przeciwciała monoklonalnego anty CD20 (Rituximab), wciąż istnieje grupa pacjentów nie odpowiadających na leczenie. Współczesna medycyna potrzebuje nowych celów terapeutycznych, które będą dawały szersze możliwości leczenia. Takim znanym od wielu lat celem przeciwciał wymierzonych w chłoniaki jest MHC klasy II. Białko to odpowiedzialne jest głównie za prezentację antygenów limfocytom T, lecz w momencie sprzęgnięcia przez przeciwciało, może również przekazywać sygnały aktywacyjne i proapoptotyczne. Do tej pory otrzymano już kilka przeciwciał anty-MHC II posiadających duży potencjał do użycia w terapii ludzkich chłoniaków, między innymi Apolizumab czy IMMU-14, lecz żadne z nich nie znalazło się w powszechnym użyciu z powodu niewystarczającej efektywności, bądź zbyt dużych skutków ubocznych w modelach badań przedklinicznych.

Sytuacja jest zupełnie inna w medycynie weterynaryjnej, gdzie aktualnie dopuszczono do stosowania tylko jedno przeciwciało monoklonalne (Lokivetmab - aIL-31) do terapii atopowego zapalenia skóry u psów. Chłoniaki u psów podobnie jak u ludzi są często występującym nowotworem układu limfatycznego. Z racji ograniczenia możliwości stosowania wysokich dawek chemioterapii jest to schorzenie uznawane za nieuleczalne. Ze względu na podobieństwo epidemiologiczne, morfologiczne i kliniczne oraz spontaniczne występowanie chłoniaków u psów stanowią one dobry model do testowania nowych leków i terapii oraz badania mechanizmów rozwoju nowotworu.

Celem pracy było uzyskanie przeciwciał reaktywnych wobec komórek psich chłoniaków, które mogłyby posłużyć zarówno do terapii jak również jako narzędzie diagnostyczne w medycynie weterynaryjnej. Wytworzono dwa przeciwciała - B5 oraz E11 o reaktywności wobec psiej cząsteczki DLA-DR, które następnie poddano analizie ich właściwości biologicznych i potencjału terapeutycznego zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Wykazano bezpośrednią oraz zależną od układu immunologicznego aktywność cytotoksyczną obydwu przeciwciał *in vitro*. Przeciwciała B5 i E11 wywołują apoptozę u około 40% komórek psich linii CLBL1 i CLB70, nie wywołując efektu w kontrolnych psich liniach komórkowych nie wykazujących ekspresji DLA-DR. Oba przeciwciała wykazują ponad 90% cytotoksyczności w teście z dopełniaczem oraz indukują około

10% fagocytozy komórek nowotworowych. Doświadczenia in vivo na modelu mysim wykazały, że przeciwciała B5 oraz jego koniugat z metotreksatem znacząco spowalniają rozwój nowotworu w modelu rozsialego chłoniaka z dużych rozlanych komórek typu B (DLBCL) u myszy NOD-SCID.

Przeciwciała B5 i E11 wykorzystano również do wytworzenia testu ELISA umożliwiającego określenie poziomu DLA-DR zarówno w biopatach z węzłów chłonnych, liniach komórkowych oraz płynach ustrojowych. Wykazano, że istnieje zależność między ilością komórek nowotworowych, a ilością rozpuszczalnego DLA-DR w surowicy krwi myszy z przeszczepionym psim chłoniakiem, a także podwyższenie poziomu tej cząsteczki w surowicy psów chorych na chłoniaka B-komórkowego w porównaniu do psów zdrowych.

SUMMARY

Non-Hodgkin lymphomas cause over 200 thousands deaths every year all over the world. Despite a huge progress in the development and production of many new drugs and therapies, still there is a group of patients who do not respond to standard treatment. Rituximab, a monoclonal antibody to CD20, has significantly improved curability of NHL (non-Hodgkin lymphoma), however new therapeutic targets, giving more treatment opportunities, are still needed. MHC class II molecules have been considered as targets for lymphoma treatment for years. These proteins are responsible mainly for antigen presentation to T cells, but their engagement by antibody may elicit both pro-survival and pro-apoptotic signals. So far, there have been reports on a few anti MHC-II antibodies with some potential for use in human lymphoma therapy (for example Apolizumab or IMMU-14) but none of these are currently in the clinical use due to their limited efficiency or side effects in preclinical studies.

The use of biological drugs in veterinary medicine is completely different – there is only one monoclonal antibody (Lokivetmab, aIL-31) approved for use in atopic dermatitis. Lymphomas in dogs similarly like in humans are common immune system neoplasm. Due to limited possibilities of using high doses of chemotherapy canine lymphomas are considered incurable. On grounds of morphological, epidemiological and clinical similarity and of spontaneous occurrence of lymphomas in dogs, they make great model for testing new medicines and therapies or studying mechanisms in human NHL.

The aim of this work was to obtain antibodies useful in veterinary medicine as therapeutic agent and diagnostic tool. Two monoclonal antibodies B5 and E11 reactive with canine antigen DLA-DR were created and their biological properties and therapeutic potential were analyzed both in vitro and in vivo. It was shown that both of them possess direct and immune system dependent cytotoxic activity demonstrated in vitro. B5 and E11 trigger caspase-dependent apoptosis in about 40% of cells of canine cell lines expressing DLA-DR, but not in DLA-DR deficient control cell lines. B5 and E11 exhibit over 90% cytotoxicity in complement dependent assay and 10% increase in antibody mediated phagocytosis by RAW264 cells. In vivo administration of B5 or methotrexate conjugated B5 mAbs to NOD-SCID mice, xenotransplanted with a canine B-cell lymphoma cell line (CLBL1-LUC), induced a significant slowdown of the tumor growth and spread to peripheral tissues.

B5 and E11 Mabs were also used to establish an ELISA test enabling evaluation of DLA-DR levels in biopsies and body fluids of dogs. We showed that there was a correlation between the amount of tumor cells and the level of soluble DLA-DR in blood serum of mice engrafted with canine lymphoma CLBL1-LUC. Moreover, we also observed an increased level of soluble DLA-DR in blood serum of lymphoma-bearing dogs in comparison to healthy controls.

WYKAZ SKRÓTÓW

AIDS - zespół nabytego niedoboru odporności (ang. acquired immunodeficiency syndrome)

APC - komórki prezentujące antygen (ang. antigen presenting cells) / allofikocyjanina

CD - antygen różnicowania komórkowego (ang. cluster of differentiation)

CDC - cytotoksyczność zależna od dopełniacza (ang. complement dependent cytotoxicity)

CFSE - ester sukcyνοimidu karboksylfluoresceiny (ang. carboxyfluorescein succinimidyl ester)

CLL - przewlekła białaczka limfatyczna (ang. chronic lymphocytic leukemia)

CHOP - doksorubicyna, winkrystyna, cyklofosfamid, prednizon (ang. Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin, Oncovin [vincristine], Prednisone)

DLA - psie antygeny leukocytarne (ang. dog leukocyte antigen)

DLBCL - chłoniak rozlany z dużych komórek B (ang. diffuse large B-cell lymphoma)

DMSO - dimetylosulfotlenek (ang. dimethyl sulfoxide)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

DHFR - reduktaza dihydrofolianowa (ang. dihydrofolate reductase)

EGFR - receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor Receptor)

ELISA - test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

ERK - kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. extracellular signal-regulated kinases)

FDA - Agencja Żywności i Leków (od ang. Food and Drug Administration)

FL - chłoniak grudkowy (ang. Follicular lymphoma)

GMALL - niemiecka grupa badawcza leczenia ostrych białaczek limfoblastycznych (ang. German Multicenter Study Group for Adult ALL)

HAT - hipoksantyna, aminopteryna, tymidyna

HEK - ludzkie embrionalne komórki nerki (ang. Human Embryonic Kidney)

HER2 - receptor ludzkiego czynnika wzrostu naskórka 2 (ang. human epidermal growth factor receptor 2)

HG-BCL - chłoniak B- komórkowy o wysokim stopniu złośliwości (ang. High Grade B-Cell Lymphoma)

HLA - ludzkie antygeny leukocytarne (ang. human leucocyte antigen)

HRP - peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish peroxidase)

HT - hipoksantyna, tymidyna

IL - interleukina

IPI - Międzynarodowy Indeks Prognostyczny (ang. International Prognostic Index)

JNK - kinazy c-Jun N-terminalne (ang. c-Jun N-terminal kinases)

LMP - chlorambucyl, metotreksat, prednizon (ang. Leukeran [chlorambucil], methotrexate, prednisone)

Mab - przeciwciało monoklonalne (ang. monoclonal antibody)

MACOP - metotreksat, doksorubicyna, cyklofosfamid, winkrystyna, prednizon (ang. methotrexate with leucovorin rescue, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone),

MALT - pozawęzłowy chłoniak strefy brzeżnej (ang. mucosa associated lymphoid tissue lymphoma)

MAPK - kinazy aktywowane mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinases)

MCL - chłoniak z komórek płaszczka (ang. mantle cell lymphoma)

MHC - główny układ zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)

MFI - średnia intensywność fluorescencji (ang. mean fluorescence intensity)

MTS - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)

MTX - metotreksat

MZL - chłoniak strefy brzeżnej (ang. marginal zone lymphoma)

NOD/SCID - mysz z cukrzycą niepowodującą otyłości, z ostrym, złożonym upośledzeniem odporności (ang. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency)

NHL - chłoniak nieziarniczny (ang. Non-Hodgkin lymphoma)

PBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy

PEI - polietylenoimina

RNA - kwas rybonukleinowy

sHLA-DR - rozpuszczalne HLA-DR (ang. soluble HLA-DR)

SLL - chłoniak z małych limfocytów (ang. small lymphocytic lymphoma)

SPF - wolne od patogenów (ang. Specific Patogen Free)

TCR - receptor komórki T (ang. T-cell receptor)

TMB - tetrametylobenzydyna

TNF - czynnik martwicy nowotworu (ang. tumor necrosis factor)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organisation)

1 Wstęp

1.1 Wprowadzenie

Choroby nowotworowe są wciąż jednym z największych wyzwań medycyny i jedną z głównych przyczyn zgonów. Mimo znacznych postępów w diagnostyce i leczeniu wciąż znaczna część nowotworów pozostaje nieuleczalna i corocznie z tego powodu na świecie umiera prawie 10 milionów osób. Cały czas ogromna liczba ośrodków badawczych pracuje nad lepszym zrozumieniem mechanizmów nowotworzenia, a także coraz to nowszymi metodami terapii, coraz częściej wykorzystując leki biologiczne, immunoterapie czy genetyczne modyfikacje komórek pacjenta.

Według IARC (ang. International Agency Research on Cancer) w roku 2018 zdiagnozowano ponad milion pacjentów z nowotworami komórek układu odporności z czego ponad 500 tys. to chłoniaki nieziarnicze. Jednocześnie w zeszłym roku na tą chorobę zmarło prawie 250 tys. osób.

Rituximab, (humanizowane mysie przeciwciało monoklonalne swoiste wobec antygenu CD20), który zrewolucjonizował leczenie chłoniaków i niektórych białaczek jest nieskuteczny w przypadku około 30-60% tych schorzeń (w zależności od typu nowotworu u pacjentów wcześniej nieleczonych) [1], więc wciąż istnieje ogromna potrzeba poszukiwania nowych celów terapii.

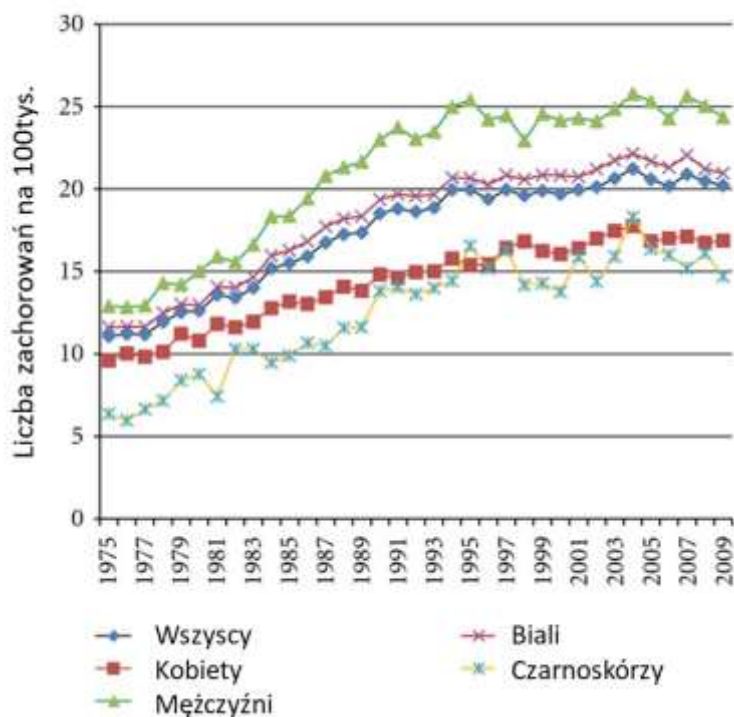
Głównym modelem zwierzęcym do badań przedklinicznych nowych leków jest mysz domowa (*Mus musculus*), która nie jest jednak idealnym modelem z powodu rzadkiego spontanicznego występowania chłoniaków oraz zupełnie innego przebiegu choroby oraz różnic w typach histologicznych chłoniaków [2], [3]. Dużo bardziej zbliżonym do człowieka ze względu na środowisko życia, rozmiary czy spontaniczność rozwoju nowotworów jest pies (*Canis lupus familiaris*), u którego chłoniaki występują ze zbliżoną częstością jak u ludzi. Również u psów stosuje się podobne schematy chemioterapii jak u ludzi, jednak u psów z powodu obniżonych dawek używanych cytostatyków, w zasadzie nigdy nie obserwuje się wyleczenia, a jedynie czasową remisję choroby. W samych Stanach Zjednoczonych jest ponad 70 milionów psów

i corocznie jest wydawane ok. 40 miliardów dolarów na ich leczenie, które często okazuje się niewystarczająco skuteczne [4].

1.2 Chłoniaki

Chłoniaki to choroby nowotworowe, w których następuje nieprawidłowy rozrost komórek układu limfoidalnego (chłonnego). Zasadniczo najczęściej chłoniak umiejscawia się w węzłach chłonnych, jednak często rozwija się również w śledzionie, ścianie przewodu pokarmowego czy skórze. Istnieje kilkadziesiąt rodzajów chłoniaków oraz wiele sposobów ich klasyfikacji. Podstawowym podziałem u ludzi jest rozdzielenie chłoniaków na ziarnicę czyli chłoniaka Hodgkina charakteryzującego się obecnością komórek Reeda-Sternberga i bardzo ostrym przebiegiem oraz chłoniaków nieziarnicznych – NHL (ang. non-Hodgkin lymphoma), które mogą wywodzić się z różnych typów komórek, mieć różne umiejscowienie i stopień złośliwości. U ludzi najczęściej występujące typy NHL to chłoniaki B-komórkowe, które stanowią prawie 90% wszystkich przypadków. Najczęściej występujące odmiany NHL to chłoniak rozlany z dużych komórek B - DLBCL (ang. diffuse large B-cell lymphoma) oraz chłoniak grudkowy (ang. follicular lymphoma). Rzadziej występujące odmiany to pozawęzłowy chłoniak strefy brzeżnej – MALT (ang. mucosa associated lymphoid tissue lymphoma), chłoniak z komórek płaszczka (ang. Mantle Cell Lymphoma), chłoniak Burkitta, chłoniak śródpiersia z dużych komórek B, chłoniak węzłowy strefy brzeżnej, chłoniak z małych limfocytów B, chłoniak limfoplazmocytowy. Jedynie 1 na 10 chłoniaków nieziarnicznych to chłoniaki T-komórkowe takie jak chłoniak z obwodowych komórek T, chłoniaki skórne - w tym ziarniniak grzybiasty i zespół Sézar’ego, czy chłoniak anaplastyczny z dużych komórek T lub chłoniaki limfoblastyczne.

Zachorowalność na chłoniaki wynosi wg różnych źródeł od kilku do kilkunastu przypadków na 100 000 osób [5], [6] i od kilkadziesiątu lat utrzymuje tendencję wzrostową. Na Rysunku 1 pokazano, że od lat 70’ XX wieku liczba zachorowań u mężczyzn zwiększyła się około dwukrotnie.



Rysunek 1 Liczba zachorowań na chłoniaki w USA [źródło [7]].

1.3 Chłoniaki u psów

Spośród wszystkich chorób występujących u psów w dzisiejszych czasach, jedną z głównych przyczyn śmiertelności, obok chorób zakaźnych, są choroby nowotworowe, z których rozrosty limfoproliferacyjne stanowią nawet 30%. Zapadalność psów na chłoniaki o cechach analogicznych do NHL (cNHL) jest szacunkowo zbliżona lub większa niż u ludzi i wynosi ok. 20–100/100 000 psów [8]–[10].

U psów również częściej występują chłoniaki B-komórkowe, które stanowią ok. 70% przypadków, z czego głównie są to chłoniaki o cechach ludzkich chłoniaków DLBCL. Ciekawostką jest fakt, że u psów występuje duża zmienność rasowa i w zależności od rasy proporcje typów chłoniaków wyglądają bardzo różnie. U psów rasy Husky w zasadzie nie występuje typ B, a u Dobermanów typ T-komórkowy.

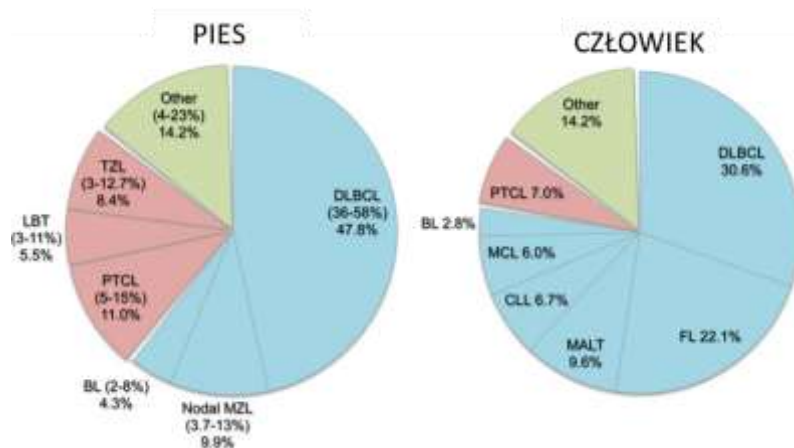
Różnorodność cNHL jest praktycznie taka sama jak u ludzi, więc trwają prace nad ujednoceniem systemu nazewnictwa i klasyfikacji, dążąc do standardów wyznaczonych dla ludzkiej systematyki przez Światową Organizację Zdrowia (ang. WHO). Wciąż prowadzone są prace nad mechanizmami powstawania nowotworów u tych zwierząt i porównania ich do mechanizmów występujących u ludzi.

U zwierząt jako podstawowy schemat leczenia chłoniaków stosuje się chemioterapię, która jest stosowana w dawkach suboptymalnych, ze względu na występujące efekty uboczne, co skutkuje znikomym stopniem wyleczalności i śmiercią ponad 75% zwierząt w przeciągu 2 lat od diagnozy.

1.4 Wykorzystanie psa jako modelu spontanicznych chłoniaków

Modele zwierzęce są nieocenioną pomocą w zrozumieniu etiopatogenezy chorób jak również w testowaniu nowych terapii. Najpopularniejszym wykorzystywanym w nauce zwierzęciem modelowym jest mysz, jednak model ten posiada wiele ograniczeń. Począwszy od zupełnie innych od człowieka rozmiarów ciała, trybu i środowiska życia, a kończąc na wykorzystywaniu do badań zwierząt osłabionych, pozbawionych układu odporności bądź zmodyfikowanych genetycznie. W związku z hodowlą w warunkach SPF (ang. specific pathogen free) myszy są pozbawione naturalnej flory bakteryjnej, typowej dla myszy dziko żyjących, a ich mikrobiom może się różnić w zależności od konkretnego laboratorium, co może wpływać na odpowiedź na leczenie [3]. Dodatkowo, różnice w farmakokinetyce wielu leków pomiędzy człowiekiem a myszą ogranicza użycie tego modelu do badania wielu nowych terapii [11].

Podobieństwo genetyczne człowieka do psa jest zdecydowanie większe niż do myszy. Ponadto pies dzieli z człowiekiem miejsce życia, może stykać się z tymi samymi mikroorganizmami, i warunkami środowiska. Wykazano kilkaset chorób, które występują zarówno u człowieka jak i psów w tym wiele nowotworów, które u psów występują spontanicznie [4]. Chłoniaki wykazują ponadto wysokie podobieństwo morfologii i cech klinicznych do chłoniaków ludzkich [4].



Rysunek 2 Częstość występowania danego typu chłoniaka u psów i ludzi [źródło [12]].

1.5 Leczenie ludzkich chłoniaków nieziarniczych

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat, tak jak w całej medycynie, w leczeniu chłoniaków nastąpiło wiele przełomów. Od lat 70' głównym schematem leczenia było CHOP czyli chemioterapia składająca się z kombinacji doksorubicyny, winkrystyny, cyklofosfamidu oraz prednizonu. Kamieniem milowym było powstanie i wykorzystanie w terapii leku rituximab – humanizowanego przeciwciała anty CD20. Jest to pierwsze przeciwciało monoklonalne zatwierdzone do użycia w onkologii przez FDA w roku 1997 i Europejską Agencję Leków rok później. To chimeryczne ludzko-mysie przeciwciało, rozpoznające cząsteczkę CD20, która znajduje się na limfocytach B, w tym na ponad 90% wszystkich B-komórkowych NHL. Rituximab wykazuje cytotoksyczność zależną od dopełniacza, komórkową, a także bezpośrednio wywołuje apoptozę komórek. W schemacie R-CHOP w przypadku DLBCL około 90% pacjentów odpowiada na leczenie, a u 60% następuje całkowita remisja [13]. Poza pacjentami, którzy w ogóle nie reagują na rituximab istnieje też grupa przypadków, u której rozwija się oporność na ten lek. Przyczyn tej oporności może być wiele – zablokowanie ścieżek cytotoksyczności, apoptozy czy też utracenie antygenu przez komórki docelowe. Częściowo udaje się uniknąć oporności poprzez dołączenie do terapii dodatkowych preparatów wspomagających [13]. Powstały również nowsze generacje przeciwciał anty CD20 takie jak Obinutuzumab, który jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym podklasy IgG1 otrzymywanym poprzez humanizację mysiego przeciwciała macierzystego B-Ly1

czy ludzki przeciwciało Ofatumumab. Wytworzono ponadto koniugaty przeciwciał anty CD20 - Ibritumomab tiuxetan połączony z itrem i indem oraz Tositumomab I-131 skoniugowany z jodem[14].

Bardzo ważnym kierunkiem, w którym rozwijają się badania nad nowymi lekami są ADC czyli koniugaty przeciwciało- lek (ang. antibody-drug conjugate). Głównie chodzi o połączenia z chemioterapeutykami jak na przykład brentuksymab vedotin czyli połączenie przeciwciała anty CD30 z aurystatyną. Koniugacja umożliwi obniżenie dawki leku oraz jego precyzyjne kierowanie do docelowego miejsca działania. Dzięki temu można znacząco ograniczyć efekty uboczne cytostatyków [15].

Innymi rewolucyjnymi lekami w leczeniu chłoniaków były drobnocząsteczkowe inhibitory enzymów - bortezomib inhibitor proteasomu zatwierdzony w roku 2006 w terapii chłoniaka komórek płaszczka oraz worinostat inhibitor deacetylazy histonowej zatwierdzony rok później w leczeniu skórniego chłoniaka T- komórkowego. Aktualnie wykorzystuje się w leczeniu chłoniaków cały panel przeciwciał i immunoterapii (Tabela 1).

Jednocześnie dokonała się duża zmiana w diagnostyce chłoniaków. W 1974 roku Klasyfikacja Kiel'a opierała się głównie cytologii i immunohistochemii, aktualnie według WHO potrzebna jest znajomość nie tylko morfologii i cech klinicznych, ale również immunofenotypu i profilu genetycznego [16]. Coraz większą rolę odgrywa analiza cytofluorymetryczna a także coraz popularniejsza metoda sekwencjonowania nowej generacji.

Tabela 1 Przeciwciała stosowane w terapii chłoniaków [na podstawie [17]]

Rodzaj	Nazwa	Cel	Wskazania
Immunoterapia			
Przeciwciała	Alemtuzumab (Lemtrada)	CD52	CLL/SLL
	Brentuximab vedotin (Adcetris)	CD30	LBCL- ALK+, DLBCL
	Camidanlumab Tesirine (ADC- 301)	CD25	DLBCL
	Dacetuzumab	CD40	B-NHL
	Lucatumumab	CD40	CLL/SLL
	Obinutuzumab (Gazyva)	CD20	B-NHL
	Ofatumumab (Arzerra)	CD20	FL B-NHL
	Polatuzumab Vedotin (DCDS4501A)	CD79b	FL, DLBCL, B-NHL
	Rituximab (Mabthera)	CD20	CLL/SLL, LPL,FL, MZL, MCL, DLBCL, HG-BCL
	Ublituximab (TG- 1101)	CD20	B-NHL
Przeciwciała bispecyficzne	AFM13	CD30/CD16A	DLBCL
	Blinatumomab (Blincyto)	CD19/CD3	DLBCL
	DART	CD19/CD3	DLBCL
	Mosunetuzumab (BTCT4465A)	CD20/CD3	CLL/SLL, iNHL

1.6 Przeciwciała jako leki biologiczne

Ponad 100 lat temu w roku 1890 Kitasato i Behring po raz pierwszy wykorzystali działanie przeciwciał i pokazali, że surowica świnek morskich immunizowanych toksyną błonicy stanowi ochronę przed toksyną dla nietraktowanych świnek. W 1891 rozpoczęto testy kliniczne tej metody w szpitalu Charite w Berlinie, a 11 lat później Behring otrzymał za to nagrodę Nobla. Do końca lat 30' z użyciem surowicy leczyło się nie tylko błonicę, ale także zapalenie opon mózgowych i zapalenie płuc.

Nowa era rozpoczęła się wraz z wynalezieniem przeciwciał monoklonalnych w roku 1975 przez Köhlera i Milsteina. Metoda fuzji i wytwarzania hybrydom jest stosowana na całym świecie do dziś. Pierwsze zastosowane w medycynie przeciwciało monoklonalne to OKT skierowane przeciwko cząsteczce CD3 ϵ , wykorzystywane u pacjentów po przeszczepach. Z uwagi na myślą sekwencję aminokwasową powodowało jednak odpowiedź przeciwko lekowi. Od tamtego czasu, w pełni humanizowane przeciwciała można uzyskać poprzez stosowanie technik „phage display” oraz w zmodyfikowanych genetycznie myszach niosących ludzkie geny immunoglobulinowe [18]. Wynikiem takiego podejścia było uzyskanie między innymi przeciwciała Adalimumab, które było pierwszym w całości ludzkim przeciwciałem skierowanym wobec TNF α zarejestrowanym w 2002 roku oraz 4 lata później Vectibix, który powstał w humanizowanej myszy, a jego epitop występuje na cząsteczce EGFR [18]. Aktualnie istnieje prawie 100 przeciwciał zatwierdzonych przez FDA jako leki biologiczne dopuszczone do terapii, a kolejne są w fazie testów przedklinicznych. „Wielka 5” czyli Avastin (aVEGF α), Herceptin (aHER2/neu), Humira (aTNF α), Remicade (aTNF α) oraz rituximab (aCD20) są jednymi z najważniejszych i najbardziej przełomowych leków.

1.7 Leczenie psów

Chłoniaki u psów są chorobą nieuleczalną, więc leczenie traktuje się jako wydłużenie czasu życia z jak najdłuższym czasem remisji. Leczenie zwierząt nie może skutkować takim nasileniem skutków ubocznych jak chemioterapia u ludzi, więc dostosowuje się dawki w celu akceptowalnego

komfortu życia zwierzęcia. Typowym schematem leczenia psów jest, podobnie jak u ludzi, schemat CHOP, jak również L-asparaginaza czy cytarabina w przypadku zajęcia przez nowotwór szpiku kostnego [19], [20]. Około 80% psów odpowiada na leczenie, niestety remisja zazwyczaj trwa jedynie od 6 do 11 miesięcy [20].

W medycynie weterynaryjnej już od pewnego czasu próbuje się również wykorzystywać przeciwciała monoklonalne. Jednymi z pierwszych przeciwciał o potencjale terapeutycznym skierowanych przeciwko psim komórkom nowotworowym były te uzyskane przez zespół Steplewskiego [21]. Otrzymano 6 przeciwciał z czego 5 wykazywało reaktywność tylko wobec psiej linii limfoidalnej 17-71. Jedno z nich CL/MAB 231 weszło do fazy testów i okazało się skuteczne w badaniach in vivo [19], [22].

Na fali odkrycia rituximabu, który niestety nie wykazuje powinowactwa do psiej cząsteczki, powstało również Mab anty psie CD20 - 6C8, które nie wykazywało bezpośredniej, ani zależnej od dopełniacza cytotoksyczności, jedynie wzmagало fagocytozę przez makrofagi [23]. Kolejnym powstałym preparatem jest kaninizowane przeciwciało 1E4, które było jedynie testowane na zdrowych psach rasy Beagle [24] oraz w połączeniu z blokadą cząsteczki CD47, gdzie dało pozytywne rezultaty w testach in vitro oraz in vivo w mysim modelu ksenoprzeszczepu linii CLBL1. Uzyskano tam bardzo obiecujące wyniki wydłużenia czasu przeżycia lub nawet całkowitej eradykacji komórek nowotworowych u 50% myszy [25].

W 1996 firma Aratana therapeutics była w trakcie badań nad dwoma przeciwciałami Blontress (CD20) i Tactress (CD52) lecz z powodu braku satysfakcjonujących wyników, prace zostały przerwane. Powstało również w pełni kaninizowane przeciwciało anty NGF, które dawało obiecujące rezultaty w redukcji bólu w przebiegu kostniakomięsaka [26], [27] oraz przeciwciało anty-EGFR, kaninizowana wersja preparatu Cetuximab, wykorzystywana głównie w leczeniu raka jelita grubego. Aktualnie jedynym powszechnie stosowanym przeciwciałem monoklonalnym w medycynie weterynaryjnej pozostał Lokivetmab anty-IL 31, który jest stosowany w leczeniu atopowego zapalenia skóry.

1.8 Metotreksat (MTX)

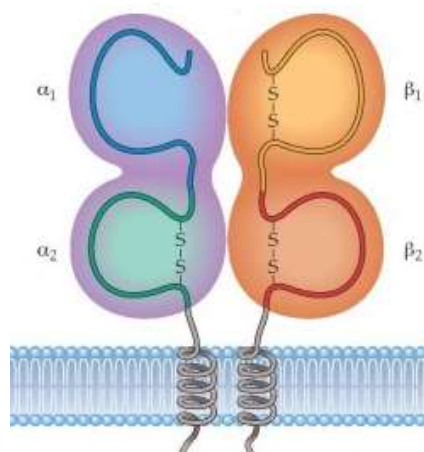
Od końcówki lat 40' kiedy pokazano, że antyfoliany mogą powodować remisję choroby u dzieci z ostrą białaczką, antagoniści kwasu foliowego są ważnymi preparatami w leczeniu przeciwnowotworowym. MTX czyli kwas 4-amino-4-deoksy-N10-metylofoliowy jest analogiem kwasu foliowego. Działa poprzez inhibicję reduktazy dihydrofolianowej (DHFR), co powoduje niedobór tetrahydrofolianów niezbędnych do syntezy DNA i RNA [28]. Jest to jeden z najpopularniejszych i najszerzej stosowanych chemioterapeutyków, używany do leczenia chłoniaków, białaczek, nowotworów głowy i szyi, raka kosmówki i wielu innych nowotworów a także chorób autoimmunologicznych takich jak reumatoidalne zapalenie stawów czy łuszczyca oraz jako prewencja przed chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi. W latach 80' metotreksat był często wykorzystywany w schemacie MACOP (metotreksat, dokсорubicyna, cyklofosamid, winkrystyna, prednizon) do leczenia chłoniaków [29]–[31]. Aktualnie bywa używany w połączeniu z rituximabem w protokole GMALL w przypadku chłoniaka Burkitta [32].

U psów metotreksat jest również stosowany jako składnik chemioterapii głównie w leczeniu chłoniaków, białaczek, raków sutka i pęcherza oraz kostniakomięsaków, często w schemacie LMP (chlorambucil, metotreksat, prednizon) [33].

Jak zostało wspomniane w Rozdziale 1.5 koniugaty przeciwciał z cytostatykami stają się coraz popularniejszą formą przeciwnowotworowych preparatów biologicznych. Już w latach 80' powstały pierwsze koniugaty metotreksatu z przeciwciałami swoistymi wobec antygenów na powierzchni komórek raka jelita grubego oraz wobec receptora transferyny [34]. Umożliwiło to znaczne zmniejszenie dawki i bardziej precyzyjne dostarczenie chemioterapeutyku do miejsca wzrostu komórek nowotworowych. Ponieważ koniugacja metotreksatu z przeciwciałem jest stosunkowo prosta [35], umożliwia to stworzenie preparatu o odpowiednim stopniu podstawienia, tak aby nie stracił możliwości wiązania z antygenem docelowym, a jednocześnie miał jak najlepsze właściwości cytotoksyczne.

1.9 HLA-DR jako cel terapii

Ze względu na możliwą rozwijającą się w trakcie leczenia oporność komórek nowotworowych na cytotoksyczny efekt przeciwciała anti-CD20, a także istnienie chłoniaków pozbawionych ekspresji antygeny CD20, cały czas trwają poszukiwania nowych celów terapeutycznych. Od lat 80' za potencjalny cel terapii uznaje się cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC-II ang. Major histocompatibility complex). MHC-II ulega ekspresji na wysokim poziomie na większości chłoniaków B-komórkowych. Jest to wysoce polimorficzny antygen składający się z dwóch niekowalencyjnie połączonych łańcuchów α i β . Łańcuch α ma masę ok. 30-34 kDa, a łańcuch β ma masę ok. 26-29 kDa. Każdy z łańcuchów zawiera 2 domeny immunoglobulinowe oraz fragment przezbłonowy [36].



Rysunek 3 Budowa MHC-II [<https://microbeonline.com/difference-mhc-class-mhc-class-ii-proteins/>]

MHC-II odpowiada za prezentację antygenów limfocytom pomocniczym CD4⁺ przez profesjonalne komórki prezentujące antygen. Stworzenie kompleksu MHC-II – receptor TCR pozwala na aktywację limfocytu T.

Konstytutywnie MHC-II ulega ekspresji na limfocytach B, monocytach/makrofagach, komórkach dendrytycznych oraz komórkach nabłonkowych grasicy. Wysoki poziom interferonu może

ponadto powodować indukcję ekspresji MHC-II na innych typach komórek takich jak limfocyty T czy komórki śródbłonna naczyń [36].

Geny kodujące MHC-II są wysoce polimorficzne i dają ponad 20 tysięcy możliwych kombinacji alleli [37].

1.9.1 Przeciwciała anty HLA-DR

W 1987 Bridges ze współpracownikami wytworzyli mysie przeciwciało MK-D6 [38] i wykazali, że połowa myszy obarczonych nowotworem – (nastrzyknięcie komórkami L10A), która otrzymywała przeciwciało MK-D6 została wyleczona.

Kilka lat później testowano grupę przeciwciał [39] rozpoznających różne antygeny obecne na chłoniakach B-komórkowych. Badano przeciwciała anty CD19, CD20, CD21, CD37, CD38, CD40 oraz panel przeciwciał swoistych wobec HLA-DR i wykazano największą cytotoksyczność komórkową wywoływaną właśnie przez przeciwciała anty HLA.

Z kilku powstałych przeciwciał rozpoznających MHC-II, trzy z nich zostały wykorzystane w badaniach klinicznych. Lym-1 – mysie przeciwciało monoklonalne otrzymane w wyniku immunizacji myszy komórkami Raji, które rozpoznaje konformacyjny epitop na wielu podtypach HLA-DR. Niestety wykazywało niską skuteczność w testach klinicznych. Pod koniec lat 90 wykonano również próby kliniczne chimerowego koniugatu tegoż przeciwciała z radionuklidami, które wykazywały większą efektywność w zwalczaniu chłoniaków. Aktualnie trwają prace nad technologią CAR T wykorzystującą to przeciwciało [40], [41]. Kolejnym przeciwciałem 1D10 rozpoznające epitop na łańcuch beta HLA-DR, które w wersji humanizowanej funkcjonuje pod nazwą Apolizumab (Hu1D10). Wykazuje ono cytotoksyczność zależną od dopełniacza, zależną od komórek żernych oraz bezpośrednią indukcję apoptozy. Przeciwciało weszło do badań klinicznych, niestety z powodu braku oczekiwanych rezultatów oraz poważnych efektów ubocznych, prace zostały porzucone w roku 2005 [42].

1.9.2 Przeciwciało L243

Jednym z najbardziej obiecujących przeciwciał terapeutycznych, swoistych wobec MHC-II jest obecnie L243 - otrzymane w latach 80' mysie przeciwciało monoklonalne rozpoznające konformacyjny epitop łańcucha α cząsteczki HLA-DR. Również wykazuje ono cytotoksyczność bezpośrednią i zależną od dopełniacza. Wykazano mechanizm pobudzania apoptozy przez mAb L243, który jest zależny od kinazy AKT, białka Fas oraz kinaz JNK i ERK. Ponieważ podejrzewa się, że za efekty uboczne przeciwciał odpowiada głównie cytotoksyczność zależna od dopełniacza oraz komórkowa, stworzono dwie humanizowane wersje tego przeciwciała o różnych izotypach. Pierwsza to hL243 γ 1 o izotypie IgG1/ κ , natomiast druga hL243 γ 4P o izotypie IgG4/ κ nazwana później IMMU-114. Zmiana izotypu przeciwciała humanizowanego powodowała brak cytotoksyczności zależnej od dopełniacza oraz komórek NK, co w założeniu miało skutkować znacznie mniejszymi skutkami ubocznymi, zachowując przy tym właściwości obniżania proliferacji oraz bezpośrednią indukcję apoptozy [43], [44]. W celu określenia aktywności przeciwnowotworowej przeprowadzono również testy porównujące IMMU-114 do innych przeciwciał stosowanych w terapii chłoniaków (rituximab, milatuzumab, epratuzumab i veltuzumab), w których pokazano, że IMMU-114 wykazuje najwyższą skuteczność [43]. Poskutkowało to próbami klinicznymi w latach 2013-2017, które pokazały efektywne działanie terapii w 50% przypadków, a podskórne podanie znacząco obniżyło występowanie skutków ubocznych obserwowanych podczas wlewów dożylnych [45]. Innym sposobem na wykorzystanie przeciwciała L243 było wytworzenie bispecyficznego CD20-243 CrossMab, które jest połączeniem klasycznego rituximabu i hL243 γ 1 i które wykazało istotną statystycznie przewagę zarówno nad samym rituximabem jak i i L243, w postaci zwiększonego czasu przeżycia myszy nastrzykniętych komórkami Raji, które leczono wyżej wymienionymi preparatami [46].

Humanizowane przeciwciało L243, czyli IMMU-114 w celu poprawienia jego aktywności przeciwnowotworowej zostało również skoniugowane preparatem SN-38. Jest to metabolit irynotekanu, który jest lekiem przeciwnowotworowym z grupy inhibitorów topoizomerazy I. Inne koniugaty SN-38 - sacituzumab govitecan oraz labetuzumab govitecan testowane w terapii guzów litych dają bardzo obiecujące wyniki i są dobrze tolerowane [47], [48].

Przed próbami na ludziach wykonano również testy L243 na psach, które były istotne by przenieść testy IMMU-114 do prób klinicznych. Wykonano testy *in vitro* pokazujące cytotoksyczność na świeżych aspiratach z powiększonych węzłów chłonnych od psów cierpiących na chłoniaki B-komórkowe, a następnie wykonano testy efektów ubocznych na psach zdrowych a także na psach chorych, głównie w celu ewaluacji działań ubocznych. Zaobserwowano odpowiedź na leczenie w postaci stabilizacji choroby w przypadku dwóch psów. U pozostałych testowanych psów chłoniaki nie posiadały antygeny DLA-DR lub zwierzęta były w stadium terminalnym choroby, co uniemożliwiało rzetelną ewaluację skuteczności terapii. Dodatkowo, powinowactwo przeciwciała L243 wobec psich antygenów DLA-DR jest znacznie niższe niż wobec ludzkich cząsteczek HLA-DR (badania własne), co uniemożliwia pełną ocenę potencjału tych antygenów jako celu terapii przeciwnowotworowej.

1.10 Biomarkery chłoniaków

Od roku 1993 istnieje Międzynarodowy Indeks Prognostyczny chłoniaków nieziarniczych (IPI ang. International Prognostic Index), który przewiduje rokowania dla danego pacjenta na podstawie stopnia zaawansowania choroby Ann Arbor (system biorący pod uwagę stopień rozszania ognisk nowotworowych), wieku, poziomu dehydrogenazy mleczanowej w surowicy krwi, sprawności oraz ilości pozawęzłowych ognisk choroby. Istnieją natomiast doniesienia, że ten system posiada pewne braki i cały czas trwają prace nad jego ulepszeniem i poszukiwaniem łatwych i tanich do oznaczania markerów. Istnieje wiele cząsteczek, które są badane pod względem korelacji z przebiegiem chłoniaków. Powstały badania pokazujące, że podwyższony poziom krążących immunostymulujących markerów takich jak CD27, sCD30, wiąże się z wyższym prawdopodobieństwem wystąpienia nowotworów układu immunologicznego [49], [50]. Pokazano również, że ilość krążącego fibrynogenu może być powiązana ze stopniem zaawansowania nowotworu, mimo braku korelacji z czasem przeżycia [51], tak samo jak MCP-1, eotaksyna, IL-10 and IL-6 [52]. Ważnym markerem jest również kinaza tymidynowa, której poziom ekspresji u psów ze złośliwą postacią chłoniaków jest od 2 do 180 razy wyższy niż u zwierząt kontrolnych [53].

1.11 Rozpuszczalne formy HLA-DR

Od lat 70' wiadomo o istnieniu krążącej we krwi, a także obecnej w innych płynach ustrojowych rozpuszczalnej formie HLA-DR (sHLA-DR), która pełni funkcję immunoregulatorową. Wykazano też zmieniony poziom sHLA-DR w wielu chorobach – infekcjach wirusowych, stanach zapalnych, chorobach autoimmunologicznych i nowotworowych. Stężenie sHLA-DR w osoczu krwi zdrowego człowieka może wynosić od 0,02 do nawet 1400ng/ml w zależności od źródeł [54], [55]. Kilka grup zaobserwowało podwyższenie ekspresji sHLA-DR wśród grup chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, astmę czy w przypadku patologicznej ciąży, AIDS i zapalenia wątroby typu C [37], [55]–[57]. W przeciwieństwie do rozpuszczalnych form MHC-I, które występują tylko w osoczu krwi, cząsteczki sHLA-DR występują też w moczu, ślinie, pocie, spermie i łzach. Źródłem tych cząsteczek może być proces „zrzucania” (ang. shedding) z powierzchni komórek i/lub aktywnego ich wydzielania przez komórki jako składniki egzosomów lub mikropęcherzyków [37].

Wiele badań *in vitro* pokazuje, że profesjonalne komórki prezentujące antygen (APC), limfocyty B, a także komórki nowotworowe wydzielają egzosomy zawierające duże ilości cząsteczek sMHC-II. Hassan i współautorzy wykazali, że poziom sHLA-DR w osoczu krwi pacjentów z ostrą białaczką szpikową jest 5 krotnie wyższy niż u grupy kontrolnej [58], a także koreluje on ze stanem zapalnym w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc [59]. Odwrotna korelacja jest obserwowana u pacjentów z czerniakiem, u których poziom sHLA-DR jest niższy niż u pacjentów zdrowych [60].

2 Cel pracy

Celem pracy było wytworzenie i charakterystyka mysich oraz chimerowych mysio-psich przeciwciał monoklonalnych, które rozpoznawałyby antygeny powierzchniowe obecne na komórkach psich chłoniaków B-komórkowych i wykazywałyby bezpośrednie oraz zależne od układu odporności funkcje cytotoksyczne.

Celami cząstkowymi były:

1. Uzyskanie stabilnych linii hybrydom wydzielających przeciwciała swoiste wobec psich limfoidalnych linii komórkowych, a następnie oczyszczenie i charakterystyka tych przeciwciał.
2. Określenie specyficzności przeciwciał na modelach komórkowych *in vitro* oraz na materiale biologicznym uzyskanym z psów.
3. Określenie cytotoksyczności uzyskanych przeciwciał na różnych liniach komórkowych.
4. Określenie epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała.
5. Wykonanie testu umożliwiającego względne ilościowe określanie ilości DLA-DR w różnych rodzajach próbek.
6. Amplifikacja i klonowanie cDNA kodujących przeciwciała mysie oraz wytworzenie przeciwciała kaninizowanego.
7. Określenie cytotoksyczności koniugatu przeciwciała z metotreksatem (MTX) w modelach *in vitro*.
8. Wykazanie aktywności przeciwnowotworowej przeciwciał i koniugatu przeciwciał z MTX w mysim modelu *in vivo*.

3 Materiały i metody

3.1 Materiały

3.1.1 Odczynniki

Odczynniki:	Firma:
Agaroza	Applied Biosystems
Alkohol etylowy 96%	POCH
Alkohol izopropylowy 99%	POCH
Ampicylina	Sigma
APS	POCH
Ligaza T4	EURX
DMSO	LabEmpire
Enzymy restrykcyjne Fast Digest	ThermoScientific
FBS	Gibco, EURX
Zestaw: Agarose out, PCR Clean-up	EURX
Glicyna	POCH
HAT	Sigma
HT	Sigma
EX-CELL 610-HSF	Sigma
FAST AP	Thermo Scientific

Kwas siarkowy	POCH
L-glutamina (200mM)	Thermo Scientific
Marker białkowy - GPB 260kDa prestained Multicolor	Genoplast
Perfect Plus 1 kb DNA Ladder	EURX
Metanol	POCH
Octan amonu	Sigma
Odwrotna transkryptaza - NG dART	EURX
PEG-1450	Sigma
Penicilina- Streptomycyna	Sigma
PMSF	Sigma
Pożywka LB MIX	BTL spółka
Platinum SuperFi	Thermo Scientific
Simply Safe	EURX
SDS	POCH
TEMED	Sigma
TMB	BioShop
Tris	POCH
β -merkaptoetanol	IITD
RNA Extracol	EURX
PureYield™ Plasmid Midiprep System	(Promega)

PEI	Sigma
Histopaque®-1077	Sigma
Adjuvant Freund	Sigma
Cząsteczki lentiwirusa ekspresjonujące lucyferazę	Ambio
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
Pierce Protein A Pierce Protein G	Thermo Scientific
Dopełniacz króliczy	Biovet Puławy
Vivo-Glo Lucyferyna	Promega

Bufory i pożywki	
Bufor TAE (50x stężony)	242 g Tris-base
	57,1 ml kwasu octowego
	100 ml 0,5 mM EDTA
	H ₂ O dest.do 1000ml
Bufor obciążający do elektroforezy DNA	40% sacharoza
	0,5% błękit bromofenolowy
	H ₂ O _{miliQ}

Podłoże stałe do hodowli bakteryjnych	LB +2% agarozą
Bufor Laemmli (5x)	10% SDS
	0,5% błękit bromofenolowy
	500mM DTT
	50% Glicerol
	250mM Tris-HCl pH 6,8
Bufor SDS (5x)	15,1g Tris
	50ml 10% SDS
	94g glicyna
	H ₂ O dest do 1000ml
Żel poliakrylamidowy rozdzielający	2,15ml MQ
	1,5ml 40% akrylamidu
	1,25ml Tris-HCl pH 8,8
	50 µl 10% SDS
	50 µl 10% APS
	5 µl TEMED
Żel poliakrylamidowy zagęszczający	1,83ml MQ
	0,325ml 40% akrylamidu
	0,325ml Tris-HCl pH 6,8
	25 µl 10% SDS

	25 μ l 10% APS
	5 μ l TEMED
Trypsyna (roztwór w PBS)	Trypsyna 0,25% + EDTA 0,02%
Kompletna pożywka DMEM + 10% FBS (100ml)	85 ml bazy DMEM
	10 ml FBS
	1 ml 0,007% β -merkaptoetanolu
	1 ml antybiotyków
	1 ml 200mM L-glutamina
	1 ml Non-essential amino acids
Bufor PBS	0,8% NaCl
	0,2% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
	0,02% KH_2PO_4
	0,02% KCl
Bufor fosfocytrynianowy, pH 5	25.7 ml 0.2 M Na_2HPO_4
	24.3 ml 0.1 M kwas cytrynowy
	50 ml H_2O dest.
Substrat do ELISY (roztwór TMB)	1 mg TMB rozpuszczony w 1ml DMSO
	9 ml buforu fosfocytrynianowego, pH 5
	2 μ l 30% H_2O_2
Bufor cytrynianowy, pH 3	3,5ml 0,1M cytrynian sodu

	46,5ml 0,1M kwas cytrynowy
	50 ml H ₂ O dest.

Przeciwciała i odczynniki do cytometrii przepływowej	
Anty-mysie CD45	eBioscience
Anty-mysie IgG PE	BioLegend
Anty-mysie IgG HRP	SantaCruz
Streptawidyna-APC	Thermo Scientific
CellEvent Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit	ThermoScientific
Anty psie IgG FITC	Sigma
Jodek propidyny	Sigma
Cell Trace	ThermoScientific

3.1.2 DNA

3.1.2.1 Wektory

pcDNA3.1 : wektor do ekspresji psiego i mysiego MHC-II w komórkach eukariotycznych

pVITRO1-neo-mcs (Invivogen): wektor bicystronowy do ekspresji kaninizowanego przeciwciała B5 w komórkach eukariotycznych

3.1.2.2 Startery oligonukleotydowe

W celu amplifikacji w reakcji PCR cDNA potrzebnych genów użyto następujących starterów zawierających miejsca restrykcyjne:

Tabela 2 Startery użyte do wytworzenia konstrukcji genowych do ekspresji powierzchniowej łańcuchów psich i mysich MHC-II: psiego DLA-DR i mysiego I-E (podkreślone miejsca restrykcyjne):

DLA-DR α	F: GCGGATCCATGACCATAAGTGGAGTCC R: GCCTCGAGTCAAAGAGGCCCTCGG
DLA-DR β	F: GCGGATCCGTCCTTTCTGTTTTCCAGC R: GCCTCGAGAGGAAGGTTTTTTCTTGAGGG
IEk α	F: GCAGGATCCATGCTCAGCCTCTGCCG R: GCATCTAGATCATAAAGGCCCTGGGTGTC
IEk β	F: GCAGGATCCATGTGGCTCCCCAGAGTTC R: GCATCTAGATCAGCTCAGGAGTCCTGTTG

Tabela 3 Startery użyte do uzyskania cDNA do konstrukcji kaninizowanego przeciwciała (H-łańcuch ciężki, L-łańcuch lekki, podkreślone miejsca restrykcyjne, pogrubione sekwencje komplementarne, łączące się w reakcji fuzyjnego PCR):

A: Część mysia

HE11	F: CTCCGGAATGGGATGGAGCTGGATC R: CGTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTTC
------	-------------------------------------------------------------------------

LE11	F: GCCAGATCTATGAGTGTGCCCACTC R : CTGGAGATGGTTGGAACAAGGATA CAGTTGGTGCAGC
HB5	F: CTTCCGGAATGGGATGGAGCTGGATC R: CGTGGTGGAGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGC
LB5	F: GCCAGATCTATGAGTGTGCCCACTC R : CTGGAGATGGTTGGAACAAGGATA CAGTTGGTGCAGC

B: Część psia

HCANIS	F: CTCAGCCTCCACCACG R: CAGGATCCTCATTTACCCGGAGAATGG
LCANIS	F: CTTGTTCCAACCATCTCCAG R: CACTTGCTAGCTTAGTCCACTCTCTGACACTCG

3.1.3 Bakterie

Do klonowania wykorzystano szczep bakterii *Escherichia coli* DH5 α

3.1.4 Linie komórkowe

1. **HEK 293T** (ang. *human emrionic kidney*): Linia komórkowa wyprowadzona z embrionalnych komórek ludzkiej nerki.
2. **Sp2/0-Ag14**: Linia komórkowa mysiego szpiczaka stworzona przez fuzję splenocytów myszy Balb/c i szpiczaka P3X63Ag8. Limfocyty B wrażliwe na selekcję w medium HAT, stosowane do fuzji w celu uzyskania hybrydom.
3. **CLBL1**: psi chłoniak B-komórkowy CD11a, CD79a+, CD45+, MHCII +
4. **CLB70**: psia białaczka B-komórkowa CD20+, CD45+, CD79a+, MHCII +
5. **GL-1**: psia linia białaczki B-komórkowej, CD45+, CD79a+, MHCII –
6. **CL-1**: psia linia chłoniaka grasicy
7. **CH89**: psia linia komórkowa komórek NK
8. **RAW 264.7**: mysia linia makrofagowa
9. **Raji** : ludzka linia B-komórkowa chłoniaka Burkitta

10. **CHO**: chomicza linia wyprowadzona z komórek nabłonkowych jajnika

3.1.5 Myszy

Uzyskanie przeciwciał: Mysz CD-1 Crl:CD1

Eksperymenty in vivo: Myszy NOD/SCID - NOD.CB17-*Prkdc^{scid}*/J JAX™: 001303 myszy charakteryzujące się brakiem limfocytów T oraz B, limfopenią i hipogammaglobulinemią.

3.1.6 Próbki biologiczne

Wszystkie próbki biologiczne: pełną krew, surowicę, próbki biopsji cienkoigłowych otrzymano jako odpady medyczne dzięki uprzejmości kliniki Neo-Vet i dr Wojciecha Hildebranda.

3.2 Metody

3.2.1 DNA

3.2.1.1 Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja

RNA było izolowane z użyciem odczynnika Renozol (EURX). Następnie uzyskane RNA zostało przepisane na cDNA z użyciem zestawu NG dART (EURX) według instrukcji producenta.

3.2.1.2 PCR

Wszystkie reakcje zostały wykonane z użyciem polimerazy Platinum SuperFi według instrukcji producenta. Temperatura przyłączania starterów została wyznaczana z użyciem kalkulatora na stronie producenta [<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>].

Produkty po wizualizacji na żelu agarozowym były izolowane za pomocą zestawu Agarose out (EURX).

3.2.1.3 Trawienie restrykcyjne

Produkty PCR bądź wektory były trawione za pomocą enzymów Fast Digest zgodnie z instrukcją producenta. Do linearyzacji wektorów na ostatnie 10 minut dodawano alkaliczną fosfatazę (FAST AP, Thermo Scientific). Następnie oczyszczane za pomocą zestawu PCR Clean up (EURX).

3.2.1.4 Klonowanie

Reakcja ligacji była prowadzona za pomocą ligazy T4 (EURX) z użyciem odpowiednio przygotowanych insertów i ok.100ng wektora w proporcji 3:1 przez całą noc w temperaturze 14°C.

3.2.1.5 Transformacja bakterii

Chemikompetentne bakterie DH5 α były poddane transformacji za pomocą szoku cieplnego. Do 50 μ l zawiesiny bakteryjnej umieszczonej na lodzie dodano 3 μ l reakcji ligacji, następnie inkubowano 20 minut na lodzie. Kolejno, przez 45 sekund inkubowano mieszaninę bakterii z DNA w temperaturze 42°C, przenoszono na lód, po 3 minutach dodawano pożywki LB i wytrząsano przez 45 minut w temp. 37°C. Następnie bakterie wysiewano na płytkę z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego.

3.2.1.6 Minipreparacja DNA

Wyrośnięte kolonie zaszczerpiono do 1ml LB z antybiotykiem, następnie zabezpieczono hodowlę w postaci zamrożonej hodowli w 10% glicerolu i wyizolowano plazmid za pomocą standardowej procedury lizy alkalicznej, a następnie strącania izopropanolem [61]. Następnie plazmidy trawiono restrykcyjnie i poddawano elektroforezie w żelu agorozowym w celu potwierdzenia obecności insertu.

3.2.1.7 Midipreparacja DNA

Kolonie bakteryjne zawierające plazmid z pożądanym insertem zostały namnożone w 100ml pożywki LB z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego, następnie plazmid został wyizolowany za pomocą zestawu odczynników PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega), a stężenie DNA plazmidowego zostało określone z użyciem aparatu NanoDropOne (Thermo Scientific).

3.2.2 Hodowla komórkowa

Wszystkie linie komórkowe były hodowane w inkubatorze o stałej temperaturze 37°C i 5% CO₂. Psie linie limfoidalne (CLBL1,CLB70, GL-1, CH89) były hodowane w pożywce RPMI z 15% cielęcej surowicy płodowej (FBS). Linia RAW 264.7 oraz HEK293T były utrzymywane

w pożywce DMEM z 10% FBS. Hybrydomy hodowano w pożywce EX-CELL 610-HSF w obecności 1-2% FBS. Selekcji hybrydom poświęcono dział 3.2.6.1.

3.2.3 Transfekcja

Komórki HEK 293T lub CHO na jeden dzień przed eksperymentem wysiewano na płytkach (125 tys. komórek na dołek płytki 24-dołkowej lub 500 tys. na dołek płytki 6-dołkowej). W dniu transfekcji zmieniono medium na DMEM z 5% FBS niezawierający antybiotyków. Do transfekcji zawieszono w soli fizjologicznej 1µg DNA, a następnie dodano 3µl PEI (na płytkę 24-dołkową). Mieszaninę inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie nakropiono na hodowlę.

3.2.4 Cytometria przepływowa

Jeśli nie zaznaczono inaczej, komórki barwiono przeciwciałami zawieszonymi w buforze FACS (2% FBS w PBS bez jonów wapnia i magnezu) lub supernatantem z nad hodowli hybrydoma na lodzie przez 30 minut, dwukrotnie płukano, następnie opcjonalnie barwiono koniugatem fluorescencyjnym przeciwciał drugiej warstwy (swoistym wobec immunoglobulin IgG mysich), również na lodzie przez 20 minut. Po płukaniu komórki zawieszano w 300µl buforu FACS i analizowano na cytometrze przepływowym FACSCalibur BD.

3.2.5 Izolacja PBMC

Komórki jednojądrzaste izolowano z psiej krwi za pomocą wirowania w gradiencie gęstości roztworu rozgałęzionych polisacharydów (Histopaque lub Ficoll). Rozpoczęto od dwukrotnego rozcieńczenia krwi buforem PBS, a następnie bardzo delikatnie nakrapiano krew na roztwór Histopaque 1077. Wirowano przez 20 minut z prędkością 1000rpm w temperaturze pokojowej z wyłączonym hamowaniem. Po rozdziale pobrano kożuszek leukocytarny, przepłukiwano buforem PBS i używano do dalszych eksperymentów.

3.2.6 Otrzymanie przeciwciał

3.2.6.1 Immunizacja myszy

Mysz CBA-1 hodowana w warunkach SPF została 3-krotnie dootrzewnowo nastrzyknięta (w odstępach 14 dniowych) zawiesiną komórek linii CLBL1 (po ok.5 mln) w niekompletnym

adjuwancie Freund'a. 3 dni po ostatnim podaniu antygeny mysz została poddana eutanazji, a śledziona była wykorzystana do fuzji splenocytów z komórkami mysiego szpiczaka Sp2.0.

Procedury były wykonywane za zgodą II lokalnej komisji etycznej we Wrocławiu, numer zgody 70/2015.

3.2.6.2 Fuzja

Z pobranej śledziona została przygotowana zawiesina komórek, która została następnie zmieszana w proporcji 5:1 z komórkami linii Sp2.0. Fuzja została przeprowadzona przez powolne nakrapianie 50% roztworu PEG-1450. Komórki po fuzji zostały zawieszona w medium EX-CELL z dodatkiem selekcyjnym HAT (hipoksantyna, aminopteryna, tymidyna) i rozłożona na 5 płytek 96-dółkowych.

3.2.6.3 Selekcja hybrydom

Po 10 dniach od fuzji przeprowadzono screening w celu wyłonienia hybrydom produkujących przeciwciała reaktywne wobec antygenów na powierzchni komórek CLBL1. Supernatant z każdego dołka zmieszano z komórkami CLBL1 i inkubowano 40 minut na lodzie. Następnie odpłukano i inkubowano z koniugatem fluorescencyjnym przeciwciała drugiej warstwy anty mysie IgG- PE (1:400). Analizę intensywności barwienia przeprowadzono za pomocą cytometrii przepływowej. Wybrano 10 klonów o największej intensywności fluorescencji. Następnie wybrane klony rozklonowano za pomocą szeregu rozcieńczeń i procedurę screeningu powtórzono.

3.2.6.4 Oczyszczanie przeciwciał

Przeciwciała izolowano z supernatantu za pomocą oczyszczania na mieszaninie białka A oraz białka G. Złóże umieszczono na kolumnie, następnie przepuszczono supernatant, wypłukano 10-krotną objętością kolumny buforem PBS, a następnie eluowano za pomocą buforu cytrynianowego o pH =3.

3.2.7 Barwienia linii komórkowych i bioptatów

W celu określenia reaktywności przeciwciał wykonywano standardowe barwienie cytofluorymetryczne [Rozdział 3.2.4] z zastosowaniem różnego stężenia przeciwciał. Jako drugą warstwę wykorzystywano koniugat anty mysie IgG PE. Do analizy była brana pod uwagę średnia intensywność fluorescencji (MFI).

3.2.8 Testy cytotoksyczne

3.2.8.1 Cytotoksyczność zależna od dopełniacza (CDC)

Supernatant bądź oczyszczone przeciwciało inkubowano z daną linią komórkową przez 40 minut na lodzie. Następnie komórki odpłukano w buforze FACS i zawieszono w 0,5 ml medium RPMI z dopełniaczem króliczym (1:20) i inkubowano przez 45 minut w 37°C. Następnie komórki odpłukano, zabarwiono jodkiem propidyny (0,2µg/ml) i przeanalizowano na cytometrze. Określano odsetek komórek martwych.

3.2.8.2 Test MTS

40 tys. komórek posadzono na płytce 96-dołkowej, a następnie stymulowano przeciwciałem bądź kombinacją przeciwciał. Po 48 godzinach dodano 20µl CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) i po 60 minutach odczytano absorbancję przy 490nm na czytniku Perkin Elmer Wallac 1420 Victor². Absorbancje dla próby kontrolnej uznawano za 100% żywych komórek, a następnie przeliczano procentowy spadek.

3.2.8.3 Fagocytoza zależna od przeciwciał

24 godziny przed eksperymentem komórki CLBL1 bądź CLB70 zostały zabarwione za pomocą roztworu CFSE. Komórki inkubowano przez 20 minut w temp. 37°C w 5 µM roztworze CellTrace™ (ThermoFisher) w obecności 2% FBS. Po odpłukaniu komórki przeniesiono z powrotem do hodowli. W dniu eksperymentu 2×10^5 komórek RAW 264.7 i 2×10^4 komórek CLBL1 lub CLB70 było umieszczonych wspólnie w dołku na płytce 24-dołkowej w obecności przeciwciała B5, E11 lub kontrolnego przeciwciała o izotypie IgG2a (10 µg/mL) i hodowanych przez 6 godzin. Następnie komórki zostały zabarwione przeciwciałem anty mysie CD45-APC i analizowane na cytometrze. Komórki CFSE + CD45 + podwójnie pozytywne zostały policzone jako ulegające fagocytozie.

3.2.9 Wytworzenie linii CLBL1-LUC

Komórki CLBL1 zostały stabilnie transdukowane za pomocą zakupionych gotowych cząstek lentiwirusowych zawierających gen lucyferazy świetlika pod kontrolą promotora EF1a (Amsbio).

50µl gotowej zawiesiny wirusów zostało dodane do 150 tys. komórek na płycie 24-dółkowej. 24 godziny po transdukcji dodano 0,5 ml świeżego medium z dodatkiem puromycyny (1,5µg/ml). Komórki były dalej hodowane w ciągłej obecności antybiotyku.

3.2.10 Przedkliniczne badania aktywności przeciwnowotworowej przeciwciał

Wszystkie czynności z wykorzystaniem zwierząt były wykonane przez dr inż. Magdalenę Milczarek lub pod jej nadzorem.

3.2.10.1 Przeszczep komórek i podawanie preparatów

Myszy NOD/SCID były hodowane w warunkach SPF w indywidualnie wentylowanych klatkach. Wszystkie eksperymenty z wykorzystaniem żywych zwierząt przeprowadzono za zgodą nr 117/2017 i 012/2019 II Lokalnej Komisji Etycznej we Wrocławiu.

42 myszy nastrzyknięto komórkami CLBL-1-LUC (1×10^7 komórek/ mysz) do żyły ogonowej, a następnie losowo podzielono na pięć grup PBS, kontrolne IgG, MTX, B5, koniugat B5-MTX (10 myszy na grupę B5 i 8 zwierząt na inne grupy), tak aby średnia masa myszy w grupie była równa. Preparaty zaczęto podawać dootrzewnowo wg Tabeli 4, w dniu 4 po przeszczepie CLBL1-LUC i powtarzano 3 razy w tygodniu. W dniu 15 wszystkie myszy z grup PBS, IgG i MTX zostały uśmiercone z powodu oznak złego stanu zdrowia wraz z losowo wybranymi 5 myszami z grupy B5 i 5 myszy z grup B5-MTX, które nie wykazywały żadnych widocznych oznak choroby (bez utraty wagi ani zmiany zachowania). Pozostałe 5 myszy z grupy B5 i 3 myszy z grupy B5-MTX traktowano do dnia 20 Mab B5 i B5-MTX.

Tabela 4 Dawki preparatów podawanych myszom

PBS	100µl
IgG	2,5 mg /kg masy ciała
MTX	0,25mg/kg masy ciała
B5	2,5 mg /kg masy ciała
B5-MTX	2,5 mg /kg masy ciała

3.2.10.2 Wizualizacja luminescencji

Lokalizację w ciele myszy i natężenie luminescencji komórek CLBL-1-LUC wizualizowano 15 dnia po przeszczepie stosując system MS FX PRO In-Vivo. Dwadzieścia minut przed obrazowaniem podawano każdej myszy dootrzewnowo roztwór soli potasowej D-lucyferyny w dawce 150 mg/kg. Następnie, zwierzęta sedowano mieszaniną 3–5% (v/v) izofluranu. Obrazy analizowano za pomocą oprogramowania Bruker MI (Bruker INC., USA). Intensywność sygnału luminescencyjnego była wyrażana jako intensywność netto obszaru zainteresowania w arbitralnych jednostkach [a.u.] luminescencji.

3.2.10.3 Analiza narządów

Po uśmierceniu zwierząt została pobrana krew oraz narządy do analizy za pomocą techniki western blotting (mózg, śledziona, wątroba, płuca) oraz kość udowa, z której wyizolowano szpik kostny, który dodatkowo został również przeanalizowany na obecności komórek nowotworowych za pomocą cytometrii przepływowej.

3.2.11 ELISA

Za pomocą testu ELISA była określana względna ilość rozpuszczalnej formy DLA-DR w surowicy krwi.

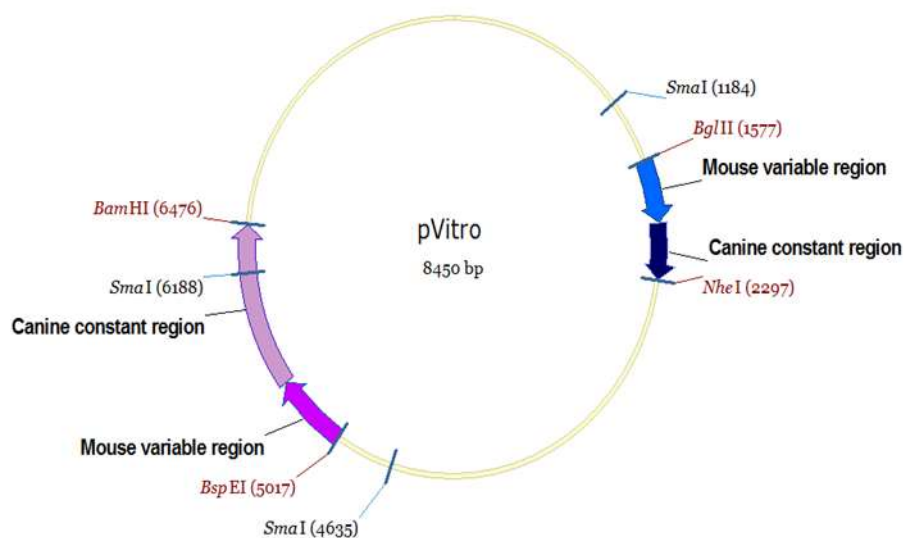
Płytki wysoko adhezyjne (MaxiSorp, NUNC) zostały opłaszczone przeciwciałem B5 (1 µg/ml w PBS) przez noc w 4°C. Następnego dnia płytki były blokowane w 5% odtłuszczonym mleku przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym płukaniu buforem PBST nakładane było biotynylowane przeciwciało E11 (1 µg/ml) i inkubowane przez godzinę w temp. pokojowej. Kolejno po płukaniu nakładano koniugat streptawidyny z peroksydazą chrzanową (STV HRP), a następnie substrat dla HRP (TMB). Reakcję zatrzymywano 1N H₂SO₄, absorbancję odczytano przy 450 nm na czytniku Perkin Elmer Wallac 1420 Victor².

3.2.12 Kaninizacja

W celu stworzenia hybrydowych łańcuchów przeciwciała B5 wykonano najpierw amplifikację psich genów lekkiego oraz ciężkiego łańcucha immunoglobulin wykorzystując startery z Tabeli 5. Na podstawie porównania mysiej i psiej sekwencji nukleotydowej immunoglobulin opracowano strategię połączenia mysiej części zmiennej przeciwciała B5 z regionem stałym psiej immunoglobuliny. Za pomocą reakcji fuzyjnego PCR uzyskano hybrydowe łańcuchy ciężki oraz

lekki, a następnie wklonowano je do bicystronowego wektora pVITRO jak przedstawiona na Rysunku 23.

W celu wytworzenia hybrydowych łańcuchów kaninizowanego przeciwciała, na podstawie porównania mysiej i psiej sekwencji nukleotydowej immunoglobulin określono miejsce połączenia mysiej części zmiennej przeciwciała B5 z regionem stałym psiej immunoglobuliny i pomocą reakcji fuzyjnego PCR uzyskano hybrydowe łańcuchy ciężki oraz lekki (użyto starterów z Tabeli 3), a następnie wklonowano je do bicystronowego wektora pVITRO jak przedstawiona na Rysunku 4.



Rysunek 4 Mapa wektora pVITRO1-neo z wklonowanymi hybrydowymi łańcuchami przeciwciała. Kolorem niebieskim zaznaczono łańcuch lekki (na granatowo psią część stałą, błękitnym mysią część zmienną), fioletowym łańcuch ciężki (jaśniejszym kolorem - część psią, ciemniejszym – mysią).

3.2.13 Metody statystyczne

Do analiz statystycznych wykorzystano program GraphPad Prism 5 i test analizy wariancji ANOVA z poprawką Bonferroniego.

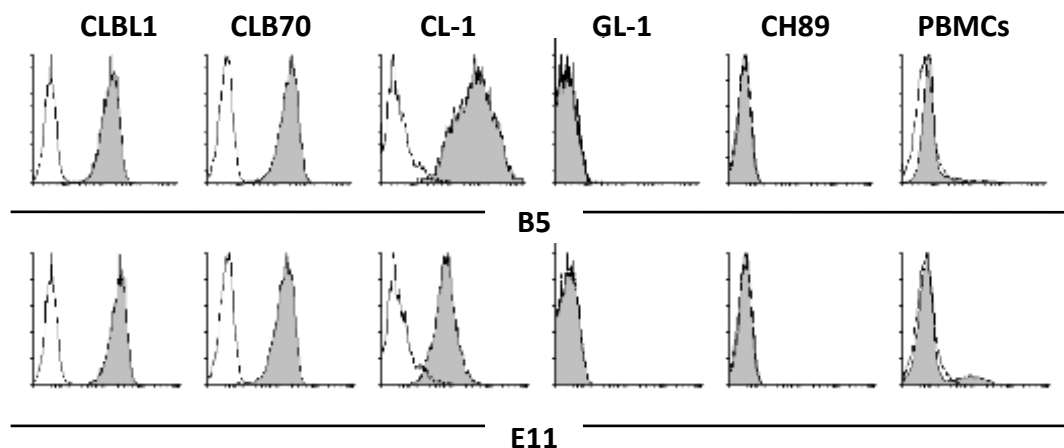
4 Wyniki

4.1 Otrzymanie przeciwciał reaktywnych wobec komórek psiego chłoniaka B-komórkowego

W celu wytworzenia specyficznych przeciwciał monoklonalnych przeprowadzono immunizację myszy psią linią chłoniaka B-komórkowego, w wyniku czego uzyskano panel klonów komórek hybrydoma, na których przeprowadzono dalsze testy reaktywności, specyficzności i aktywności biologicznej. Dwa klony o reaktywności specyficznej wobec chłoniaków B i B/T komórkowych, a nie wobec prawidłowych leukocytów krwi i komórek NK dały najbardziej obiecujące wyniki i zostały wybrane jako przedmiot dalszej pracy.

4.1.1 Uzyskanie hybrydom

W wyniku immunizacji myszy komórkami linii CLBL1, a następnie fuzji splenocytów i hodowli w medium selekcyjnym wytworzono hybrydomy, które następnie poddano selekcji i wybrano dwa klony (B5 oraz E11) reaktywne wobec antygenów na powierzchni komórek psich chłoniaków B-komórkowych. W celu dalszego określania specyficzności, supernatantem z nad hybrydom zabarwiono różne limfoidalne psie linie komórkowe oraz jednojądrzaste komórki wyizolowane z krwi zdrowego psa. Obydwa klony wykazały reaktywność wobec dwóch typowych linii B-komórkowych CLBL1, CLB70, linii T komórkowej CL-1, natomiast nie miały powinowactwa do linii NK (CH89), prawidłowych jednojądrzastych komórek krwi (PBMC), ani linii GL-1, która jest linią mieszaną B/T, pozbawioną ekspresji MHC klasy II (Rysunek 5).



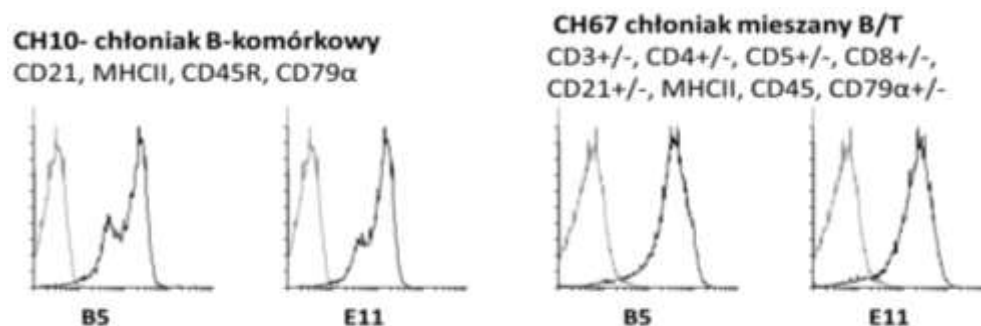
Rysunek 5 Analiza cytofluorymetryczna reaktywności otrzymanych przeciwciał wobec limfoidalnych psich linii komórkowych oraz leukocytów krwi obwodowej (PBMC). Barwienie za pomocą supernatantów z nad hybrydom B5 oraz i E11 i koniugatu fluorescencyjnego drugorzędowego przeciwciała anty mysie IgG [źródło [62]].

W kolejnym kroku przetestowano 19 różnych biopatów od psów chorych na chłoniaki B, mieszane B/T oraz T-komórkowe (Tabela 5) i wykazano, że przeciwciała są reaktywne wobec świeżo wyizolowanych komórek nowotworowych chłoniaków z ekspresją MHC-II (9 próbek chłoniaków B-komórkowych, 3 mieszane B/T, oraz 1 chłoniak T komórkowy). Przykładowe obrazujące barwienia pokazano na Rysunku 6.

Tabela 5 Lista przebadanych bioptatów o określonym fenotypie wraz z średnią intensywnością fluorescencji analizy cytometrycznej [MFI 50-150: +, MFI 150-500: ++, MFI >500: +++].

Nazwa	Typ	Fenotyp	MFI	
			B5	E11
CH9/15	B-kom.	CD21, MHCII , CD45, CD79 α	+	+
CH3	B-kom.	CD34, MHCII , CD45R, CD79 α	-	-
CH10/15	B-kom.	CD21, MHCII , CD45, CD79 α	+	+
CH11/15	B-kom.	CD21, MHCII , CD45, CD79 α	++	++
CH12/15	B-kom.	CD21, MHCII , CD45, CD79 α	++	++
CH16	B-kom.	CD21, MHCII , CD45R, CD79 α	+	+
CH17	B-kom.	CD21, MHCII , CD45R, CD79 α	++	+
CH18	B-kom.	CD21, MHCII , CD45R, CD79 α	++	+
CH19	B-kom.	CD21, MHCII , CD45R, CD79 α	++	+
CH4/15	T-kom.	CD3, CD8, CD5, CD45, MHCII	++	+
CH8	T-kom.	CD3, CD4, CD5, CD46	-	-
CH9	T-kom.	CD3, CD4, CD5	-	-
CH41	T-kom.	CD3, CD4, CD45	-	-
CH42	T-kom.	CD3, CD4, CD5, CD45	+/-	-
CH25	mieszany	CD3, CD4, CD79 α	+	+
CH29	mieszany	CD3, CD34, CD45, CD79 α	-	-
CH30	mieszany	CD3+/-, CD5+/-, CD21, CD14, CD34+/-, MHCII , CD45, CD79 α	+++	++

CH50	mieszany	CD3+/-, CD5+/-, CD8+/-, CD21, MHCII , CD45, CD79 α +/-	++++	+++
CH67	mieszany	CD3+/-, CD4+/-, CD5+/-, CD8+/-, CD21+/-, MHCII , CD45, CD79 α +/-	++	++



Rysunek 6 Analiza cytofluorymetryczna reaktywności otrzymanych przeciwciał wobec komórek ze świeżych biopsji cienkoigłowych węzłów chłonnych psów cierpiących na chłoniaka B komórkowego oraz B/T komórkowego.

4.1.2 Identyfikacja epitopu rozpoznawanego przez przeciwciała B5 i E11 oraz potwierdzanie specyficzności

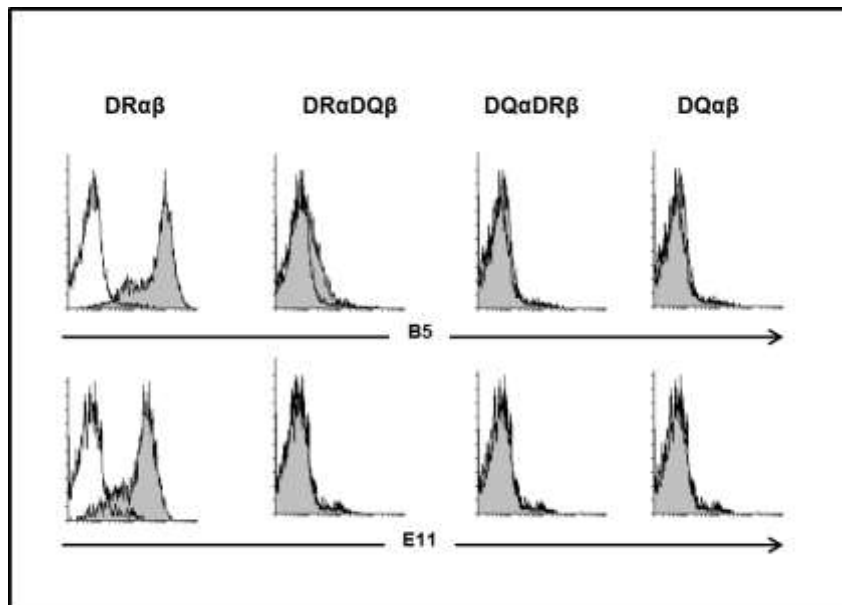
W celu identyfikacji epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała wykonano immunoprecypitację białek z lizatu linii CLBL1, a przygotowane próbki białkowe poddano elektroforezie SDS-PAGE, następnie żel wybarwiono srebrem [wykonane przez dr hab. Andrzeja Rapaka]. Pasma obecne w próbkach immunoprecypitowanych przeciwciałami B5 i E11, lecz nieobecne w immunoprecypitatach kontrolnymi przeciwciałami IgG2a, wycięto i wysłano do „Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas” w IBB PAN w Warszawie w celu identyfikacji znajdujących się w nich białek metodą spektrometrii masowej. Wyniki analizy

przedstawiono na Rysunku 7. Poza tubuliną, która nie występuje na powierzchni komórki, więc nie została wzięta pod uwagę, głównym typowanym białkiem było MHC klasy II, które stało się przedmiotem dalszych analiz.



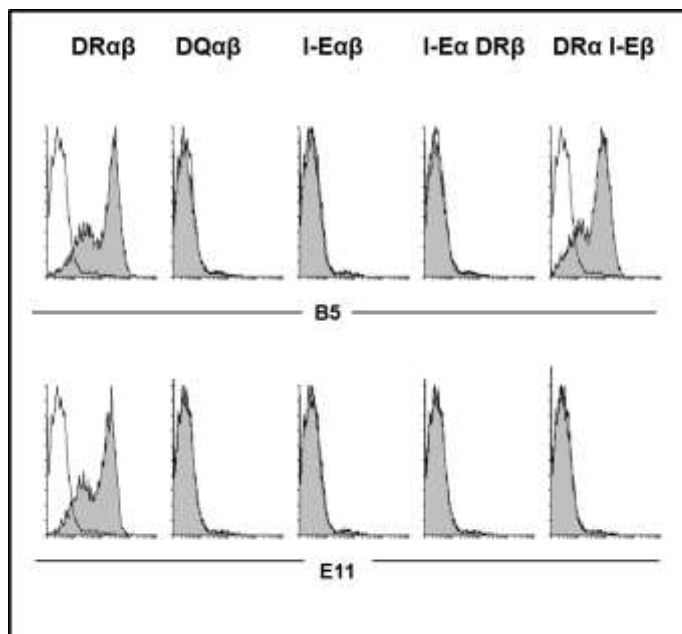
Rysunek 7 Rozdziel elektroforetyczny produktów immunoprecypitacji z lizatów białkowych linii CLBL1 za pomocą przeciwciał B5 i E11 oraz identyfikacja składu białek w wyciętych fragmentach żelu (czerwone ramki) metodą spektrometrii mas.

W celu potwierdzenia, że rozpoznawanym przez przeciwciała B5 i E11 antygenem jest DLA-DR, wykonano konstrukty na bazie wektora pcDNA3.1 zawierające cDNA łańcucha alfa oraz beta DLA-DR oraz DLA-DQ, a następnie transfekowano nimi przejściowo komórki HEK293T w celu powierzchniowej ekspresji dimerów DR $\alpha\beta$, DQ $\alpha\beta$, DQ α DR β , DR α DQ β wskazanych na Rysunku 8. Wykazano reaktywność obu przeciwciał wobec dimeru DLA-DR $\alpha\beta$ oraz brak reaktywności wobec dimerów mieszanych oraz dimeru DLA-DQ, co potwierdziło, że epitopy dla przeciwciał B5 i E11 znajdują się na cząsteczce DLA-DR, lecz nie na cząsteczce DLA-DQ. Warto również zauważyć, że przeciwciało B5 wiązało się nieznacznie, lecz powtarzalnie do chimerowej cząsteczki DR α DQ β , co sugerowało, że epitop dla tego przeciwciała znajduje się w obrębie łańcucha DR α .



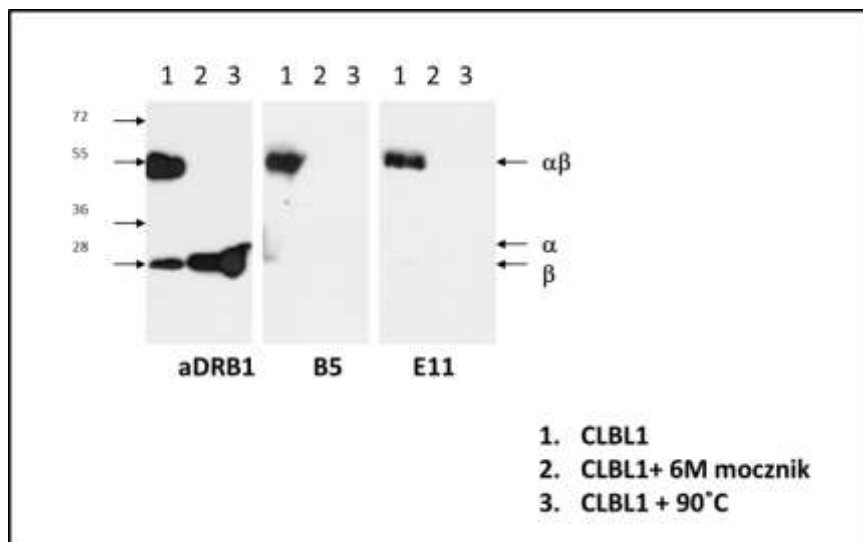
Rysunek 8 Analiza cytometryczna reaktywności przeciwciał B5 i E11 wobec łańcuchów α i β cząsteczek DLA-DR ($DR\alpha\beta$), DLA-DQ, ($DQ\alpha\beta$) oraz chimerowych cząsteczek DLA- $DR\alpha DQ\beta$ i DLA- $DQ\alpha DR\beta$ ulegających ekspresji na powierzchni komórek HEK293T po ich przejściowej transfekcji konstrukcjami genowymi. Białe histogramy pokazują barwienie mysimi przeciwciałami kontrolnymi o izotypie IgG2a.

Kolejno podjęto próbę określenia, na którym łańcuchu znajduje się miejsce wiązania przeciwciała. W tym celu wytworzono konstrukty genowe baze wektora pcDNA3.1 pozwalające na ekspresję powierzchniową łańcuchów alfa i beta mysiego MHC-II I-Ek w kombinacjach z łańcuchami α i β psich cząsteczek DLA-DR. Na Rysunku 9 przedstawiono wynik analizy reaktywności przeciwciał B5 i E11 wobec transfekowanych wytworzonymi konstruktami komórek HEK293T. Żadne z przeciwciał nie wykazało powinowactwa wobec mysiej cząsteczki MHC-II ani hybrydowej cząsteczki I-E $\alpha DR\beta$, natomiast B5 mAb w przeciwieństwie do E11 rozpoznawało hybrydową cząsteczkę DR α I-E β . Wykazano w ten sposób, że przeciwciało B5 rozpoznaje epitop znajdujący się w obrębie łańcucha alfa cząsteczki DLA-DR, natomiast wiązanie przeciwciała E11 wymaga obecności obydwu psich łańcuchów DLA-DR.



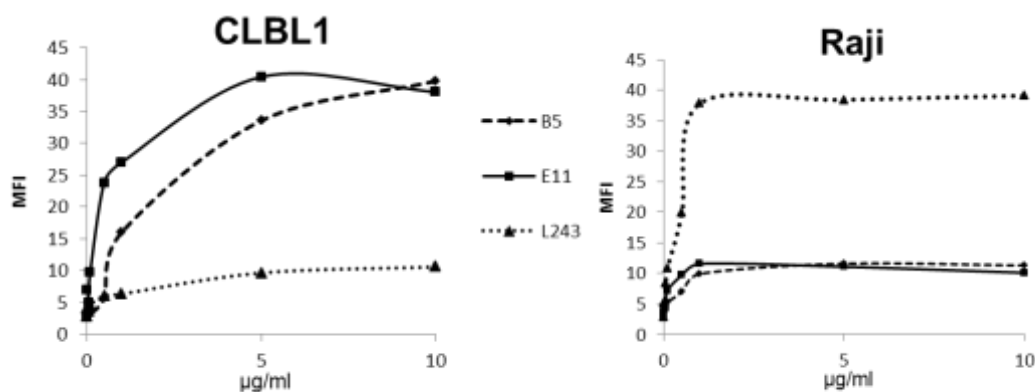
Rysunek 9 Analiza cytofluorymetryczna komórek HEK293T za pomocą przeciwciał B5 i E11 po ich przejściowej transfekcji konstrukcjami genowymi kodującymi łańcuchy α i β psich cząsteczek DLA-DR (DR $\alpha\beta$), DLA-DQ (DQ $\alpha\beta$), mysich cząsteczek I-E (I-E $\alpha\beta$) oraz cząsteczek chimerowych mysio-psich (I-E α DR β i DR α I-E β) [źródło [62]].

Za pomocą techniki Western blotting scharakteryzowano reaktywność przeciwciał B5 i E11 wobec cząsteczki DLA-DR znajdującej się w lizatach komórkowych. Swoiste pasma zaobserwowano tylko w niezdenaturowanych lizatach, które nie zostały poddane ogrzewaniu do 90 stopni. Wykazano, że przeciwciała rozpoznają cząsteczki tylko w formie niezdenaturowanej, a podgrzanie bądź dodanie mocznika powoduje zanik reaktywności zarówno przeciwciała B5 jak i E11 (Rysunek 10).



Rysunek 10 Analiza Western blotting reaktywności przeciwciał B5 i E11 oraz przeciwciała anty-DLA-DRβ1 (aDRB1) (rozpoznającego epitop liniowy w obrębie łańcucha β cząsteczki DLA-DR) wobec zdenaturowanych lub nie zdenaturowanych lizatów z linii CLBL1 [źródło [62]].

Ponieważ psie cząsteczki MHC-II wykazują wysoką homologię sekwencji do ludzkich cząsteczek HLA, sprawdzono reaktywność przeciwciał wobec ludzkiej linii B-komórkowej Raji. Wykorzystano do eksperymentu przeciwciało L243 rozpoznające HLA-DR i porównano intensywność fluorescencji barwienia przeciwciałem B5 i E11 oraz L243 na psiej (CLBL1) oraz ludzkiej (Raji) linii komórkowej (Rysunek 11) za pomocą cytometrii przepływowej. Wykazano, że Mab B5 i E11 dają kilkukrotnie wyższą fluorescencję na linii psiej, natomiast L243 mAb na ludzkiej linii Raji.



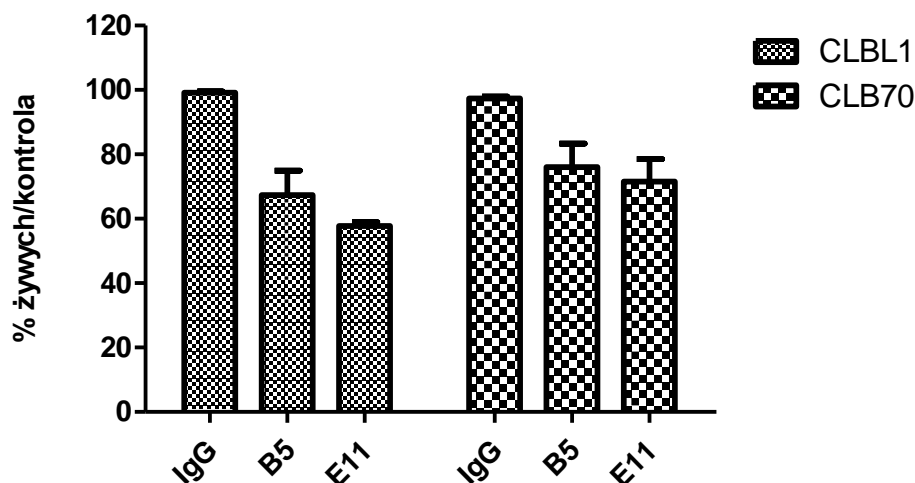
Rysunek 11 Średnia intensywność fluorescencji barwienia uzyskana dla różnych stężeń przeciwciał B5 i E11 oraz L243 na psiej (CLBL1) i ludzkiej (Raji) linii komórkowej [źródło [62]].

4.2 Testy cytotoksyczne

Ponieważ celem nadrzędnym wytworzenia przeciwciał B5 i E11 była ocena ich potencjału terapeutycznego, określono ich cytotoksyczność bezpośrednią oraz zależną od funkcji układu odporności. Uruchamianie przez przeciwciała różnych mechanizmów cytotoksyczności może zwiększać efekt terapeutyczny, ale jednocześnie może też powodować skutki uboczne podczas terapii.

4.2.1 Analiza cytotoksyczności bezpośredniej przeciwciał

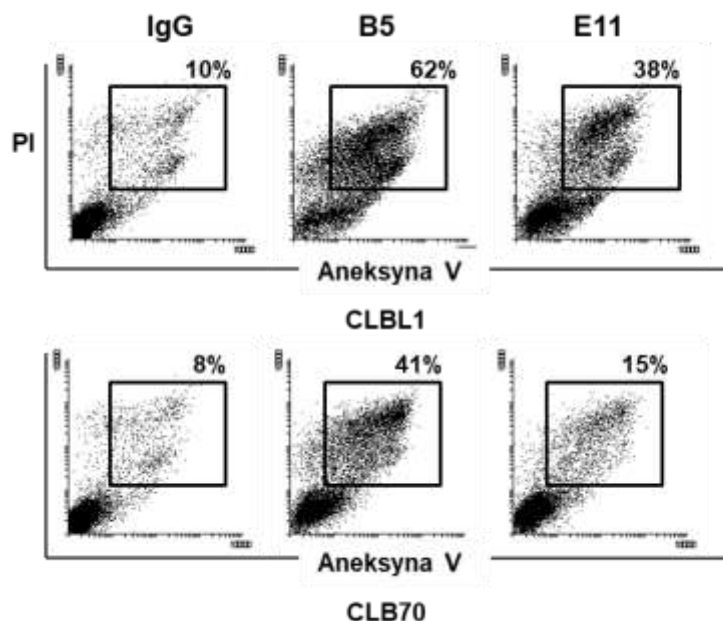
W celu wykazania bezpośredniej cytotoksyczności przeciwciał, która jest najbardziej pożądanym efektem biologicznym, wykonano testy cytotoksyczności za pomocą testu MTS. Komórki były inkubowane z przeciwciałami przez 48 godzin, po których analizowano odsetek żywych komórek. Przeciwciało B5 spowodowało spadek żywotności o ok. 20-30% w porównaniu do komórek traktowanych przeciwciałem kontrolnym, natomiast przeciwciało E11 wywoływało efekt cytotoksyczny na poziomie 25-40% zależnie od linii komórkowej (Rysunek 12) .



Rysunek 12 Odsetek żywych komórek linii CLBL1 oraz CLB70 po 48 godzinnej inkubacji z przeciwciałami B5, E11 w porównaniu do próby kontrolnej traktowanej mysim przeciwciałem IgG analizowany za pomocą testu MTS. Wykres przedstawia uśrednione wyniki z 3 eksperymentów wraz z odchyleniem standardowym.

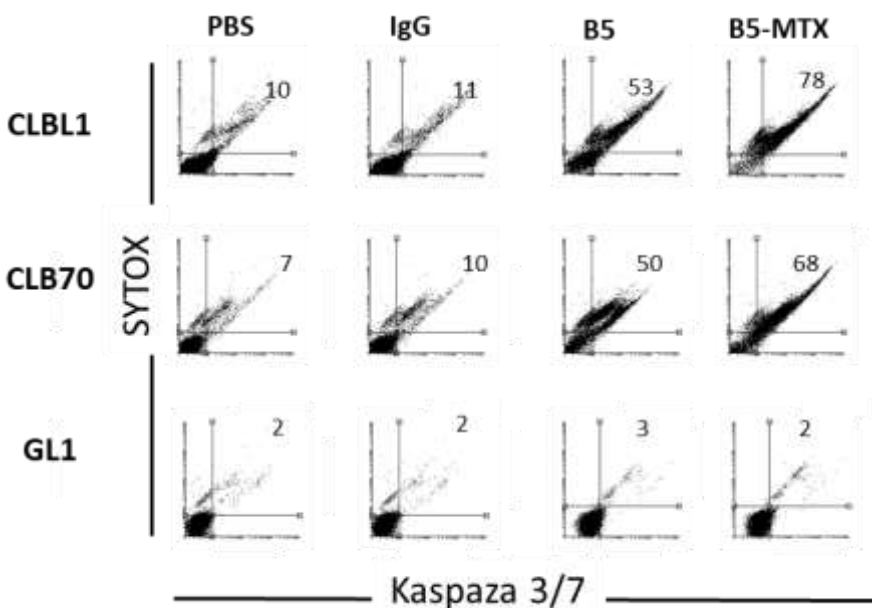
4.2.2 Analiza mechanizmu apoptozy wywoływanej przez przeciwciała B5 i E11

W celu charakterystyki mechanizmów śmierci komórki wywoływanej przez traktowanie komórek nowotworowych przeciwciałami B5 i E11 wykonano barwienie za pomocą koniugatu fluorescencyjnego aneksyny V (Rysunek 13). Aneksyna przyłącza się do fosfatydyloseryny przenoszonej ze strony cytozolowej dwuwarstwy lipidowej na stronę zewnątrzkomórkową, podczas inicjacji procesu apoptozy. Równoległe barwienie komórek jodkiem propidyny pozwala na określenie żywotności komórek. Po 48 godzinnym traktowaniu linii CLBL1 i CLB70 wyżej wymienionymi przeciwciałami, zaobserwowano, że przeciwciało B5 wywołuje apoptozę u 62% komórek chłoniaka CLBL1 i 41% białaczki CLB70, natomiast przeciwciało E11, działa słabiej w tym teście wywołując odpowiednio 38 i 15% apoptozy (Rysunek 13).



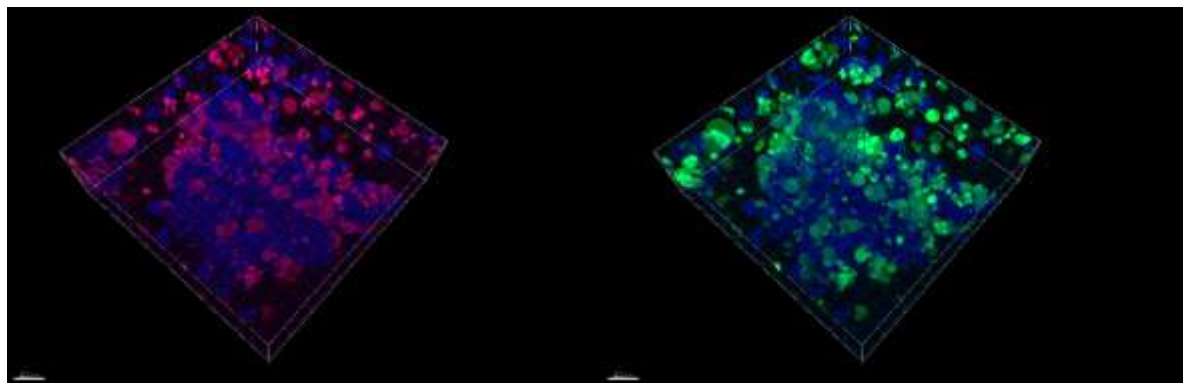
Rysunek 13 Analiza cytofluometryczna bezpośredniej cytotoksyczności przeciwciał B5 i E11 wobec komórek CLBL1 i CLB70 metodą barwienia koniugatem fluorescencyjnym aneksyny V i jodkiem propidyny (PI). Jako kontroli izotypowej (IgG) użyto mysich przeciwciał monoklonalnych klasy IgG2a [źródło [62]].

Kolejnym krokiem było pokazanie czy śmierć komórki jest zależna od aktywacji kaspaz. W tym celu wykonano barwienia z użyciem odczynnika Cell Event Caspase 3/7, który jest fluorescencyjnie wyznakowanym substratem dla kaspaz 3/7 oraz z barwnikiem Sytox wybarwiająjącym martwe komórki. Po traktowaniu przeciwciałem B5 bądź wytworzonym koniugatem B5-MTX [Rozdział 4.5] u ponad połowy komórek linii CLBL1 oraz CLB70 wykazano aktywność kaspaz. Natomiast w przypadku linii GL-1, która nie ma na swej powierzchni cząsteczek MHC-II nie zaobserwowano żadnej cytotoksyczności co wskazuje na swoistość efektu (Rysunek 14).



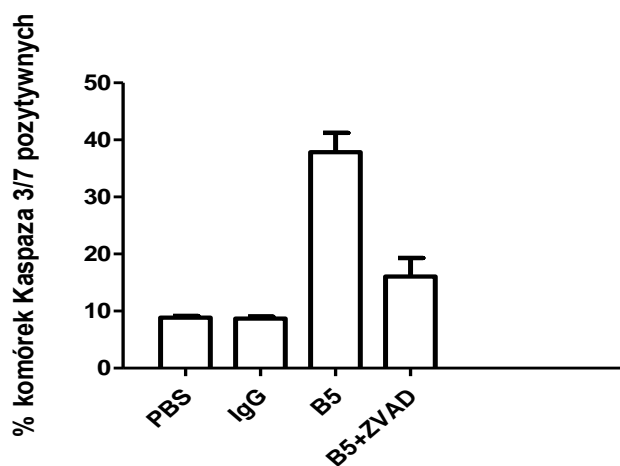
Rysunek 14 Analiza cytofluometryczna apoptozy wywołanej przeciwciałami B5 i E11 na komórkach CLBL1 i CLB70 metodą barwienia koniugatem fluorescencyjnym substratu dla kaspazy 3/7 i barwnikiem martwych komórek Sytox. Na dotplotach zaznaczono odsetek komórek podwójnie pozytywnych czyli martwych na drodze apoptozy. Jako kontroli izotypowej (IgG) użyto mysich przeciwciał monoklonalnych klasy IgG2a [źródło [63]].

Dodatkowo w celu zobrazowania lokalizacji komórek apoptotycznych w agregatach homotypowych obserwowanych przy traktowaniu komórek linii CLBL1 i CLB70 przeciwciałem B5, wykonano zdjęcia za pomocą mikroskopu konfokalnego (Rysunek 15). Agregaty komórek nawirowane na szkiełka podstawowe zostały wybarwione za pomocą barwników DAPI (barwiący jądra komórkowe), Sytox (barwnik żywotności komórek) oraz substratu dla kaspazy 3/7. Uwidocznilo to martwe komórki głównie na obrzeżach agregatu oraz pojedyncze wolnopływające komórki.



Rysunek 15 Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający pojedyncze grono komórek CLBL1 traktowanych przeciwciałem B5 przez 24h i wybarwione barwnikiem DAPI, barwnikiem Sytox (czerwony) oraz koniugatem fluorescencyjnym substratu dla kaspazy 3/7 (zielony) [Obrazowanie wykonane przez dr Michała Majkowskiego].

Kolejnym potwierdzeniem, że śmierć komórek jest zależna od kaspaz był eksperyment z użyciem inhibitora kaspaz ZVAD-fmk. Inkubacja komórek CLBL1 równocześnie z ZVAD i przeciwciałem B5 powoduje znaczące obniżenie poziomu cytotoksyczności w porównaniu do B5 – 18% versus 40%. (Rysunek 16).



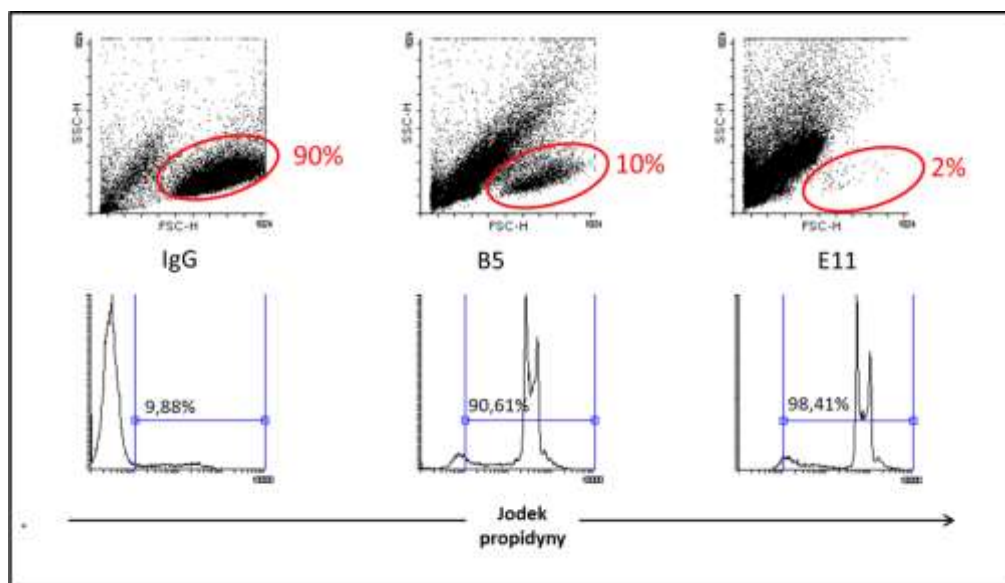
Rysunek 16 Odsetek komórek linii CLBL1 aktywujących kaspazę 3/7 w efekcie 24 godzinowego traktowania przeciwciałem B5, kontrolnym mysim przeciwciałem IgG lub buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) przy braku lub w obecności inhibitora kaspaz ZVAD.

4.2.3 Cytotoksyczność zależna od układu odporności

Znaczącą rolę w efekcie przeciwnowotworowym przeciwciał ma ich zdolność do pobudzania układu immunologicznego i działania przez region Fc. W celu określenia takich właściwości przeciwciał B5 i E11 sprawdzono możliwość wywoływania cytotoksyczności zależnej od dopełniacza oraz fagocytozy zależnej od przeciwciał.

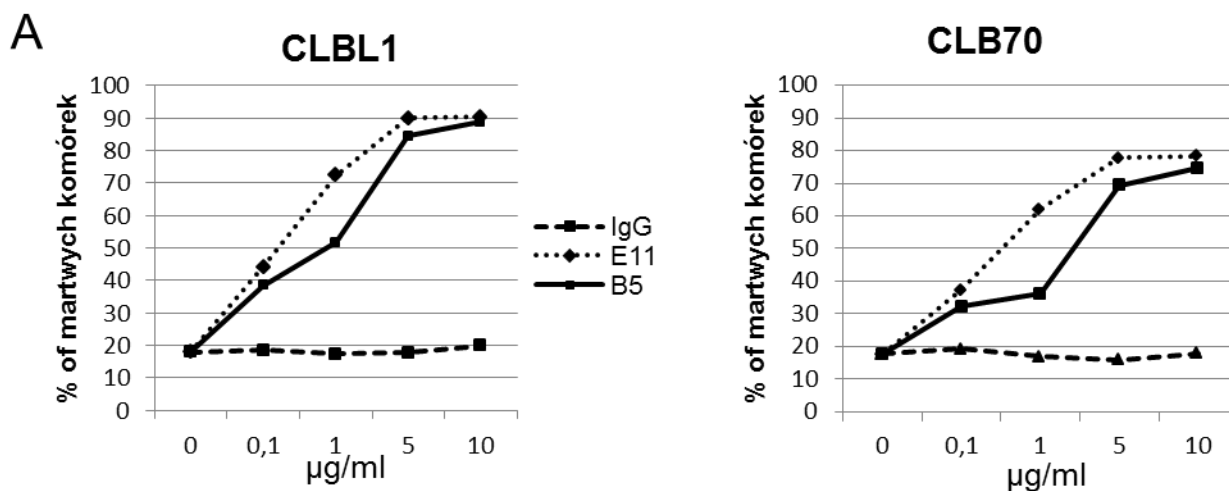
4.2.3.1 Cytotoksyczność zależna od dopełniacza

W celu wykazania cytotoksyczności przeciwciał B5 i E11 zależnej od dopełniacza inkubowano komórki opłaszczone przeciwciałami z dopełniaczem króliczym. W pierwszym eksperymencie wykazano działanie cytotoksyczne na poziomie 90% i 98% odpowiednio dla przeciwciała B5 i E11, przy stężeniu przeciwciał wynoszącym 10 $\mu\text{g/ml}$. (Rysunek 17).



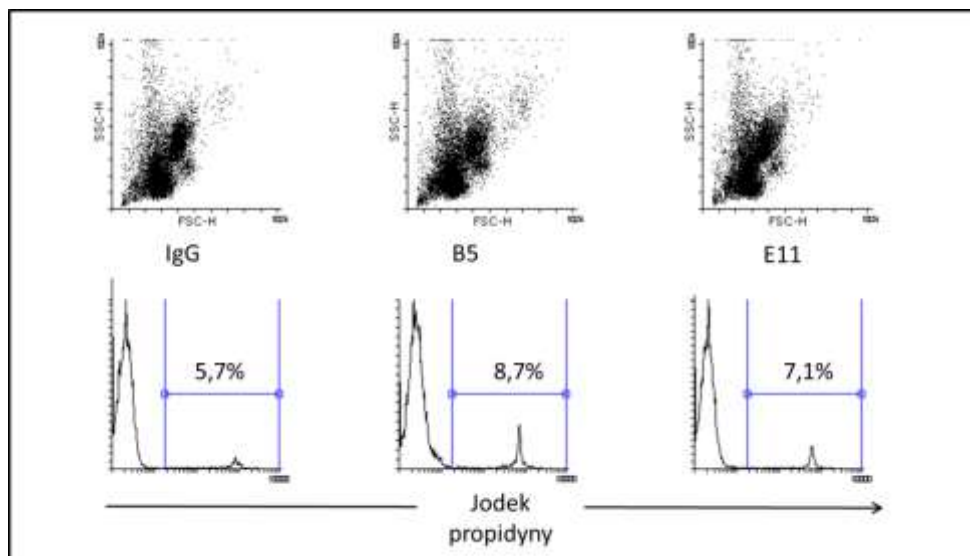
Rysunek 17 Analiza cytofluorymetryczna śmiertelności komórek poddanych testom na cytotoksyczność zależną od dopełniacza z użyciem przeciwciał B5, E11 oraz kontrolnego IgG za pomocą barwienia jodkiem propidyny. W panelu górnym zaprezentowano wykresy wielkości (FSC-H) i ziarnistości (SSC-H) komórek, a elektronicznymi bramkami (czerwone elipsy) zaznaczono populację komórek żywych. Na dolnym panelu przedstawiono histogramy natężenia fluorescencji jodku propidyny. Zabramkowano (niebieskie linie) populacje komórek martwych.

Następnie wykonano szersze doświadczenie na dwóch liniach B-komórkowych oraz w całym panelu stężeń przeciwciał. Wykazano, że przeciwciała już w stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$ zabijają odpowiednio ponad 80% komórek linii CLBL1 i ponad 70% komórek linii CLB70 (Rysunek 18).



Rysunek 18 Odsetek martwych komórek w teście cytotoksyczności zależnej dopełniacza w funkcji różnych stężeń przeciwciał na dwóch liniach psich chłoniaków B-komórkowych (CLBL1 i CLB70). Analiza została wykonana za pomocą barwienia jodkiem propidyny i analizy cytofluorymetrycznej i przedstawia średnią z 3 eksperymentów [źródło [62]].

W celu oszacowania wpływu przeciwciał B5 i E11 na przeżycie prawidłowych komórek krwi obwodowej psa, wykonano test na świeżo wyizolowanych leukocytach od zdrowych psów ze wskazanymi na Rysunku 13 przeciwciałami. Wykazano nieznaczną cytotoksyczność przeciwciał B5 (8,7% komórek martwych) i E11 (7,1%) w stosunku do kontrolnej immunoglobuliny IgG (5,7%) (Rysunek 19).

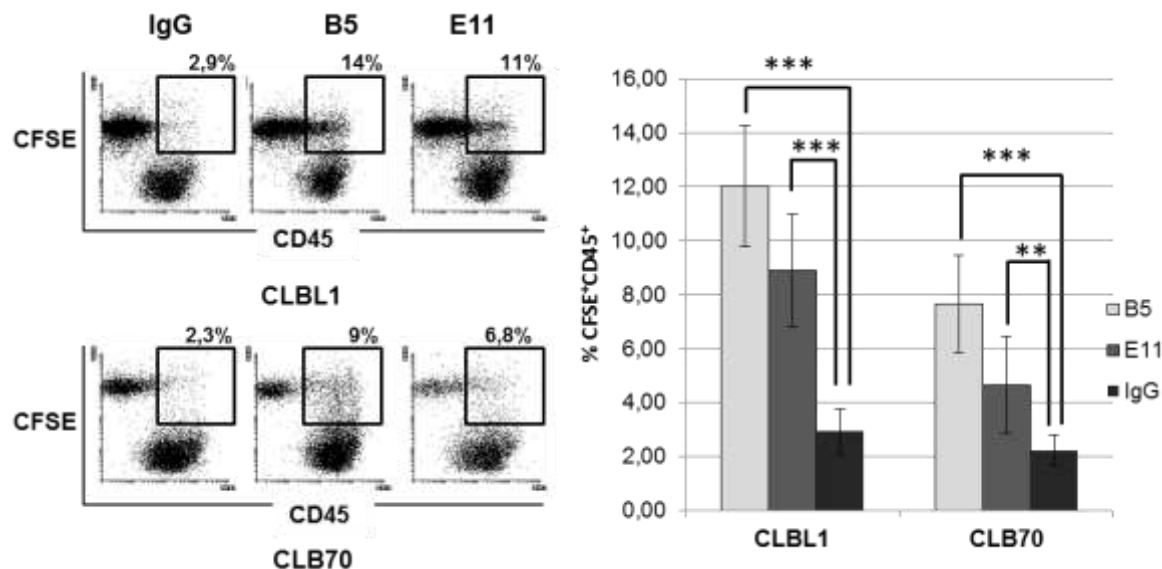


Rysunek 19 Analiza cytofluorometryczna - wykresy typu „dotplot” wielkości i ziarnistości komórek oraz histogramy dokumentujące analizę psich PBMC poddanych testom na cytotoksyczność zależną od dopełniacza z użyciem przeciwciał B5, E11 oraz kontrolnego IgG za pomocą barwienia jodem propidyny.

4.2.3.2 Analiza fagocytozy zależnej od przeciwciał B5 i E11

Celem doświadczenia było określenie, czy badane przeciwciała aktywują mechanizmy fagocytozy komórek psich chłoniaków – linii CLBL1 i CLB70. Na wykresach można zaobserwować od kilku do kilkunastu procent komórek podwójnie pozytywnych (CFSE+CD45+), czyli komórek nowotworowych wyznakowanych CFSE, które zostały wchłonięte przez, oznaczone markerem CD45, mysie makrofagi (linia RAW264).

Na Rysunku 20 przedstawiono przykładowe analizy typu „dotplot” oraz wykresy zbiorcze przedstawiające średni poziom fagocytozy wywoływanej przez wskazane przeciwciała z 3 niezależnych eksperymentów.



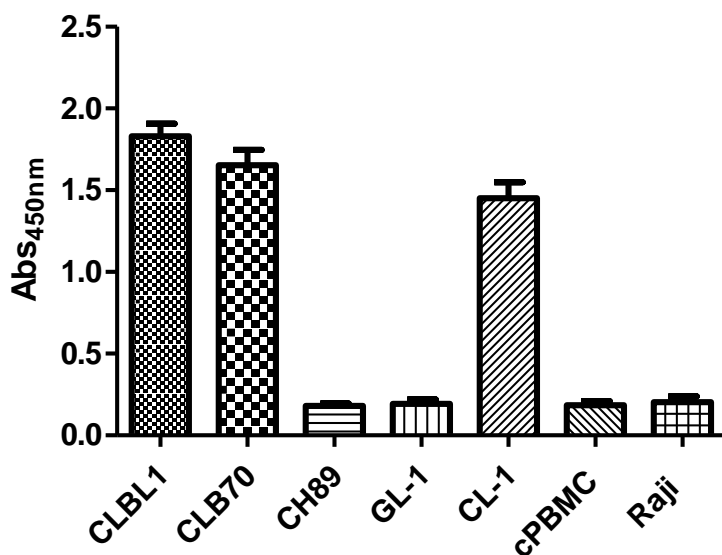
Rysunek 20 Analiza cytofluorometryczna fagocytozy zależnej od przeciwciał B5 oraz E11 z użyciem mysiej linii RAW264 na liniach CLBL1 i CLB70. Wykresy typu „dotplot” przedstawiają wybarwione za pomocą barwnika wewnątrzkomórkowego CFSE linie CLBL1/CLB70 oraz zabarwione przeciwciałem antyCD45 mysie makrofagi RAW264. Ramką zaznaczono komórki podwójnie pozytywne czyli psie komórki wchłonięte przez makrofagi. Wykres obok przedstawia średni odsetek komórek ulegających zależnej od przeciwciał fagocytozie w trzech niezależnych eksperymentach. [źródło [62]].

4.3 Ocena przydatności przeciwciał B5 i E11 do diagnostyki psich chłoniaków metodą ELISA

Określenie poziomu DLA-DR może stanowić wartościowe narzędzie w diagnostyce chłoniaków i/lub monitorowaniu skuteczności ich leczenia. Opracowanie testu ELISA w prosty sposób umożliwia określanie względnej ilości cząsteczek DLA-DR w różnych rodzajach próbek biologicznych. Ponieważ epitopy przeciwciał B5 i E11 nie pokrywają się, daje to możliwość wykorzystania ich do skonstruowania testu kanapkowego ELISA.

4.3.1 Ocena poziomu ekspresji DLA-DR w lizatach i biopsjach węzłów chłonnych psów chorych na chłoniaki z limfocytów B.

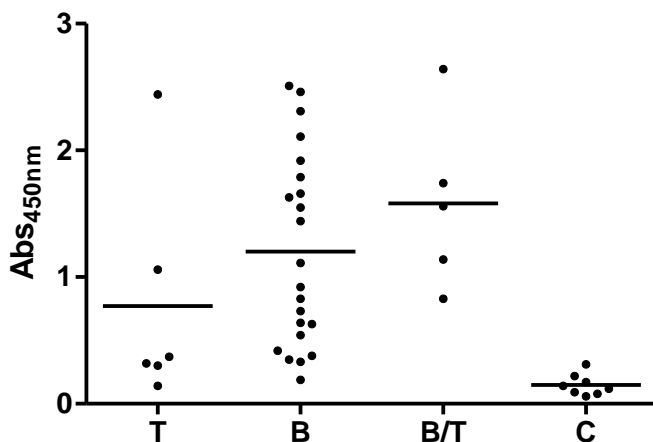
Działanie testu najpierw sprawdzano na lizatach białkowych z linii komórkowych o silnej ekspresji (MHCII+) lub bez ekspresji (MHCII-) MHC klasy II. Na Rysunku 21 zaprezentowano poziomy absorbancji w teście kanapkowym ELISA dla lizatów psich linii MHCII+ (CLBL1, CLB70, CL1), które są co najmniej kilkukrotnie wyższe w stosunku do lizatów linii kontrolnych MHC- , takich jak CH89 i GL-1 oraz prawidłowych komórek PBMC oraz ludzkiej linii Raji.



Rysunek 21 Analiza względnego poziomu ekspresji MHC-II w lizatach z linii komórkowych wyrażających DLA-DR (CLBL1, CLB70, CL-1, cPBMC), HLA-DR (Raji) i niewyrażających DLA-DR (CH89, GL-1) w teście ELISA z użyciem przeciwciał B5 i E11.

Kolejnym krokiem była ewaluacja testu na lizatach białkowych z biopłatów cienkoigłowych od psów cierpiących na różne typy chłoniaków. Przetestowano 6 chłoniaków T-komórkowych, 22 B- komórkowych, 5 mieszanych B/T oraz 8 biopsji kontrolnych od osobników poddanych eutanazji z przyczyn innych niż chłoniaki. Wykazano, że grupy chłoniaków B oraz B/T

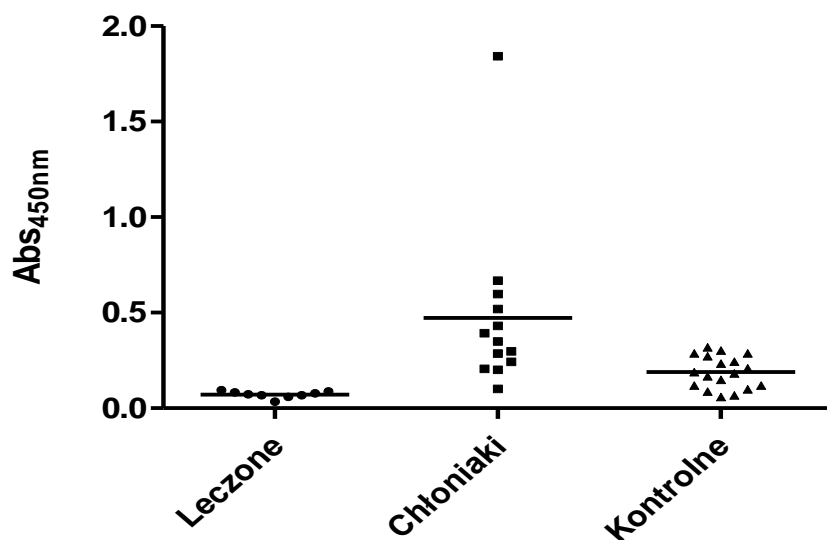
komórkowych mają statystycznie wyższy poziom ekspresji DLA-DR niż próby kontrolne ($p < 0,01$) (Rysunek 22).



Rysunek 22 Względny poziom ekspresji DLA-DR w lizatach z biopłatów psich chłoniaków B, T oraz B/T komórkowych lub kontrolnych (bez nowotworu - C), oznaczony za pomocą testu ELISA wykorzystującego przeciwciała B5 i E11.

4.3.2 Ocena poziomu rozpuszczalnej formy DLA-DR w surowicy psów chorych na chłoniaki

Ponieważ rozpuszczalne MHC-II jest przedmiotem badań jako potencjalny marker progresji nowotworów [Rozdział 1.8], zbadano również jego obecność w surowicy psów cierpiących na chłoniaki oraz kontrolnie psów po leczeniu oraz zdrowych. Wykazano, że w grupie psów chorych poziom jest ok. 5-krotnie wyższy niż u psów leczonych oraz 2,5- krotnie wyższy niż u psów zdrowych (Rysunek 23).



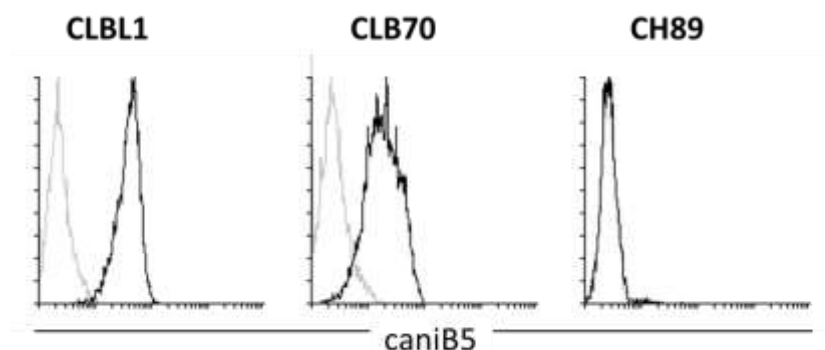
Rysunek 23 Względny poziom sDLA-DR w surowicy psów chorych na chłoniaki, leczonych oraz zdrowych określony za pomocą poziomu absorbancji uzyskanej w teście ELISA z użyciem przeciwciał B5 i E11 [źródło [63]].

4.4 Otrzymanie i wstępna charakterystyka chimerowego kaninizowanego przeciwciała B5

W celu potencjalnego wykorzystania przeciwciała B5 w terapii psich chłoniaków, zdecydowano się na próbę wytworzenia jego odmiany chimerowej kaninizowanej (czyli posiadającej mysie fragmenty zmienne oraz psie fragmenty stałe przeciwciał). W założeniu taka forma przeciwciała byłaby bezpieczniejsza i skuteczniejsza w próbach klinicznych ze względu na lepsze właściwości farmakokinetyczne (np. dłuższy okres półtrwania w osoczu) oraz na mniejsze pobudzenie odpowiedzi odpornościowej przeciwko lekowi niż przeciwciało mysie przy wielokrotnych podaniach.

Ekspresję przeciwciała prowadzono w komórkach linii CHO, które transfekowano standardową metodą (Rozdział 3.2.3). Następnie za pomocą cytometrii przepływowej obserwowano reaktywność supernatantu pochodzącego z transfekowanych komórek wobec dwóch psich linii

B-komórkowych (CLBL1 i CLB70) oraz brak powinowactwa do kontrolnej linii NK (CH89), która nie posiada epitopu dla przeciwciała B5 (Rysunek 24).



Rysunek 24. Analiza cytofluorymetryczna reaktywności supernatantu pochodzącego z transfekowanych komórek CHO wobec dwóch linii B-komórkowych oraz kontrolnej linii NK za pomocą cytometrii przepływowej.

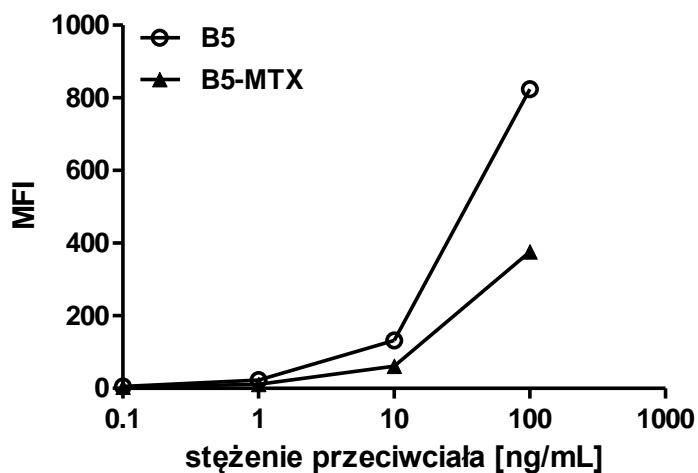
4.5 Uzyskanie i właściwości koniugatu przeciwciała lek - B5-MTX

Rozważając terapię celowaną i chcąc polepszyć właściwości cytotoksyczne preparatu, zdecydowano się na przyłączenie do przeciwciała B5 cząsteczek metotreksatu (MTX). MTX jest związkiem tanim i znanym od dawna. Dodatkowo jest łatwy do przyłączenia kowalencyjnego do białek poprzez wolne reszty aminowe aminokwasów. Preparaty B5-MTX, na których prowadzono badania zostały wykonane przez dr Jarosława Ciekota i zawierały ok. 40 cząsteczek MTX na cząsteczkę przeciwciała.

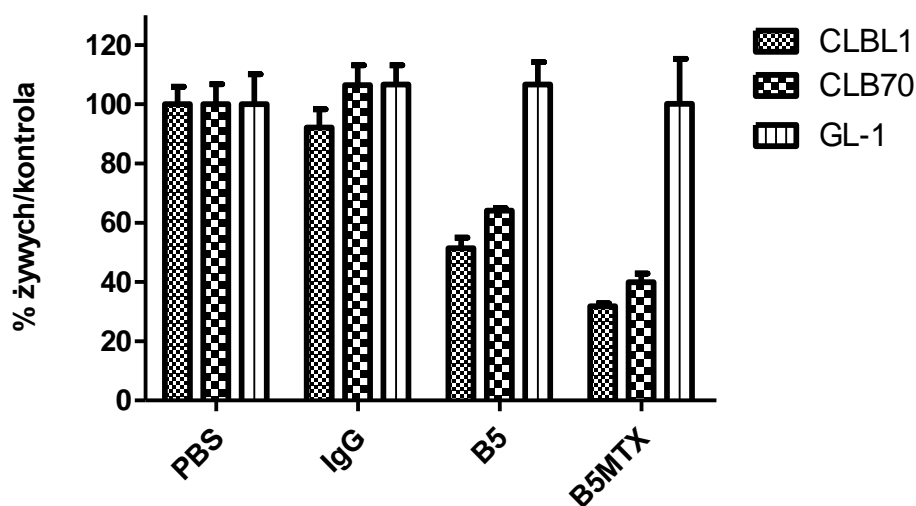
Właściwości cytotoksyczne koniugatu przeciwciała B5 zostały porównane do samego przeciwciała w kilku testach. Przeanalizowano poziom wiązania koniugatu do linii CLBL1, bezpośrednia cytotoksyczność z wykorzystaniem testu MTS, mechanizm działania w teście z dodanym inhibitorem ZVAD oraz poziom wywoływanej apoptozy odczytywany jako aktywność kaspazy 3/7.

Koniugacja cząsteczek metotreksatu do przeciwciała B5 zmniejszyła poziom powinowactwa cząsteczki do komórek linii CLBL1 o ok. 50% co pokazano na Rysunku 25, lecz mimo to koniugat

wykazuje o około 20% lepsze działanie cytotoksyczne w stosunku do linii CLBL1 i CLB70 niż samo przeciwciało B5. Ponadto również nie wywołuje cytotoksyczności nieswoistej do komórek linii kontrolnej GL-1 nie wykazującej ekspresji DLA-DR (Rysunek 26).

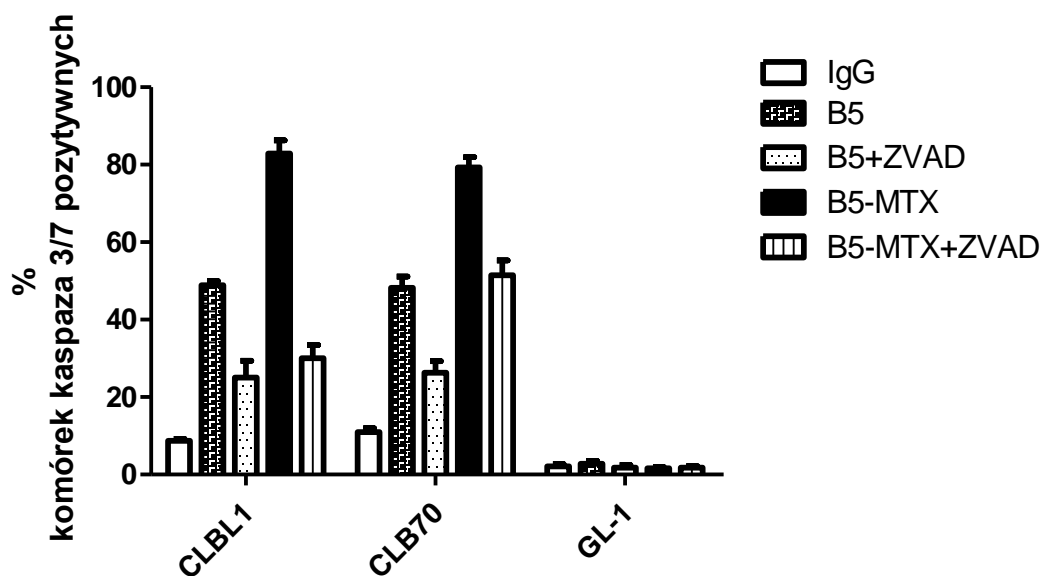


Rysunek 25 Średnie natężenie fluorescencji (MFI) uzyskane techniką cytometrii przepływowej po barwieniu komórek linii CLBL1 różnymi stężeniami przeciwciała B5 oraz koniugatem B5-MTX [źródło [63]].



Rysunek 26 Spadek odsetka żywych komórek linii CLBL1, CLB70 oraz kontrolnej linii GL-1 po 48 godzinnej inkubacji z przeciwciałem B5, koniugatem B5-MTX oraz kontrolnym mysim przeciwciałem (IgG) w porównaniu do kontroli traktowanej buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS). Wykres przedstawia średnią z trzech powtórzeń eksperymentu.

Zbadano również czy mechanizm działania koniugatu B5-MTX jest w pełni zależny od aktywacji kaspazy. Barwienie z wykorzystaniem substratu dla aktywnej kaspazy 3/7 wykazało, że koniugat B5-MTX wywołuje apoptozę kaspazo-zależną, a dodatek inhibitora kaspaz (ZVAD) powoduje jej częściowe zahamowanie (Rysunek 27).



Rysunek 27 Analiza poziomu aktywności kaspazy 3/7 w psich liniach CLBL1, CLB70 i kontrolnej GL-1 traktowanych przeciwciałem B5 i koniugatem B5-MTX bez lub w obecności inhibitora ZVAD. Wykres przedstawia średnią z trzech powtórzeń eksperymentu [źródło [63]].

4.6 Ocena efektu terapeutycznego podania przeciwciała B5 lub koniugatu B5-MTX myszom obciążonym komórkami psiej linii CLBL1-LUC

Kluczowym elementem tej pracy było przetestowanie aktywności przeciwciał w modelu *in vivo* i określenie ich potencjalnych możliwości zastosowania w terapii chłoniaków u psów. Ponieważ z przyczyn etycznych testowanie preparatów na psach było niemożliwe, rozpoczęto od wykonania eksperymentów na mysim modelu przedklinicznym.

Do doświadczenia wykorzystano myszy NOD-SCID pozbawione adaptacyjnego układu odporności, którym przeszczepiono wytworzone wcześniej komórki CLBL1-LUC [Rozdział 3.2.9] w ilości 10 milionów/mysz w podaniu dożylnym. Rozpoczynając 4 dni po podaniu komórek myszom podawano przeciwciało B5 oraz koniugat B5-MTX, dootrzewnowo, trzy razy w tygodniu. Średni czas do wystąpienia objawów choroby (20% utraty wagi lub paraliż dolnych kończyn) od podania komórek, u myszy w grupach kontrolnych wynosił ok. 14 dni, natomiast u myszy leczonych średnio minimum 7 dni dłużej (Tabela 6).

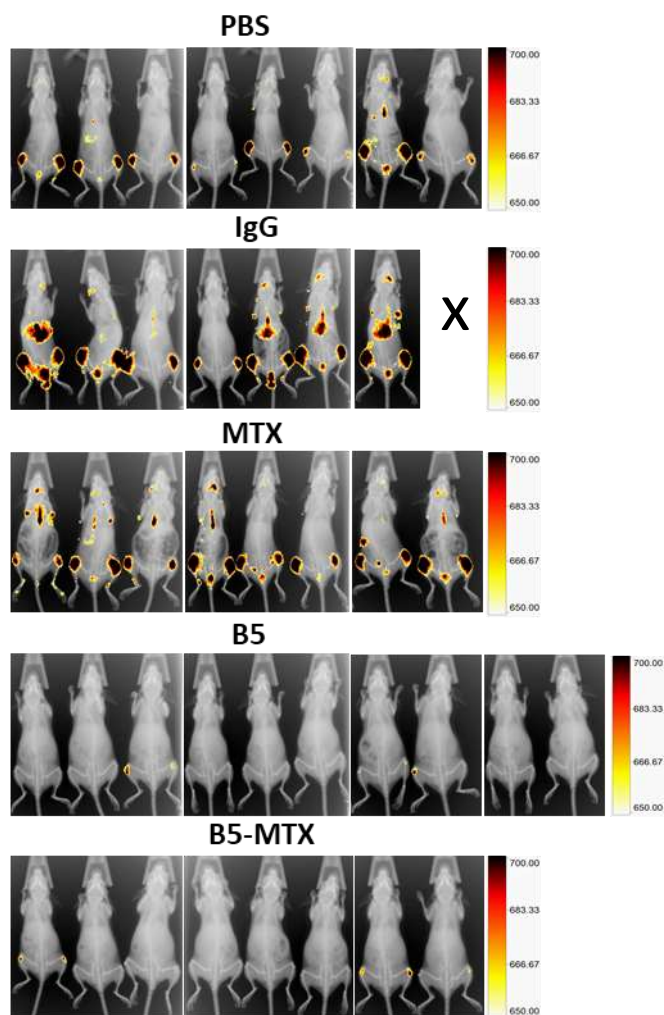
Tabela 6 Czas do wystąpienia objawów choroby (CWOCh – 20% utraty wagi/paraliż dolnych kończyn) w poszczególnych grupach myszy

Grupa	Liczba myszy	CWOCh [w dniach]
B5-MTX	3	28,0 ±8,49
B5	5	22,0 ±2,45
MTX	8	14,0 ±1,00
IgG	8	13,5 ±0,86
PBS	8	14,7 ±0,69

4.6.1 Obrazowanie ognisk wzrostu nowotworu u myszy NOD-SCID obciążonych komórkami linii CLBL1-LUC

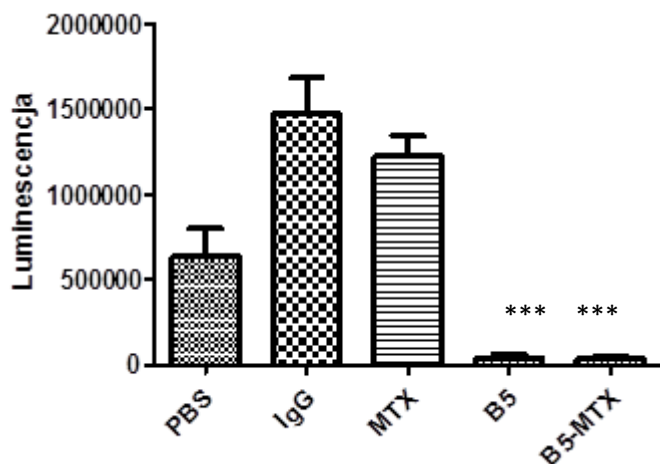
15 dnia od przeszczepienia komórek CLBL1-LUC u myszy wszystkich grup eksperymentalnych przeprowadzono obrazowanie luminescencji. Na Rysunku 28 przedstawiono umiejscowienie komórek CLBL1-LUC u każdej myszy. U grup kontrolnych, czyli myszy, którym podawano PBS, kontrolne przeciwciało IgG lub wolny MTX, komórki nowotworowe tworzyły duże skupiska

w stawach biodrowych oraz kilka innych ognisk w innych tkankach ciała. (Na obrazie brakuje jednej myszy z grupy IgG, która padła w noc poprzedzającą prześwietlenie). U myszy leczonych są widoczne niewielkie ogniska wzrostu nowotworu w stawie biodrowym.



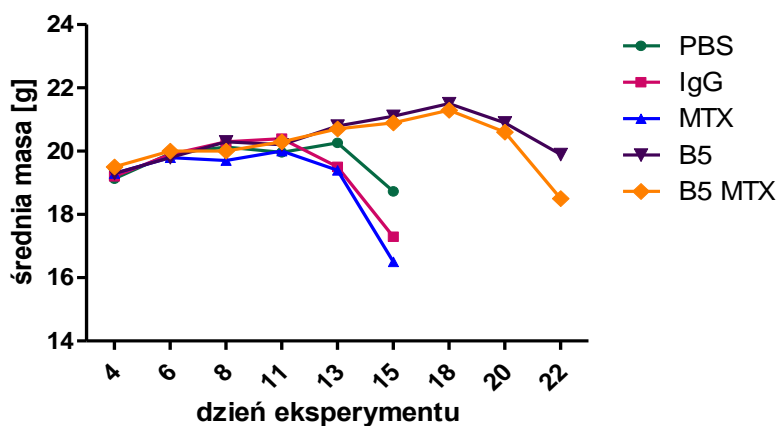
Rysunek 28 Obraz luminescencji komórek CLBL1-LUC po dożylnym podaniu myszom D-lucyferyny w 15 dniu po wszczepieniu komórek. Obrazy zostały uzyskane za pomocą kamery CareStream [źródło [63]].

Dla lepszego zobrazowania różnic na Rysunku 29 przedstawiono wyliczoną średnią luminescencję każdej z grup. Widać ponad 30-krotną różnicę między grupami IgG i MTX a B5 i B5-MTX.



Rysunek 29 Średni poziom luminescencji w 15 dniu eksperymentu obliczony dla każdej z grup myszy. Analiza statystyczna obejmowała jednoczynnikową analizę wariancji oraz poprawkę Bonferroniego. Trzy gwiazdki (***) wskazuje istotność statystyczną na poziomie $p < 0,001$ względem grupy traktowanej kontrolnym przeciwciałem IgG.

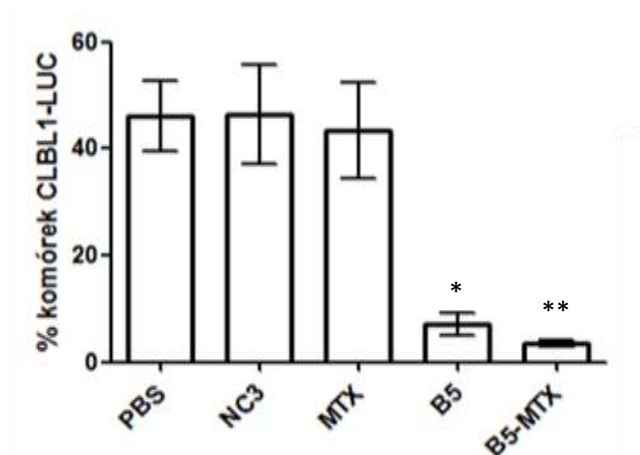
Istotnym badaniem wskaźnikiem stanu zdrowia myszy była ich masa. Myszy z grup kontrolnych traciły na wadze począwszy od dnia 13. W dniu 15 ubytek wagi w tych grupach wynosił około 20%. Na Rysunku 30 pokazano uśrednione masy całych poszczególnych grup myszy w poszczególnych dniach eksperymentu.



Rysunek 30 Średnia masa każdej z grup myszy w danym dniu eksperymentu licząc od dnia przeszczepienia komórek CLBL1-LUC [źródło [63]].

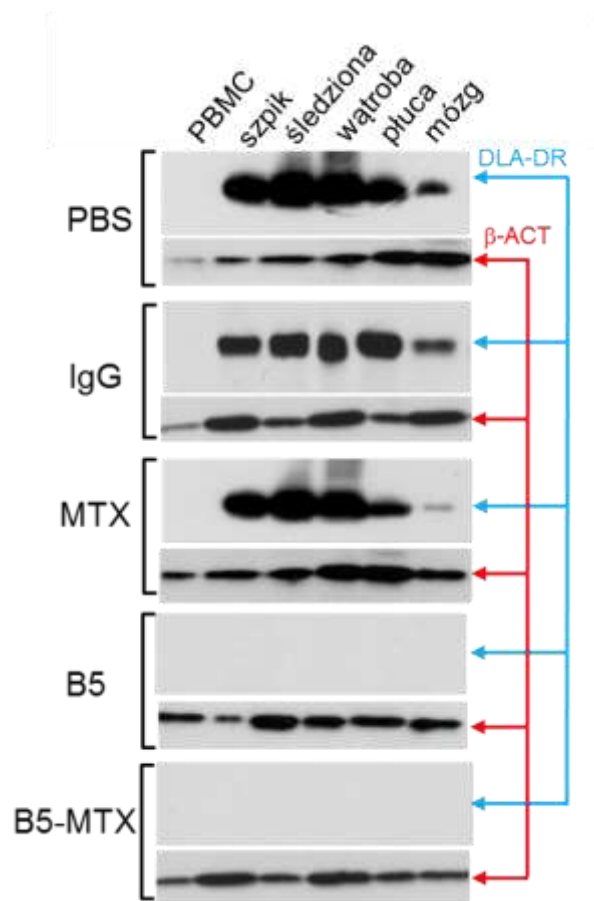
4.6.2 Analiza organów

Z każdej myszy pobrano pośmiertnie kość udową, z której wyizolowano szpik kostny do analizy procentowej zawartości komórek CLBL1-LUC. We wszystkich grupach kontrolnych średnia zawartość komórek nowotworowych wynosiła około 45% natomiast w grupie leczonej B5 ok. 10%, a B5-MTX ok. 5% (Rysunek 31).



Rysunek 31 Odsetek komórek CLBL1-LUC w szpiku kostnym w badanych grupach myszy określona na podstawie analizy cytometrycznej za pomocą przeciwciała E11. Analiza statystyczna obejmowała jednoczynnikową analizę wariancji oraz poprawkę Bonferroniego. Gwiazdka (*) wskazuje istotność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, dwie gwiazdki (**) $p < 0,01$, względem grupy traktowanej kontrolnym przeciwciałem IgG. [źródło [63]].

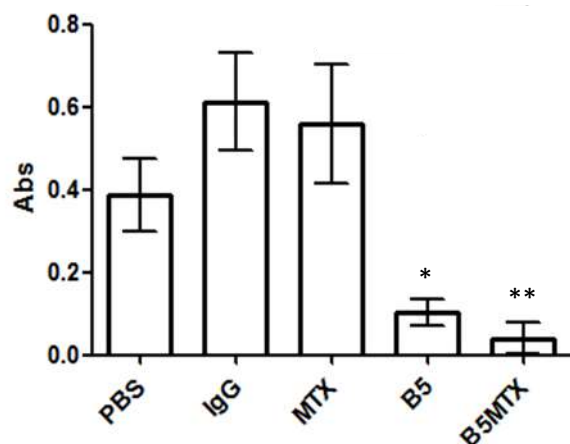
Dodatkowo pobrano z myszy organy do analizy: mózg, śledzionę, wątrobę, płuca oraz wyizolowano jednojądrzaste komórki z krwi (PBMC), a następnie wykonano analizę organów techniką Western blotting na obecność komórek CLBL1-LUC za pomocą przeciwciała E11 [Wykonano przez dr Andrzeja Rapaka]. Pokazano swoiste, mocne pasma wskazujące na obecność komórek nowotworowych u myszy kontrolnych w szpiku, śledzionie, wątrobie oraz płucach oraz niewielkie sygnały w mózgu. U myszy traktowanych przeciwciałem B5 oraz B5-MTX nie dostrzeżono sygnałów pochodzących od komórek nowotworowych (Rysunek 32).



Rysunek 32 Analiza Western blotting lizatów ze wskazanych mysich organów za pomocą przeciwciała E11 (anty- DLA-DR) wskazująca pośrednio na poziom rozszania komórek CLBL1-LUC w organach. Kontrola ilości lizatu w próbkach została wykonana przeciwciałem anti- β -aktyna (β -ACT) [źródło [63]].

4.6.3 Analiza poziomu sDLA-DR w mysiej surowicy krwi

Ponieważ poziom rozpuszczalnych cząsteczek DLA-DR może być markerem nowotworowym wykorzystano wytworzony wcześniej test ELISA, do zbadania tego parametru w surowicy myszy obciążonych komórkami linii CLBL1-LUC. Wykazano, że w surowicy myszy kontrolnych (grupa PBS, IgG, MTX) poziom sDLA-DR był kilkakrotnie wyższy niż u myszy leczonych, co korelowało z poziomem komórek CLBL1-LUC wykrywanych w organach myszy innymi technikami (Rysunek 33).



Rysunek 33 Względny poziom sDLA-DR w surowicach badanych myszy określony za pomocą absorbancji w teście ELISA opartym o przeciwciała B5 i E11. Wynik przedstawia średnią z trzech powtórzeń eksperymentu. Analiza statystyczna obejmowała jednoczynnikową analizę wariancji oraz poprawkę Bonferroniego. Gwiazdka (*) wskazuje istotność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, dwie gwiazdki (**) $p < 0,01$, względem grupy traktowanej kontrolnym przeciwciałem IgG [źródło [63]].

5 Dyskusja i wnioski

W powyższej pracy udokumentowano badania dwóch uzyskanych przeciwciał rozpoznających antygeny na powierzchni komórek psich linii chłoniaków z komórek B. Wykazano, że zarówno przeciwciało B5 jak i E11 wywołują cytotoksyczność bezpośrednią oraz zależną od dopełniacza oraz powodują fagocytozę zależną od przeciwciał. Po przeprowadzonych eksperymentach na zwierzętach ustalono, że czas przeżycia myszy obarczonych komórkami psiego chłoniaka B-komórkowego, którym zostało podane przeciwciało B5 lub koniugat B5-MTX był odpowiednio o 80 i 90% dłuższy niż u grup kontrolnych. Ponadto wytworzone przeciwciała umożliwiły opracowanie testu ELISA, który pozwala na względne określenie poziomu ekspresji antygeny DLA-DR w formie związanej z błoną oraz rozpuszczalną, w różnych rodzajach próbek materiału biologicznego. W toku pracy wytworzono również przeciwciało kaninizowane, które swoiście barwi komórki psich chłoniaków lecz nie wykazuje bezpośredniego działania cytotoksycznego (wyniki nie pokazane w tej pracy).

5.1 Medycyna weterynaryjna – stosowane terapie

Terapie z użyciem przeciwciał są coraz szerzej wykorzystywane nie tylko w medycynie ludzkiej, gdzie stanowią znaczącą grupę leków stosowanych w onkologii. Współcześnie rozwój nowych preparatów przeciwnowotworowych jest nastawiony na terapie celowane, skierowane bezpośrednio w ścieżki umożliwiające przeżycie i/lub przerzutowanie komórek nowotworowych. Są to głównie inhibitory enzymów (kinaz, proteaz) oraz przeciwciała monoklonalne. Powstaje teraz wiele nowych preparatów, aktualnie jest prowadzonych kilkadziesiąt badań klinicznych. Niestety medycyna weterynaryjna jest mocno opóźniona względem ludzkiej i cierpi na poważne braki w zakresie nowoczesnych leków i terapii. Mimo kilku prób firmy Aratana oraz zaawansowanych prac zespołu profesora Steplewskiego [21], [22], a także prób przedklinicznych kaninizowanego przeciwciała antyCD20 [24] aktualnie w onkologii weterynaryjnej nie wykorzystuje się przeciwciał monoklonalnych do terapii.

Testowane na psach, lecz skierowane przeciwko ludzkiej cząsteczce CCR4 przeciwciała mogamulizumab dało bardzo obiecujące rezultaty w łączonej terapii raka pęcherza u psów [64]. Na psach testowany był również inhibitor kinazy BTK (Acalabrutinib), który wykazał dużą skuteczność, lecz głównym założeniem były badania translacyjne i badania przedkliniczne poprzedzające próby na ludziach [65] oraz Paclitaxel testowany na mysim modelu psiego czerniaka, który spowodował zmniejszenie rozmiarów guza do 30% [66]. Bardzo interesującą nowością w badaniach na psach jest wytworzona szczepionka na telomerazę (TERT), która jest ekspresjonowana na bardzo wysokim poziomie w komórkach nowotworowych w przeciwieństwie do komórek prawidłowych [67]. Pokazuje to, że jest coraz więcej badań mających na celu rozwój medycyny weterynaryjnej i dostępnych w niej preparatów leczniczych. Można też wnioskować, że wiele celów molekularnych z ludzkiej medycyny mogłoby być stosowanych u psów z powodu znaczącej homologii genomu człowieka i psa (ok. 84%). Przez ostatnie 25 lat diagnostyka chłoniaków u psów uczyniła gigantyczny postęp, dzięki rozwojowi genetyki i biologii molekularnej, natomiast nie przełożyło się to jeszcze w znaczącym stopniu na postępy w leczeniu czy wydłużeniu czasu przeżycia psich pacjentów. Chemioterapia wciąż pozostaje podstawowym narzędziem terapeutycznym, które nie jest wystarczające w większości przypadków.

5.2 MHC-II

MHC klasy II, które jest celem uzyskanych przeciwciał, jest cząsteczką odkrytą bardzo wiele lat temu, ale wciąż jej wszystkie funkcje nie zostały poznane. Poza główną rolę, czyli prezentacją antygenów limfocytom T, MHC-II uczestniczy w przekazywaniu sygnału do adhezji, produkcji cytokin jak również do pełnej aktywacji TLR [68]. Ważne jest również, że może przekazywać 2 zupełnie rozbieżne sygnały – do proliferacji komórki (za pomocą CD79) czy przeciwnie prowadzący do apoptozy przez aktywację kinaz ERK, JNK, PKC czy STING co jest wykorzystywane w przypadku przeciwciał terapeutycznych [69]. Z uwagi na to, że sygnałowanie przez MHC-II i dalej przez CD79a/b może wywołać aktywność całego szeregu kinaz – Src, Syk, PLC γ , Fyn czy PI3K, ostateczna odpowiedź komórki może być różna [69].

Ponieważ mechanizmy sygnałowania przez HLA-DR wciąż nie są dokładnie wyjaśnione, większość grup badawczych określa w jaki sposób działają badane przeciwciała, które mogą

powodować bezpośrednią apoptozę zarówno przez CD95 (Fas) jak i w sposób zależny i niezależny od kaspaz [70]–[73]. Wykazano również, że 1D09C3 może powodować generację ROS oraz utratę potencjału mitochondrialnego [70], [74]. Zespół Stein i wsp. potwierdzili również aktywację kinaz JNK oraz ERK podczas sygnalowania przez HLA-DR.

Uzyskane przez nas przeciwciała powodują kaspazo-zależną apoptozę, podobnie jak IMMU-114 [74], a przeciwnie do w pełni ludzkich przeciwciał anty HLA uzyskanych za pomocą phage display przez zespół Nagy i wsp. [73]. Testy z inhibitorem kaspaz – ZVAD, wykazały, że powoduje on znaczące obniżenie poziomu śmiertelności komórek. Natomiast nie zaobserwowano aktywacji szlaków kinaz MAPK czy JNK (dane niepublikowane). Ciekawe jest natomiast, że zablokowanie kinazy FAK (za pomocą inhibitora FAK14) powoduje zwiększenie odsetka komórek w których zachodzi apoptoza (dane niepublikowane). Jak pokazały to też inne grupy badawcze inhibicja kinazy FAK, może uwrażliwiać komórki na zablokowanie innych szlaków sygnalowania proapoptotycznego i powodować większą podatność na apoptozę [75], [76].

MHC-II jako białko o bardzo wysokiej ekspresji na komórkach nowotworowych, może być realnym kandydatem do roli alternatywnego dla CD20 celu terapii. Istnieje spora grupa pacjentów opornych na leczenie rituximabem lub wytwarzających oporność wraz z dłuższym czasem leczenia. Jak zaprezentowano w Rozdziale 1.9.1, różne przeciwciała anty HLA-DR, są testowane od lat w wielu badaniach, w których pokazano ich skuteczność, ale również potencjalne skutki uboczne. Testy przeciwciała Hu1D10 na makakach królewskich pokazały, że powolne, 90 minutowe podanie dożylnie powoduje tylko niewielką nadwrażliwość, natomiast podanie w postaci bolusu, skutkowało poważnymi efektami ubocznymi, w tym jedną śmiercią zwierzęcia z powodu reakcji anafilaktycznej.

Należy również pamiętać, że HLA-DR jest cząsteczką bardzo wysoce polimorficzną, która posiada kilkaset różnych alleli. Powoduje to, że trudno otrzymać przeciwciało o epitopie monomorficznym, reaktywne wobec antygeny u każdego człowieka lub psa. Ponieważ łańcuch α jest zdecydowanie mniej zmienny niż β , wydaje się, że lepszym pomysłem jest wykorzystanie przeciwciał właśnie na łańcuch alfa tak jak w np. IMMU-114, by ograniczyć ten problem.

Jak pokazano w pracy zespołu Steina i wsp. z 2010 roku, przeciwciała anty HLA-DR mogą być równie skuteczne jak anty CD20 takie jak rituximab czy veltuzumab. We wstępnych badaniach przeciwciało IMMU-114, było testowane na osobach wcześniej leczonych i dało odpowiedź

u 50% pacjentów [45], natomiast byli to pacjenci w zaawansowanym stadium choroby, po próbach leczenia za pomocą innych terapii w tym rituximabem, trudno więc spekulować jakie odniosłoby skutki u pacjentów świeżo zdiagnozowanych. Dzięki podskórnemu podaniu oraz pozbawieniu skutków ubocznych, które występowały w przypadku Hu1D10, przeciwciało IMMU-114 nie spowodowało poważnych skutków ubocznych, mimo że cząsteczka HLA występuje również na wielu komórkach prawidłowych (zwłaszcza profesjonalnych komórkach prezentujących antygeny takich jak makrofagi, komórki dendrytyczne, aktywowane limfocyty B i aktywowane komórki śródbłónka naczyń krwionośnych). Innym minusem MHC klasy II jako celu terapeutycznego jest to, że wraz z rozwojem choroby, komórki nowotworowe mogą tracić ekspresję HLA-DR [77], [78], co zazwyczaj oznacza bardzo złe rokowania i uniemożliwia leczenie skierowane w tą cząsteczkę.

5.3 Przeciwciała i koniugaty w modelach in vivo

Aktualnie w celu polepszania aktywności przeciwnowotworowych przeciwciał coraz częściej koniuguje się je z cytostatykami, co umożliwia obniżenie dawki i większą skuteczność przeciwnowotworową przeciwciał. W poniższej pracy aby otrzymać lepsze właściwości cytotoksyczne skoniugowano przeciwciało B5 z metotreksatem. Jest to bardzo popularny cytostatyk, szeroko stosowany od wielu lat. Ponieważ jest wykorzystywany od tak dawna, jest dobrze przebadany, mimo że dokładny mechanizm działania wciąż nie jest szczegółowo poznany. Zespół doktor Pawlak pokazał również, że psie linie komórkowe chłoniaków są ponad kilkukrotnie wrażliwsze na metotreksat niż linie ludzkie [79]. W badaniach in vivo w przypadku B5 mAb i jego koniugatu obserwujemy diametralną różnicę w działaniu w porównaniu do wolnego metotreksatu i koniugatu, natomiast niestety nie otrzymano statystycznie istotnego polepszenia działania koniugatu wobec wolnego przeciwciała. Może to wynikać ze zbyt małego podstawienia, lecz nie jest możliwe uzyskanie wyższego stopnia podstawienia lekiem bez dalszej utraty powinowactwa przeciwciała. Istnieje natomiast możliwość wytworzenia koniugatu z innym chemioterapeutycznym takim jak doksorubicyna, auristatyna czy cisplatyna. IMMU-114 zostało skoniugowane z inhibitorem topoizomerazy SN-38, co dało bardzo dobre efekty zarówno w przypadku chłoniaków, jak również czerniaka złośliwego [47]. Interesującym podejściem

do leczenia chłoniaków jest również wykorzystanie do radioterapii przeciwciał anty CD20, CD22 i HLA-DR skoniugowanych z awidyną w połączeniu z radioaktywnym koniugatem [80].

W zastosowanym modelu nie otrzymano całkowitego wyleczenia myszy, natomiast eksperyment został wykonany przy dosyć niskich dawkach przeciwciała (2,5mg/kg) oraz agresywnym modelu choroby – przeszczepionych zostało 10 milionów komórek, a leczenie rozpoczęto po 4 dniach. IMMU-114 było testowane w różnych dawkach na różnych liniach komórkowych, jednak całkowite wyleczenie otrzymano tylko przy wysokiej dawce 12,5mg/kg, w przypadku komórek WSU-FSCCL [43]. Zespół Carlo-Stella zastosował jeszcze większe dawki przeciwciała wynoszące 1mg na mysz, otrzymując również jedynie wydłużenie czasu przeżycia o 50% [70], natomiast bispecyficzne przeciwciała CD20– 243 CrossMab, już w dawce 30µg na mysz wydłużyło czas przeżycia myszy do 82 dni w stosunku do 30 dni u myszy kontrolnych [46].

5.4 MHC-II jako marker

Cząsteczki MHC-II poza celem terapeutycznym, są też badane jako marker diagnostyczny służący do monitorowania stopnia zaawansowania choroby w przebiegu chłoniaków. Poziom rozpuszczalnego HLA-DR (sHLA-DR) jest badany przez wiele zespołów w różnych jednostkach chorobowych, niestety wciąż nie jest do końca jasny mechanizm powstawania cząsteczek sHLA-DR. Wiadomo natomiast, że mają właściwości immunoregulujące i sHLA-DR może przyłączać się do antygeny CD4 wywierając działanie supresyjne na komórki efektorowe [81]. Ciekawe jest podwyższenie sHLA-DR jako markera zapalenia błony naczyniowej przedniego odcinka oka [56] jak również obniżony poziom sHLA-DR u osób palących papierosy [82]. Jak przedstawiono w rozdziale 1.11, poziom sHLA-DR może się zmieniać w przypadku nowotworów takich jak chłoniaki czy czerniaki.

W ciągu ostatnich lat dzięki rozwojowi biologii molekularnej, a także poszerzeniu wiedzy na temat chłoniaków bardzo rozszerzyły się możliwości diagnostyczne, które umożliwiają precyzyjne rozpoznanie choroby, natomiast wciąż brakuje markerów służących do szybkiej diagnozy oraz monitorowania postępów leczenia. W wykonanym eksperymencie otrzymaliśmy

istotną korelację poziomu sDLA-DR u myszy z poziomem zaawansowania choroby. Ponieważ do badań wykorzystano myszy upośledzone immunologicznie nie występują ani endogenne rozpuszczalne cząsteczki MHC-II, ani receptory zdolne do ich związania. Obserwujemy jedynie sDLA-DR wydzielane przez komórki CLBL1. W takim modelu badawczym sDLA-DR jest bardzo dobrym markerem, niemalże idealnie odwzorowującym wzrost nowotworu. Mimo znacznej rozpiętości wyników obserwowanych u pacjentów, udało się zaobserwować istotne podwyższenie poziomu HLA-DRB1 u osób cierpiących na ostrą białaczkę limfoblastyczną [58]. W naszych badaniach wykazaliśmy również istotne różnice między grupą psów cierpiących na chłoniaka oraz kontrolną, jednak zmienność osobnicza przy stosunkowo nielicznej grupie pacjentów, utrudnia określenie stanu zdrowia zwierzęcia na podstawie tylko tego parametru. Poziom sDLA-DR może być pewną wskazówką, lecz nie może być jedynym narzędziem diagnostycznym.

5.5 Potencjalne wykorzystanie przeciwciał u psów

Otrzymane wyniki potwierdzają rezultaty otrzymane przez inne grupy badawcze pokazujące, że przeciwciała rozpoznające MHC-II, mogą być dobrym narzędziem do wykorzystania w terapii chłoniaków B-komórkowych. Otrzymane przez nas przeciwciało nie było testowane na psich pacjentach, więc nie można przewidzieć skuteczności na gatunku docelowym. Jednakże IMM-114, o znacznie mniejszym powinowactwie do psich komórek, wykazało pewną skuteczność w terapii na psach, więc daje to sporą nadzieję na dużą aktywność terapeutyczną mAb B5.

Ponadto humanizowane przeciwciało (IMMU-114) nie wywołało znaczących efektów ubocznych u psów, lecz w powyższej pracy udało się wytworzyć kaninizowane przeciwciało, które być może będzie lepszym rozwiązaniem niż przeciwciało mysie. Niestety uzyskane przeciwciało kaninizowane nie wykazuje bezpośredniej cytotoksyczności, więc wydaje się, że najlepszą opcją byłoby uzyskanie koniugatu z silnym cytostatykiem. Aktualnie na rynku istnieje tylko jedno w pełni kaninizowane przeciwciało – Lokivetmab rozpoznające interleukinę 31. Przeciwciało NV-01 skierowane w NGF oraz can225 anty-EGFR niestety nie weszły na rynek farmaceutyczny [27], [83].

5.6 Podsumowanie

Otrzymano przeciwciała o reaktywności wobec psiego DLA-DR i potwierdzonej aktywności cytotoksycznej *in vitro* oraz *in vivo* na modelu mysim, które wykorzystano również do wytworzenia testu ELISA umożliwiającego określanie poziomu DLA-DR zarówno w biopatach z węzłów chłonnych, liniach komórkowych oraz płynach ustrojowych. Pokazano, że istnieje zależność między liczbą obecnych w organizmie myszy komórek nowotworowych, a ilością rozpuszczalnego DLA-DR obecnego w surowicy krwi. Zaobserwowano także podobny trend wzrostu poziomu cząsteczek sDLA-DR we krwi psów chorych na chłoniaka B-komórkowego w porównaniu do psów zdrowych. Wytworzono również przeciwciała kaninizowane, które może posłużyć do dalszych prób klinicznych.

6 Wnioski końcowe

1. Za pomocą wytworzonych w tej pracy przeciwciał wykazano wysoką ekspresję powierzchniową cząsteczek DLA-DR na powierzchni większości badanych psich chłoniaków B komórkowych oraz mieszanych B/T-komórkowych, a także nieco niższą ekspresję w przypadku chłoniaków T komórkowych. Wzór ekspresji cząsteczek DLA-DR jest spójny z publikowanymi danymi o ekspresji cząsteczek HLA-DR w ludzkich chłoniakach nieziarniczych, co stanowi silną przesłankę do dalszych badań nad wykorzystaniem cząsteczek DLA-DR jako celu terapeutycznego w medycynie weterynaryjnej.
2. Przeciwciała B5 i E11 wykazują bezpośrednią kaspazo-zależną aktywność proapoptotyczną wobec linii psich chłoniaków B-komórkowych in vitro co potwierdza, że ścieżki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej pobudzane przez przeciwciała rozpoznające psie cząsteczki DLA-DR są zakonserwowane ewolucyjnie i mogą stanowić dobry model badawczy dla medycyny translacyjnej.
3. Przeciwciało B5 i koniugat B5-MTX w mysich modelach przedklinicznych znacząco opóźniają rozwój psich chłoniaków co stanowi przesłankę, że cząsteczka DLA-DR stanowi obiecujący cel terapeutyczny dla dalszych badań klinicznych na gatunku docelowym.

7 Literatura

- [1] A. R. Rezvani and D. G. Maloney, "Rituximabe Resistance," *Best Pr. Res Clin Haematol.*, vol. 24, no. 2, pp. 203–126, 2011.
- [2] K. L. Richards and S. E. Suter, "Man's best friend: what can pet dogs teach us about non- Hodgkin lymphoma?," *Immunol. Rev.*, vol. 263, no. 1, pp. 173–191, 2015.
- [3] J. S. Park *et al.*, "Canine cancer immunotherapy studies: Linking mouse and human," *J. Immunother. Cancer*, vol. 4, no. 1, pp. 1–11, 2016.
- [4] J. L. Rowell, D. O. McCarthy, and C. E. Alvarez, "Dog models of naturally occurring cancer," *Trends Mol. Med.*, vol. 17, no. 7, pp. 380–388, 2011.
- [5] S. G. Fisher and R. I. Fisher, "The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma," *Oncogene*, vol. 23, no. 38, pp. 6524–6534, 2004.
- [6] A. Smith *et al.*, "Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004-2014: Sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network," *Br. J. Cancer*, vol. 112, no. 9, pp. 1575–1584, 2015.
- [7] B. A. Bassig, Q. Lan, N. Rothman, Y. Zhang, and T. Zheng, "Current understanding of lifestyle and environmental factors and risk of non-Hodgkin lymphoma: An epidemiological update," *J. Cancer Epidemiol.*, vol. 2012, 2012.
- [8] C. R. Dorn, D. O. N. Taylor, R. Schneider, H. H. Hibbard, and M. R. Klauber, "Survey of Animal Neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer Morbidity in Dogs and Cats From Alameda County2," *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 40, no. 2, pp. 307–318, Feb. 1968.
- [9] D. Villarnovo, A. L. McCleary-Wheeler, and K. L. Richards, "Barking up the right tree: Advancing our understanding and treatment of lymphoma with a spontaneous canine model," *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 24, no. 4, pp. 359–366, 2017.
- [10] P. P. Y. Yau, N. K. Dhand, P. C. Thomson, and R. M. Taylor, "Retrospective study on the occurrence of canine lymphoma and associated breed risks in a population of dogs in NSW (2001–2009)," *Aust. Vet. J.*, vol. 95, no. 5, pp. 149–155, 2017.
- [11] Aresu *et al.*, "New molecular and therapeutic insights into canine diffuse large B-cell lymphoma elucidates the role of the dog as a model for human disease," *Hematologica*, vol. 104, no. 6, 2019.
- [12] J. F. M. D. Ito, Aric M. Frantz, "Canine Lymphoma as a Comparative Model for Human NonHodgkin Lymphoma: Recent Progress and Applications," *Vet Immunol Immunopathol.*, vol. 159, no. 3–4, pp. 192–201, 2014.
- [13] G. Salles *et al.*, "Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience," *Adv. Ther.*, vol. 34, no. 10, pp. 2232–2273, 2017.
- [14] B. Powroźnik, P. Kubowicz, and E. Pękała, "Przeciwciała monoklonalne w terapii celowanej Monoclonal antibodies in targeted therapy," pp. 663–673, 2012.

- [15] N. Dan *et al.*, "Antibody-drug conjugates for cancer therapy: Chemistry to clinical implications," *Pharmaceuticals*, vol. 11, no. 2, 2018.
- [16] O. A. O'Connor and K. Tobinai, "Putting the clinical and biological heterogeneity of non-Hodgkin lymphoma into context," *Clin. Cancer Res.*, vol. 20, no. 20, pp. 5173–5181, 2014.
- [17] S. Crisci *et al.*, "Overview of targeted drugs for mature B-cell non-hodgkin lymphomas," *Front. Oncol.*, vol. 9, no. JUN, 2019.
- [18] T. Yamada, "Therapeutic Monoclonal Antibodies," *Keio J. Med.*, vol. 60, no. 2, pp. 37–46, 2011.
- [19] M. Zandvliet, "Canine lymphoma: a review," *Vet. Q.*, vol. 36, no. 2, pp. 76–104, 2016.
- [20] L. Marconato, M. E. Gelain, and S. Comazzi, "The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review," *Hematol. Oncol.*, vol. 41, pp. 1–9, 2013.
- [21] Z. Steplewski, K. A. Jeglum, C. Rosales, and N. Weintraub, "Canine lymphoma-associated antigens defined by murine monoclonal antibodies," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 24, no. 3, pp. 197–201, 1987.
- [22] K. A. Jeglum, "Chemoimmunotherapy of canine lymphoma with adjuvant canine monoclonal antibody 231," *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.*, vol. 26, no. 1, pp. 73–85, 1996.
- [23] D. Ito, S. B. F., J. Modiano, and M. J. Beall, "Development of a novel anti-canine CD20 monoclonal antibody with diagnostic and therapeutic potential," vol. 56, no. 1, pp. 219–225, 2015.
- [24] S. M. Rue *et al.*, "Identification of a candidate therapeutic antibody for treatment of canine B-cell lymphoma," *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 164, no. 3–4, pp. 148–159, 2015.
- [25] K. Weiskopf *et al.*, "Eradication of Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Murine Xenograft Model with CD47 Blockade and Anti-CD20," *Cancer Immunol Res*, vol. 176, no. 10, pp. 139–148, 2016.
- [26] R. P. Webster, G. I. Anderson, and D. P. Gearing, "With Osteoarthritis Before and After Nerve Growth Factor," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 75, no. 6, pp. 532–535, 2014.
- [27] M. Enomoto, P. W. Mantyh, J. Murrell, J. F. Innes, and B. D. X. Lascelles, "Anti-nerve growth factor monoclonal antibodies for the control of pain in dogs and cats," *Vet. Rec.*, vol. 184, no. 1, pp. 1–14, 2019.
- [28] S. S. Abolmaali, A. M. Tamaddon, and R. Dinarvand, "A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 71, no. 5, pp. 1115–1130, 2013.
- [29] P. Klimo and J. M. Connors, "MACOP-B chemotherapy for the treatment of diffuse large-cell lymphoma," *Ann. Intern. Med.*, vol. 102, no. 5, pp. 596–602, 1985.
- [30] G. S. A. Longo-Sorbello and J. R. Bertino, "Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials GIUSEPPE," *Haematologica*, vol. 86, no. February, pp. 121–127, 2001.
- [31] M. Pohlen *et al.*, "Efficacy and toxicity of a rituximab and methotrexate based regimen (GMALL B-

- ALL/NHL 2002 protocol) in Burkitt's and primary mediastinal large B-cell lymphoma," *Am. J. Hematol.*, vol. 86, no. 12, pp. 61–76, 2011.
- [32] M. A. Schwarzbich, T. Schöning, M. Cremer, K. Lisenko, A. D. Ho, and M. Witzens-Harig, "Efficacy and toxicity of a rituximab and methotrexate based regimen (GMALL B-ALL/NHL 2002 protocol) in high risk diffuse large cell B-cell lymphoma patients as a first line treatment," *Leuk. Lymphoma*, vol. 57, no. 7, pp. 1723–1726, 2016.
- [33] A. Pawlak, B. Obmińska-Mrukowicz, and A. Rapak, "Pies jako model do badań porównawczych nad ludzkimi chłoniakami i białaczkami," *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 67, pp. 471–480, 2013.
- [34] J. Kanellos, G. A. Pietersz, and I. F. C. Mckenzie, "Studies of Methotrexate-Monoclonal Antibody," vol. 75, no. 2, 1985.
- [35] J. Ciekot, T. Goszczyński, and J. Boratyński, "Methods for methotrexate determination in macromolecular conjugates drug carrier," *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.*, vol. 69, no. 6, pp. 1342–1346, 2012.
- [36] M. Dechant, J. Bruenke, and T. Valerius, "HLA class II antibodies in the treatment of hematologic malignancies," *Semin. Oncol.*, vol. 30, no. 4, pp. 465–475, 2003.
- [37] K. Bakela and I. Athanassakis, "Soluble major histocompatibility complex molecules in immune regulation: highlighting class II antigens," *Immunology*, vol. 153, no. 3, pp. 315–324, 2018.
- [38] S. H. Bridges, A. M. Kruisbeek, and D. L. Longo, "Selective in vivo antitumor effects of monoclonal anti-I-A antibody on B cell lymphoma," *J. Immunol.*, vol. 139, no. 12, pp. 4242–4249, 1987.
- [39] D. Elsässer *et al.*, "HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor," *Blood*, vol. 87, no. 9, pp. 3803–3812, 1996.
- [40] E. Stathopoulos, F. M. Chen, J. W. Parker, and C. R. Taylor, "Two new monoclonal antibodies, lym-1 and lym-2, reactive with human B-lymphocytes and derived tumors, with immunodiagnostic and immunotherapeutic potential," *Cancer Res.*, vol. 47, no. 3, pp. 830–840, 1987.
- [41] L. Zheng *et al.*, "Lym-1 chimeric antigen receptor T cells exhibit potent anti-tumor effects against B-cell lymphoma," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 12, 2017.
- [42] J. Rech *et al.*, "A humanized HLA-DR antibody (hu1D10, apolizumab) in combination with granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: A pilot study," *Leuk. Lymphoma*, vol. 47, no. 10, pp. 2147–2154, 2006.
- [43] R. Stein *et al.*, "Therapy of B-cell malignancies by anti-HLA-DR humanized monoclonal antibody, IMMU-114, is mediated through hyperactivation of ERK and JNK MAP kinase signaling pathways," *Blood*, vol. 115, no. 25, pp. 5180–5190, 2010.
- [44] R. Stein, Z. Qu, S. Chen, D. Solis, H. J. Hansen, and D. M. Goldenberg, "Characterization of a humanized IgG4 anti-HLA-DR monoclonal antibody that lacks effector cell functions but retains direct antilymphoma activity and increases the potency of rituximab," *Blood*, vol. 108, no. 8, pp. 2736–2744, 2006.
- [45] D. M. Stephens *et al.*, "Subcutaneous Injections of IMMU-114 (Anti-HLA-DR IgG4 Monoclonal

- Antibody): Initial Results of a Phase I First-in-Man Study in Hematologic Malignancies," *Blood*, vol. 126, no. 23, p. 2740, Dec. 2015.
- [46] L. Zhao *et al.*, "Combating non-Hodgkin lymphoma by targeting both CD20 and HLA-DR through CD20-243 CrossMab," *MAbs*, vol. 6, no. 3, pp. 740–748, 2014.
- [47] T. M. Cardillo *et al.*, "IMMU-140, a novel SN-38 antibody-drug conjugate targeting HLA-DR, mediates dual cytotoxic effects in hematologic cancers and malignant melanoma," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 17, no. 1, pp. 150–160, 2018.
- [48] W. Dong *et al.*, "Antibody-drug conjugates of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: Sacituzumab govitecan and labetuzumab govitecan," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 167, pp. 583–593, 2019.
- [49] S. B. Makgoeng *et al.*, "Markers of Immune Activation and Inflammation, and Non-Hodgkin Lymphoma: A Meta-Analysis of Prospective Studies," *JNCI Cancer Spectr.*, vol. 2, no. 4, pp. 1–13, 2018.
- [50] M. P. Purdue, Q. Lan, H. Langseth, T. K. Grimsrud, A. Hildesheim, and N. Rothman, "Pre-diagnostic serum sCD27 and sCD30 in serial samples and risks of non-Hodgkin lymphoma subtypes," *Int. J. Cancer*, 2019.
- [51] A. M. F. Shehata, A. I. Aldesoky, and S. F. Gohar, "Plasma fibrinogen level as possible prognostic biomarker in diffuse large B-cell lymphoma," *Hematology*, vol. 8454, 2018.
- [52] N. H. Anber, A. H. EL-Sebaie, N. H. E. Darwish, S. A. Mousa, and S. S. Shamaa, "Prognostic value of some inflammatory markers in patients with lymphoma," *Biosci. Rep.*, vol. 39, no. 3, pp. 1–12, 2019.
- [53] H. von Euler, R. Einarsson, U. Olsson, A.-S. Lagerstedt, and E. Staffan, "Serum Thymidine Kinase Activity in Dogs with Malignant Lymphoma: A Potent Marker for Prognosis and Monitoring the Disease," *J. Vet. Intern. Med.*, vol. 18, no. 115, pp. 696–792, 2004.
- [54] A. Steinborn, V. Rebmann, A. Scharf, C. Sohn, and H. Grosse-Wilde, "Soluble HLA-DR levels in the maternal circulation of normal and pathologic pregnancy," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 188, no. 2, pp. 473–479, 2003.
- [55] D. Aultman *et al.*, "Soluble HLA in human body fluids," *Hum. Immunol.*, vol. 60, no. 3, pp. 239–244, 1999.
- [56] A. Heiligenhaus *et al.*, "Soluble HLA class I and HLA-DR plasma levels in patients with anterior uveitis," *Tissue Antigens*, vol. 63, no. 4, pp. 369–375, 2004.
- [57] K. A. Pfeiffer *et al.*, "Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization," *Hum. Immunol.*, vol. 61, no. 6, pp. 559–564, 2000.
- [58] N. Hassan *et al.*, "Increased soluble HLA-DRB1 in B-cell acute lymphoblastic leukaemia," *Malays. J. Pathol.*, vol. 37, no. 2, pp. 83–90, 2015.
- [59] N. Kubysheva *et al.*, "Soluble HLA-i and HLA-ii molecules are potential prognostic markers of progression of systemic and local inflammation in patients with copd," *Dis. Markers*, vol. 2018, 2018.

- [60] V. Rebmann, S. Ugurel, W. Tilgen, U. Reinhold, and H. Grosse-Wilde, "Soluble HLA-DR is a potent predictive indicator of disease progression in serum from early-stage melanoma patients," *Int. J. Cancer*, vol. 100, no. 5, pp. 580–585, 2002.
- [61] M. R. Green and J. Sambrook, "Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with sodium dodecyl sulfate: Minipreps," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2016, no. 10, pp. 911–916, 2016.
- [62] M. Lisowska *et al.*, "Development of novel monoclonal antibodies to dog leukocyte antigen DR displaying direct and immune-mediated cytotoxicity toward canine lymphoma cell lines," *Hematol. Oncol.*, vol. 36, no. 3, pp. 554–560, 2018.
- [63] M. Lisowska *et al.*, "An antibody specific for the dog leukocyte antigen dr (Dla-dr) and its novel methotrexate conjugate inhibit the growth of canine b cell lymphoma," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 10, pp. 1–14, 2019.
- [64] S. Maeda, K. Murakami, A. Inoue, T. Yonezawa, and N. Matsuki, "CCR4 blockade depletes regulatory T cells and prolongs survival in a canine model of bladder cancer," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 7, no. 7, pp. 1175–1187, 2019.
- [65] B. K. Harrington *et al.*, "Preclinical evaluation of the novel BTK inhibitor acalabrutinib in canine models of B-cell non-hodgkin lymphoma," *PLoS One*, vol. 11, no. 7, 2016.
- [66] J. I. Yang *et al.*, "Antitumour effects of Liporaxel (oral paclitaxel) for canine melanoma in a mouse xenograft model," *Vet. Comp. Oncol.*, no. May, pp. 1–9, 2019.
- [67] J. Thalmensi *et al.*, "Research paper a DNA telomerase vaccine for canine cancer immunotherapy," *Oncotarget*, vol. 10, no. 36, pp. 3361–3372, 2019.
- [68] X. Liu *et al.*, "Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk," *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 5, pp. 416–424, 2011.
- [69] D. S. Katikaneni and L. Jin, "B cell MHC class II signaling: A story of life and death," *Hum. Immunol.*, vol. 80, no. 1, pp. 37–43, 2019.
- [70] C. Carlo-Stella *et al.*, "The anti-human leukocyte antigen-DR monoclonal antibody 1D09C3 activates the mitochondrial cell death pathway and exerts a potent antitumor activity in lymphoma-bearing nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 3, pp. 1799–1808, 2006.
- [71] V. Blancheteau, D. Charron, and N. Mooney, "HLA Class II Signals Sensitize B Lymphocytes to Apoptosis via Fas/CD95 by Increasing FADD Recruitment to Activated Fas and Activation of Caspases," *Hum. Immunol.*, vol. 63, no. 5, pp. 375–383, 2002.
- [72] B. Drénou, V. Blancheteau, D. H. Burgess, R. Fauchet, D. J. Charron, and N. A. Mooney, "A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes," *J. Immunol.*, vol. 163, no. 8, pp. 4115–24, 1999.
- [73] Z. A. Nagy *et al.*, "Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells," *Nat. Med.*, vol. 473, pp. 1145–1152, 2002.
- [74] R. Stein *et al.*, "Evaluation of anti-human leukocyte antigen-DR monoclonal antibody therapy in

- spontaneous canine lymphoma,” *Leuk. Lymphoma*, vol. 52, no. 2, pp. 273–284, 2011.
- [75] P. J. Shi, L. H. Xu, K. Y. Lin, W. J. Weng, and J. P. Fang, “Synergism between the mTOR inhibitor rapamycin and FAK down-regulation in the treatment of acute lymphoblastic leukemia,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2016.
- [76] P. Pten *et al.*, “Article FAK Mediates a Compensatory Survival Signal Article FAK Mediates a Compensatory Survival Signal Parallel to PI3K-AKT in PTEN -Null T-ALL Cells,” *CellReports*, vol. 10, no. 12, pp. 2055–2068, 2015.
- [77] M. Bushway, K. A. Cycon, K. Mulvaney, and S. P. Murphy, “Coordinate loss of MHC class II expression in the diffuse large B cell lymphoma cell line OCI-Ly2 is due to a novel mutation in RFX-AP,” *Immunogenetics*, vol. 62, no. 2, pp. 109–116, 2010.
- [78] R. A. Roberts *et al.*, “Loss of major histocompatibility class II gene and protein expression in primary mediastinal large B-cell lymphoma is highly coordinated and related to poor patient survival,” *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 311–318, 2006.
- [79] A. Pawlak, J. Kutkowska, B. Obmińska-Mrukowicz, and A. Rapak, “Methotrexate induces high level of apoptosis in canine lymphoma/leukemia cell lines,” *Res. Vet. Sci.*, vol. 114, pp. 518–523, 2017.
- [80] J. M. Pagel *et al.*, “A comparative analysis of conventional and pretargeted radioimmunotherapy of B-cell lymphomas by targeting CD20, CD22, and HLA-DR singly and in combinations,” *Blood*, vol. 113, no. 20, pp. 4903–4913, 2009.
- [81] R. Claus *et al.*, “In vitro effects of solubilized HLA-DR--role in immunoregulation?,” *Cell. Immunol.*, vol. 155, pp. 476–485, 1994.
- [82] J. Tolva *et al.*, “Soluble HLA-DR serum levels are associated with smoking but not with acute coronary syndrome,” *Atherosclerosis*, vol. 266, pp. 58–63, 2017.
- [83] J. Singer *et al.*, “Generation of a canine anti-EGFR (ErbB-1) antibody for passive immunotherapy in dog cancer patients,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 13, no. 7, pp. 1777–1790, 2014.

8 Spis tabel i rysunków

Tabele

Tabela 1 Przeciwciała stosowane w terapii chłoniaków [na postawie [17]]	23
Tabela 2 Startery użyte do wytworzenia konstrukcji genowych do ekspresji powierzchniowej łańcuchów psich i mysich MHC-II: psiego DLA-DR i mysiego I-E (podkreślone miejsce restrykcyjne):	39
Tabela 3 Startery użyte do uzyskania cDNA do konstrukcji kaninizowanego przeciwciała (H-łańcuch ciężki, L-łańcuch lekki, podkreślone miejsce restrykcyjne, pogrubione sekwencje komplementarne, łączące się w reakcji fuzyjnego PCR):	39

Tabela 4 Dawki preparatów podawanych myszom.....	46
Tabela 5 Lista przebadanych bioptatów o określonym fenotypie wraz z średnią intensywnością fluorescencji analizy cytometrycznej [MFI 50-150: +, MFI 150-500: ++, MFI >500: +++].....	51
Tabela 6 Czas do wystąpienia objawów choroby (CWOCh – 20% utraty wagi/paraliż dolnych kończyn) w poszczególnych grupach myszy	72

Rysunki

Rysunek 1 Liczba zachorowań na chłoniaki w USA [źródło [7]].	19
Rysunek 2 Częstość występowania danego typu chłoniaka u psów i ludzi [źródło [12]].	21
Rysunek 3 Budowa MHC-II [https://microbeonline.com/difference-mhc-class-mhc-class-ii-proteins/] ..	27
Rysunek 4 Mapa wektora pVITRO1-neo z wklonowanymi hybrydowanymi łańcuchami przeciwciała. Kolorem niebieskim zaznaczono łańcuch lekki (na granatowo psią część stałą, błękitnym mysią część zmienną), fioletowym łańcuch ciężki (jaśniejszym kolorem - część psią, ciemniejszym – mysią).	48
Rysunek 5 Analiza cytofluorymetryczna reaktywności otrzymanych przeciwciał wobec limfoidalnych psich linii komórkowych oraz leukocytów krwi obwodowej (PBMC). Barwienie za pomocą supernatantów znad hybrydom B5 oraz i E11 i koniugatu fluorescencyjnego drugorzędowego przeciwciała anty mysie IgG [źródło [62]].	50
Rysunek 6 Analiza cytofluorymetryczna reaktywności otrzymanych przeciwciał wobec komórek ze świeżych biopsji cienkoigłowych węzłów chłonnych psów cierpiących na chłoniaka B komórkowego oraz B/T komórkowego.....	52
Rysunek 7 Rozdział elektroforetyczny produktów immunoprecypitacji z lizatów białkowych linii CLBL1 za pomocą przeciwciał B5 i E11 oraz identyfikacja składu białek w wyciętych fragmentach żelu (czerwone ramki) metodą spektometrii mas.....	53
Rysunek 8 Analiza cytometryczna reaktywności przeciwciał B5 i E11 wobec łańcuchów α i β cząsteczek DLA-DR (DR $\alpha\beta$), DLA-DQ, (DQ $\alpha\beta$) oraz chimerowych cząsteczek DLA-DR α DQ β i DLA-DQ α DR β ulegających ekspresji na powierzchni komórek HEK293T po ich przejściowej transfekcji konstrukcjami genowymi.	54
Rysunek 9 Analiza cytofluorymetryczna komórek HEK293T za pomocą przeciwciał B5 i E11 po ich przejściowej transfekcji konstrukcjami genowymi kodującymi łańcuchy α i β psich cząsteczek DLA-DR (DR $\alpha\beta$), DLA-DQ (DQ $\alpha\beta$), mysich cząsteczek I-E (I-E $\alpha\beta$) oraz cząsteczek chimerowych mysio-psich (I-E α DR β i DR α I-E β) [źródło [62]].	55

Rysunek 10 Analiza western blotting reaktywności przeciwciał B5 i E11 oraz przeciwciała anti-DLA-DR β 1 (aDRB1) (rozpoznającego epitop liniowy w obrębie łańcucha β cząsteczki DLA-DR) wobec zdenaturowanych lub nie lizatów linii CLBL1 [źródło [62]].	56
Rysunek 11 Średnia intensywność fluorescencji barwienia uzyskana dla różnych stężeń przeciwciał B5 i E11 oraz L243 na psiej (CLBL1) i ludzkiej (Raji) linii komórkowej [źródło [62]].	57
Rysunek 12 Odsetek żywych komórek linii CLBL1 oraz CLB70 po 48 godzinnej inkubacji z przeciwciałami B5, E11 w porównaniu do próby kontrolnej traktowanej mysim przeciwciałem IgG analizowany za pomocą testu MTS. Wykres przedstawia uśrednione wyniki z 3 eksperymentów.	58
Rysunek 13 Analiza cytofluorymetryczna bezpośredniej cytotoksyczności przeciwciał B5 i E11 wobec komórek CLBL1 i CLB70 metodą barwienia koniugatem fluorescencyjnym aneksyny V i jodkiem propidyny (PI). Jako kontroli izotypowej (IgG) użyto mysich przeciwciał monoklonalnych klasy IgG2a [źródło [62]].	59
Rysunek 14 Analiza cytofluorymetryczna apoptozy wywołanej przeciwciałami B5 i E11 na komórkach CLBL1 i CLB70 metodą barwienia koniugatem fluorescencyjnym substratu dla kaspazy 3/7 i barwnikiem martwych komórek Sytox. Na dotplotach zaznaczono procentową ilość komórek podwójnie pozytywnych czyli martwych na drodze apoptozy. Jako kontroli izotypowej (IgG) użyto mysich przeciwciał monoklonalnych klasy IgG2a [źródło [63]].	60
Rysunek 15 Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający pojedyncze grono komórek CLBL1 traktowanych przeciwciałem B5 przez 24h i wybarwione barwnikiem DAPI, barwnikiem Sytox (czerwony) oraz koniugatem fluorescencyjnym substratu dla kaspazy 3/7 (zielony) [Obrazowanie wykonane przez dr Michała Majkowskiego].	61
Rysunek 16 Odsetek komórek linii CLBL1 aktywujących kaspazę 3/7 w efekcie 24 godzinnego traktowania przeciwciałem B5, kontrolnym mysim przeciwciałem IgG lub buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) przy braku lub w obecności inhibitora kaspaz ZVAD.	61
Rysunek 17 Analiza cytofluorymetryczna śmiertelności komórek poddanych testom na cytotoksyczność zależną od dopełniacza z użyciem przeciwciał B5, E11 oraz kontrolnego IgG za pomocą barwienia jodkiem propidyny. W panelu górnym zaprezentowano wykresy wielkości (FSC-H) i ziarnistości (SSC-H) komórek, a elektronicznymi bramkami (czerwone elipsy) zaznaczono populację komórek żywych. Na dolnym panelu przedstawiono histogramy natężenia fluorescencji jodku propidyny. Zabramkowano (niebieskie linie) populacje komórek martwych.	62
Rysunek 18 Odsetek martwych komórek w teście cytotoksyczności zależnej dopełniacza w funkcji różnych stężeń przeciwciał na dwóch liniach psich chłoniaków B-komórkowych (CLBL1 i CLB70). Analiza została wykonana za pomocą barwienia jodkiem propidyny i analizy cytofluorymetrycznej [źródło [62]].	63
Rysunek 19 Analiza cytofluorymetryczna - wykresy typu „dotplot” wielkości i ziarnistości komórek oraz histogramy dokumentujące analizę psich PBMC poddanych testom na cytotoksyczność zależną od	

dopełniacza z użyciem przeciwciał B5, E11 oraz kontrolnego IgG za pomocą barwienia jodkiem propidyny.	64
Rysunek 20 Analiza cytofluorymetryczna fagocytozy zależnej od przeciwciał B5 oraz E11 z użyciem mysiej linii RAW264 na liniach CLBL1 i CLB70. Wykresy typu „dotplot” przedstawiają wybarwione za pomocą barwnika wewnątrzkomórkowego CFSE linie CLBL1/CLB70 oraz zabarwione przeciwciałem antyCD45 mysie makrofagi RAW264. Ramką zaznaczono komórki podwójnie pozytywne czyli psie komórki wchłonięte przez makrofagi. Wykres obok przedstawia średni odsetek komórek ulegających zależnej od przeciwciał fagocytozie w trzech niezależnych eksperymentach. [źródło [62]].	65
Rysunek 21 Względny poziom ekspresji MHC-II w lizatach z linii komórkowych wyrażających DLA-DR (CLBL1, CLB70, CL-1, cPBMc), HLA-DR (Raji) i niewyrażających DLA-DR (CH89, GL-1) ustalony za pomocą poziomu absorbancji uzyskanej w teście ELISA z użyciem przeciwciał B5 i E11.	66
Rysunek 22 Względny poziom DLA-DR w lizatach z bioptatów psich chłoniaków B, T oraz B/T komórkowych lub kontrolnych (bez nowotworu, C), oznaczony za pomocą testu ELISA wykorzystującego przeciwciała B5 i E11.	67
Rysunek 23 Względny poziom sDLA-DR w surowicy psów chorych na chłoniaki, leczonych oraz zdrowych określony za pomocą poziomu absorbancji uzyskanej w teście ELISA z użyciem przeciwciał B5 i E11 [źródło [63]].	68
Rysunek 24 Analiza cytofluorymetryczna reaktywności supernatantu pochodzącego z transfekowanych komórek CHO wobec dwóch psich linii B-komórkowych oraz kontrolnej linii NK za pomocą cytometrii przepływowej.	69
Rysunek 25 Średnie natężenie fluorescencji (MFI) uzyskane techniką cytometrii przepływowej po barwieniu komórek linii CLBL1 różnymi stężeniami przeciwciała B5 oraz koniugatem B5-MTX [źródło [63]].	70
Rysunek 26 Spadek odsetka żywych komórek linii CLBL1, CLB70 oraz kontrolnej linii GL-1 po 48 godzinnej inkubacji z przeciwciałem B5, koniugatem B5-MTX oraz kontrolnym mysim przeciwciałem (IgG) w porównaniu do kontroli traktowanej buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS). Wykres przedstawia średnią z trzech powtórzeń eksperymentu.	71
Rysunek 27 Analiza poziomu aktywności kaspazy 3/7 w psich liniach CLBL1, CLB70 i kontrolnej GL-1 traktowanych przeciwciałem B5 i koniugatem B5-MTX bez lub w obecności inhibitora ZVAD Wykres przedstawia średnią z trzech powtórzeń eksperymentu. [źródło [63]].	71
Rysunek 28 Obraz luminescencji komórek CLBL1-LUC po dożylnym podaniu myszom D-lucyferyny w 15 dniu po wszczepieniu komórek. Obrazy zostały uzyskane za pomocą kamery CareStream [źródło [63]].	73
Rysunek 29 Średni poziom luminescencji w 15 dniu eksperymentu obliczony dla każdej z grup myszy. Analiza statystyczna obejmowała jednoczynnikową analizę wariancji oraz poprawkę Bonferroniego. Trzy gwiazdki (***) wskazuje istotność statystyczną na poziomie $p < 0,001$ względem grupy traktowanej kontrolnym przeciwciałem IgG.	74

Rysunek 30 Średnia masa każdej z grup myszy w danym dniu eksperymentu licząc od dnia przeszczepienia komórek CLBL1-LUC [źródło [63]].....	75
Rysunek 31 Odsetek komórek CLBL1-LUC w szpiku kostnym w badanych grupach myszy określona na podstawie analizy cytometrycznej za pomocą przeciwciała E11. Analiza statystyczna obejmowała jednoczynnikową analizę wariancji oraz poprawkę Bonferroniego. Gwiazdka (*) wskazuje istotność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, dwie gwiazdki (**) $p < 0,01$, względem grupy traktowanej kontrolnym przeciwciałem IgG. [źródło [63]].	75
Rysunek 32 Analiza Western blotting mysich organów na obecności komórek CLBL1-LUC za pomocą przeciwciała E11 (kontrolnie analiza przeciwciałem anty- β -aktyna (β -ACT) [źródło [63]].	76
Rysunek 33 Względny poziom sDLA-DR w surowicach badanych myszy określony za pomocą absorbancji w teście ELISA opartym o przeciwciała B5 i E11. Wynik przedstawia średnią z trzech powtórzeń eksperymentu. Analiza statystyczna obejmowała jednoczynnikową analizę wariancji oraz poprawkę Bonferroniego. Gwiazdka (*) wskazuje istotność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, dwie gwiazdki (**) $p < 0,01$, względem grupy traktowanej kontrolnym przeciwciałem IgG [źródło [63]].	77