

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

290 424

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1996 - 618
(22) Přihlášeno: 02.09.1994
(30) Právo přednosti:
03.09.1993 JP 1993/242109
(40) Zveřejněno: 12.06.1996
(Věstník č. 6/1996)
(47) Uděleno: 27.05.2002
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.07.2002
(Věstník č. 7/2002)
(86) PCT číslo: PCT/JP94/01452
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 95/06747

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

C 12 P 21/08

C 12 N 5/20

C 07 K 16/28

//(C 12 P 21/08, C 12 R 1:91)

(73) Majitel patentu:

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA,
Tokyo, JP;

(72) Původce vynálezu:

Fukushima Naoshi, Gotemba-shi, JP;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Monoklonální protilátka a hybridom ji
produkující**

(57) Anotace:

Monoklonální protilátka, která se specificky váže na povrchový antigen slezinných stromálních buněk a inhibuje vestavění krvetvorných kmenových buněk, přičemž slezinné stromální buňky napomáhají vestavění krvetvorných kmenových buněk a jsou získané ze zvířat ošetřených rG-CSF. Hybridom produkující tuto monoklonální protilátku podle nároku 1.

CZ 290424 B6

Monoklonální protilátka a hybridom ji produkující

Oblast techniky

5

Vynález se týká nové monoklonální protilátky inhibující vestavění krvetvorných kmenových buněk a rozpoznávající povrchový antigen slezinných stromálních buněk, mající schopnost podporovat vestavění krvetvorných kmenových buněk a hybridomu, který produkuje tuto monoklonální protilátku.

10

Jelikož monoklonální protilátky podle vynálezu rozpoznávají látky důležité pro vestavění buněk kostní dřeně do krvetvorné tkáně jakožto antigenu a mají charakteristiky inhibice vestavění krvetvorných kmenových buněk, jsou užitečné jako léčivo s funkcí podporovat působení protirakovinových činidel, například zlepšováním účinnosti protirakovinových činidel pro leukemii uvolňováním akutních myeloidních leukemických buněk z kostní dřeně podle shora uvedených charakteristik.

15

Dosavadní stav techniky

20

Faktory, stimulující granulocytovou kolonii, například stimulační faktory rekombinantní granulocytové kolonie (rG-CSF = recombinant granulocyte colony-stimulating factor) jsou především známé jakožto humorální faktory ke stimulaci diferenciaci a proliferaci granulocytových buněk a bylo popsáno při zkouškách na myších in vivo, že podávání rG-CSF podporuje krvetvorbu kostní dřeně a kromě toho způsobuje výraznou extramedulární krvetvorbu ve slezině k proliferaci krvetvorných kmenových buněk a všech krvetvorných prekursorových buněk ve slezině. Existovala domněnka, že extramedulární krvetvorný mechanismus ve slezině, kde krvetvorba probíhá, v důsledku modifikace slezinného krvetvorného mikroprostředí, nastává vlivem stimulace rG-CSF podpora krvetvorného potenciálu.

25

30

Proto se zaměřilo úsilí na slezinné stromální buňky po podání rG-CSF k objasnění krvetvorného potenciálu ve slezině a na ustavení krvetvorné slezinné stromální buněčné linie (CF-1 buněk) z myši sleziny po podání rG-CSF se zřetelem na dosažení analýzy podpory krvetvorného potenciálu stromálními buňkami s rG-CSF a zkoušení potenciálního vlivu na krvetvorbu za použití krvetvorných stromálních buněk a jako výsledek byla seznána stimulační aktivita kolonie in vitro a podpůrná potence krvetvorných kmenových buněk in vivo (Blood, 80, str. 1914, 1992).

35

Jelikož podpůrná potence krvetvorných kmenových buněk in vivo se projeví po transplantaci CF-1 buňky spolu s buňkami kostní dřeně při transplantaci kostní dřeně, byla domněnka, že shora uvedené krvetvorné stromální buněčná linie (CF-1 buňky) expresují funkci jako faktor buněčné adheze umožňující vestavění krvetvorných kmenových buněk do krvetvorné tkáně.

40

Avšak jakkoliv některé slezinné stromální buňky, mající podpůrnou potenci k vestavění krvetvorných kmenových buněk, se považují za buněčnou linii (CF-1 buňky) a byly přezkoušeny jejich cytologické charakteristiky, nebyla připravena žádná specifická protilátka rozpoznávající jejich povrchové antigeny a jsou dosud známy jen její sporé charakteristiky.

45

Vynález se proto zaměřuje na vývoj specifické protilátky schopné rozpoznat slezinné stromální buňky mající podpůrnou potenci vestavění krvetvorných kmenových buněk na základě shora uvedené informace o slezinných stromálních buňkách. Vynález se také zaměřuje na ustavení slezinné stromální buňky mající podpůrnou potenci pro vestavění krvetvorných kmenových buněk a zároveň na přípravu monoklonální protilátky používající linie slezinové stromální buňky jakožto antigenu pro imunizaci. Vynález se zaměřuje také na získání nové monoklonální protilátky.

50

S překvapením se zjistilo, že získaná monoklonální protilátka rozpoznává povrchový antigen slezinné stromální buňky mající podpůrnou potenci vestavění krvevorných kmenových buněk a inhibuje vestavění krvevorných kmenových buněk, což bylo cílem vynálezu.

5

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je monoklonální protilátka, která se specificky váže na povrchový antigen slezinných stromálních buněk a inhibuje vestavění krvevorných kmenových buněk, přičemž slezinné stromální buňky napomáhají vestavění krvevorných kmenových buněk, získaná ze zvířat ošetřených rG-CSF. Podstatou vynálezu je také hybridom produkující takovou monoklonální protilátku.

Monoklonální protilátkou podle vynálezu je nová monoklonální protilátka k povrchovému antigenu slezinných stromálních buněk, mající podpůrnou potenci vestavění krvevorných kmenových buněk a která je protilátkou rozpoznávající slezinné stromální buňky podporující krvevorný potenciál sleziny a je mimořádně užitečná jakožto látka inhibující vestavění krvevorných kmenových buněk. Vestavěním krvevorných kmenových buněk se zde míní, že přilínání krvevorných kmenových buněk je způsobováno stromálními buňkami krvevorné tkáně a buňky diferencují a prolifерují jakožto CFU-S kolonie.

Monoklonální protilátka podle vynálezu se v zásadě může připravit jak níže uvedeno.

Zvláště se monoklonální protilátka podle vynálezu může připravit například použitím slezinných stromálních buněk živočichů, kterým byl podán rG-CSF, například buňky CF-1 (slezinné stromální buňky) podle vynálezu jakožto buněčná linie, jakožto antigen, její imunizací o sobě známými imunizačními způsoby, fúzí imunizovaných buněk o sobě známým způsobem a klonováním fúzovaných buněk o sobě známým způsobem klonování.

30

Jakožto způsob přípravy monoklonální protilátky podle vynálezu se příkladně uvádí způsob, při kterém se používá shora uvedených CF-1 buněk, jakožto kulturní buněčná linie podle vynálezu jakožto antigen (Blood, 80, str. 1914, 1992), fúzí se plasmové buňky (imunocyty) savců imunizovaných antigenem s myelomovými buňkami savců například myši, klonují se získané fúzované buňky (hybridomy), vybírají se klony produkující protilátku podle vynálezu rozpoznávající shora uvedenou buněčnou linii a kultivují se k získání protilátek podle vynálezu. Toto je však toliko příkladný způsob a v tomto případě například nejen shora uvedené CF-1 buňky ale také jiné stromální buňky krvevorné tkáně získané jako CF-1 buňky avšak také jiné stromální buňky krvevorné tkáně z lidských slezinných stromálních buněk se může vhodně užít pro přípravu protilátek podle vynálezu stejným způsobem jako v případě CF-1 buněk.

40

Při způsobu přípravy takových monoklonálních protilátek se může pro imunizaci použít jakýchkoliv savců. Jedině je výhodné posuzovat vhodnost myelomových buněk, používaných pro buněčnou fúzi, přičemž se s výhodou používá myši, krys a křečků.

45

Imunizace se provádí o sobě známým způsobem, například zaváděním slezinných stromálních buněk stejně jako shora uvedených CF-1 buněk do břišní dutiny savců vstříkáváním. Zvláště je výhodné podávání ve zředěné formě v PBS nebo jako suspenze ve vhodném množství PBS nebo v izotonickém roztoku chloridu sodného živočichům několikrát každý měsíc. Je výhodné používat slezinných buněk odejmutých po posledním podání shora uvedených buněk jako imunocytů.

50

Jako myelomové savčí buňky stejně jako jiných mateřských buněk fúzovaných se shora uvedenými imunocyty se může s výhodou používat různých buněk ze souboru zahrnujícího

P3(P3X63Ag8.653 (J. Immunol., 123, str. 1548, 1978), p3-U1 (Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, str. 1 až 7, 1978), NS-1 (Eur. J. Immunol., 6, str. 511 až 519, 1976), MPC-11 (Cell, 8, str. 405 až 415, 1976), Sp2/O-Ag14 (Nature, 276, str. 269 až 270, 1978), FO (J. Immunol. Met., 35, str. 1 až 21, 1980), S194 (J. Exp. Med., 148, str. 313 až 323, 1978) a R21O (Nature, 277, str. 131 až 133, 1979).

Fúze buněk shora uvedeného imunocyty a myelomových buněk se může provádět v zásadě o sobě známým způsobem například způsobem, který popsali Milstein a kol. (Methods Enzymol., 73, str. 3 až 46, 1981).

Zvláště se taková fúze může provádět například v obvyklém živném prostředí v přítomnosti činidla urychlujícího fúzi. Jakožto činidla urychlujícího fúzi se může používat polyethylenglykolu (PEG) a virus Sendai (HVJ) a dále pomocná činidla, jako dimethylsulfoxid, se mohou vhodně přidávat k podpoře fúze. S výhodou se používá 1 až 10 krát více imunocytů než myelomových buněk. Jakožto příklady živného prostředí pro takovou fúzi buněk se uvádí prostředí RPMI-1640 a MEM vhodná pro proliferaci shora uvedených myelomových buněk a další prostředí běžně používaná pro kultivaci tohoto druhu buněk a kromě toho se současně může použít doplňkové sérum například hovězí zárodečné sérum (FBS).

Fúze buněk se provádí smísením předepsaného množství shora uvedených imunocytů a myelomových buněk ve shora uvedeném prostředí, přidáním roztoku PEG, předehřátého na teplotu 37 C, například PEG o střední molekulové hmotnosti řádu 1000 až 6000, do prostředí, zpravidla v koncentraci přibližně 30 až 60 % (hmotnost/objem), a promícháním. Následně opakovaním operace přidání vhodných prostředí, jednoho po druhém, odstředěním reakční směsi a odstraněním supernatantů se mohou vytvořit předmětné hybridomy.

Tyto hybridomy se selektují kultivací v běžném selektivním prostředí, například v prostředí HAT (prostředí doplněné hypoxanthinem, aminopterinem a thymidinem). Kultivace v prostředí HAT pokračuje po dostatečnou dobu pro buňky jiné než předmětného hybridomu (nefúzované buňky) k jejich zániku, zpravidla po dobu několika dní nebo týdnů. Následně se provede skrining a monoklonování hybridomů, produkujících předmětné protilátky, běžným způsobem ředění.

Vytvořený hybridom, produkující monoklonální protilátky podle vynálezu, se může subkultivovat v běžném prostředí a ukládat v kapalném dusíku po dlouhou dobu.

Za účelem shromáždění monoklonálních protilátek podle vynálezu z hybridomů se může použít způsobu zahrnujícího kultivaci hybridomů o sobě známým způsobem a jejich získání ze supernatantu, nebo způsobu podávání hybridomu vhodnému savci za účelem proliferace a jejich získání z ascitu. První způsob je vhodný pro získání protilátek o vysoké čistotě, druhý způsob je vhodný pro hromadnou produkci protilátek.

Protilátky, získané uvedeným způsobem, se mohou čistit na vysoký stupeň za použití o sobě známých způsobů čištění, například způsobu vysolování, gelové filtrace a afinitní chromatografie

Jelikož protilátky podle vynálezu mají schopnost inhibice vestavění krvetvorných kmenových buněk, může se jich použít jako léčiva při klinickém ošetřování leukemie. Například využitím této funkce se mohou uvolňovat akutní myeloidní leukemické buňky z kostní dřene ke zlepšení účinku protirakovinových činidel k ošetřování leukemie.

Monoklonálních protilátek podle vynálezu se kromě léčení leukemie může používat jakožto léčiva pro zlepšení účinku protirakovinových činidel pro leukemii.

Vynález blíže objasňují bez záměru na jakémkoliv omezení srovnávací příklad a příklad a připojené obrázky.

Přehled obrázků na výkresech

- Na obr. 1 je analýza (kontrola v nepřítomnosti protilátky, buněk CF-1) imunofluorescencí.
- 5 Na obr. 2 je analýza charakteristik vázání GSPST-1 protilátky na buňky CF-1 podle imunofluorescence.
- 10 Na obr. 3 je analýza charakteristik vázání HMS-1 protilátky na buňky CF-1 podle imunofluorescence.
- Na obr. 4 je analýza (kontrola prostá protilátky, buňky kostní dřeně) imunofluorescencí.
- 15 Na obr. 5 je analýza charakteristik vázání GSPST-1 protilátky na buňky kostní dřeně podle imunofluorescence.
- Na obr. 6 je analýza charakteristik vázání HMS-1 protilátky na buňky kostní dřeně podle imunofluorescence.
- 20 Na obr. 7 je zkouška na monoklonální protilátky (GSPST-1) podle vynálezu k inhibici transplantace kostní dřeně. Na ose x je monoklonální protilátka, na ose y počet slezinných kolonií (12 dní).
- 25 Na obr. 8 je zkouška na monoklonální protilátky (HMS-1) podle vynálezu k inhibici transplantace kostní dřeně. Na ose x je monoklonální protilátka, na ose y počet slezinných kolonií (8 dní).

Příklady provedení vynálezu

- 30 Příklad srovnávací

Slezinné stromální buňky a jejich charakteristiky

- 35 1) Slezinné stromální buňky

Slezinná stromální buněčná linie mající podpůrnou potenci krvetvorných kmenových buněk se získá z primární kultury slezinných buněk myši C57BL/6 J, kterým se podával rG-CSF v dávce 100 µg/kg po dobu pěti dní.

- 40 Slezina se odstraní po podání rG-CSF za podmínek prostých choroboplodných zárodků, kultivuje se v plastové baňce (Corning Co.) 25 cm² po dobu šesti týdnů a v Isocovově prostředí modifikovaném Dulbeccovým prostředím (IMDM) (Boehringer-Mannheim Co.) s 10 % teplem inaktivovaného hovězího zárodečného séra (FBS) (Sanko Junyaku. Tokyo), 100 J/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu v inkubátoru za teploty 37 °C a v přítomnosti 5 % oxidu uhličitého a prostředí se vyměňuje za čerstvé růstové prostředí dvakrát týdně.

- 50 Příslušné populace buněk (stromální buňky) se sklídí z baňky za použití 0,05 % trypsinu a 0,02 % EDTA (Sigma Chemical Co.) v PBS prostém vápníku a hořčíku a převedou se do nových baněk. Tyto pasáže se opakují přibližně jednou nebo dvakrát týdně. V každé pasáži (v první až desáté pasáži) je poměr štěpení buněk 1/4 až 1/8 a následně je tento poměr 1/16 až 1/32. Stromální buňky se stanou homogenními a fibroblastoidními po přibližně deseti pasážích.

Při dvacáté pasáži se stromální buňky sklídí shora popsaným způsobem a převedou se do klonování buněk použitím limitujícího způsobu ředění. Klonování buněk se opakuje dvakrát k získání stromální buněčné linie (linie buněk CF-1).

- 5 Následně se tyto buňky udržují v 5 ml IMDM doplněném 10 % tepelně inaktivovaného hovězího zárodečného séra (FBS) v baňce (Corning Co.) 25 cm² a subkultivují se každých 5 dní za poměru štěpení 1/32. Linie slezinných stromálních buněk se může připravit z jiných zvířat než z myší. Například se může připravit linie slezinných lidských stromálních buněk stejným způsobem, jako je shora popsáno, transformováním buněk SV-40 adenovirovým vektorem (J. Cell. Physiol., 148, 10 str. 245, 1991).

2) Charakteristiky CF-1 buněk

- 15 Buňky CF-1, získané jako buněčná linie shora popsaným způsobem, se zkoušejí na alkalickou fosfatázu, kyselou fosfatázu, β -glukuronidázu, α -naftylacetátesterázu a olejovou červeň 0 o sobě známými cytochemickými způsoby. Buňky CF-1 se také charakterizují imunoenzymatickou histochemií za použití následujících monoklonálních a polyklonálních protilátek, mac I (Sero Tec.); antigen příbuzný faktoru VIII (Dakopatts), a kolagen typu I, kolagen typu III a fibronectin (Chemicon International Inc.). Fagocytosa se zkouší latexovými absorpčními kuličkami (průměr 20 částic 1,09 μ m Sigma) a potence CF-1 buněk převádět na adipocyty se zkouší vystavením 10⁻⁶ mol/l hydrokortisonfosfátu (Sigma) v 25 cm² baňce po 4 týdny po kultivaci.

- 25 Buňky CF-1 jsou negativní na alkalickou fosfatázu, na antigen odvozený od faktoru VIII, na mac I a na fagocytosu a jsou pozitivní na kolagen typ I, kolagen typ III a fibronectin. Buňky CF-1 se neprevádějí na adipocyty v průběhu čtyř týdnů v kultuře s 10⁻⁶ mol/l hydrokortisonu, jakkoliv buňky CF-1 vykazují pouze stopy lipidů. Proto buňky CF-1 nemají charakteristiky preadipocytů, makrofágů a endoteliálních buněk, a proto je zřejmé, že jsou odvozeny od stromálních buněk od nich odlišných.

30 3) Udržování krvetvorných kmenových buněk buňkami CF-1

- K vyzkoušení, zdali jsou nebo nejsou udržovány krvetvorné kmenové buňky buňkami CF-1, se provádí zkouška CFU-S (Spleen colonies-forming cells = zkouška slezinných buněk vytvářejících kolonie) způsobem, který popsal Till a McCulloch. Deset myší na skupinu se ozáří 35 900 cGy (MBR-1520R, Hitachi. Tokyo) a intravenózně se jim vstříkují mononukleární buňky kostní dřeně (BM buňky) (1,0 x 10⁵/hlava, 5,0 x 10⁴/hlava nebo 2, 5 x 10⁴/hlava) a CF-1 buňky (1 x 10⁵/hlava) a počítají se kolonie ve slezině 12. den, jakožto CFU-S kolonie (slezinné kolonie).

- 40 Jestliže mononukleární buňky kostní dřeně (BM buňky) a CF-1 buňky se transplantují ozářeným myším, počet slezinných kolonií každé skupiny BM buněk výrazně vzroste (1,4 až 1,8 krát) ve srovnání s myši bez transplantovaných CF-1 buněk a dvanáctý den po transplantaci je počet přeživších myší s transplantovanými buňkami BM a CF-1 vyšší než myši pouze s buňkami BM, 45 což dokládá nižší úmrtnost. Proto je zřejmé, že krvetvorné kmenové buňky jsou udržovány buňkami CF-1.

Příklad popisující nejlepší provedení vynálezu

Monoklonální protilátky

50

1) Protilátky a imunizace

Imunizace se provádí za použití buněk CF-1 získaných podle srovnávacího příkladu jakožto protilátky. Buňky se subkultivují v inkubátoru v přítomnosti 5 % oxidu uhličitého za teploty 37 °C za použití Isocovova prostředí modifikovaného Dulbeccovým prostředím (IMDM) (Boehringer-Mannheim Co.) doplněného 10 % hovězího zárodečného séra (FBS) (Sanko Junyaku, Tokyo).

Buňky se zpracovávají 1mM EDTA/PBS a pipetováním se vyjmou z kultivační baňky. Buňky se suspendují do 1mM EDTA/PBS za počtu buněk přibližně 1×10^7 /ml a podají se kryse Wistar Imamich (7 týdnů staré samičce, Animal Breeding Research Laboratory). Jeden ml kapaliny s přibližným množstvím buněk 1×10^7 /ml se vstříkne do břišní dutiny krysy při počáteční imunizaci a 1 ml kapaliny s přibližným množstvím buněk 1×10^7 /ml se podá přídatně za jeden měsíc. Dále se podává přídatně 1 ml kapaliny s množstvím buněk 1×10^7 /ml několikrát v intervalu měsíce a pozoruje se reaktivita mezi protilátkou imunizovaných krys a CF-1 buňkami, 1 ml kapaliny s množstvím buněk 1×10^8 /ml se podává jako konečná imunizace. Tři dny po konečné imunizaci se krysy usmrtí k odebrání sleziny.

2) Fúze buněk

Po odejmutí krysám se slezina rozkrájí, izolované slezinné buňky se odstředí, suspendují se v prostředí IMDM (BoehringerMannheim Co.) a intenzivně se promyjí. Buňky, získané kultivací myší linie myelomových buněk Sp2/O-Agl4 (Nature, 276, str. 249 až 270, 1978) v prostředí IMDM (Boehringer-Mannheim Co.) doplněném 10 % hovězího zárodečného séra (FBS, Sanko Junyaku), se promyjí shora uvedeným prostředím IMDM stejným způsobem a 1×10^8 a 2×10^8 shora uvedených slezinných buněk se vnese do odstředivkové zkumavky a mísí se k dosažení fúze buněk s polyethylenglykolem 4000 (Nakarai Kagaku) o sobě známým způsobem (Exp. Immunol., 42, str. 458 až 462, 1980).

Následně se fúzované buňky vnesou na 96 důlkovou destičku s prostředím IMDM doplněným 20 % hovězího zárodečného séra a kultivují se v inkubátoru v přítomnosti 5 % oxidu uhličitého a při teplotě 37 °C. Přemístí se do HAT selektivního prostředí postupně od následujícího dne a pokračuje se v kultivaci.

Po začátku kultivace se supernatanty přemísťují do nového HAT prostředí dvakrát týdně k pokračování kultivace a k udržování proliferace.

Potom se získané buňky klonují o sobě známým způsobem za použití limitujícího zřed'ovacího způsobu. O sobě známým způsobem se klonují pouze klony vykazující silné charakteristiky vázání na antigeny za použití limitující zřed'ovací analýzy za zkoušení jejich charakteristik vázání na antigeny za použití protilátek v supernatantech shora uvedených fúzovaných buněk.

3) Skríníng

Skríníng fúzovaných buněk (hybridomů) se provádí nepřímým fluorescentním protilátkovým způsobem za použití průtokové cytometrie.

Skríníng klonů, produkujících protilátky podle vynálezu, se provádí za použití CF-1 buněk jakožto cílových buněk. Buňky se suspendují v reakčním pufru (PBS doplněném 2 % FBS a 0,02 % nitridu sodného), odstředí se a získané pelety se suspendují ve 100 μ l supernatantů kultury hybridomu (přibližně 1×10^6 /100 μ l) a nechávají se reagovat po dobu jedné hodiny. Po jednom promytí shora uvedeným pufrem FITX se přidá značená kozí proti krysí IgG (FC) protilátka (Chemicon) a inkubuje se po dobu jedné hodiny. Opět se promyje a analyzuje se průtokovou cytometrií (FACScan, Becton Dickinson).

4) Čištění protilátek

Fúzované buňky, skrínované způsobem podle odstavce 3), se kultivují o sobě známým způsobem a produkované protilátky v supernatantech se oddělí o sobě známým způsobem a čistí se.

Hybridomy se získají z důlků o vysokém titru protilátky k antigenům, rozprostřou se na tkáňových plastových miskách (Corning. Co.), kultivují se v přítomnosti 5 % oxidu uhličitého při teplotě 37° C, proliferyjí a čistí se o sobě známým způsobem k získání monoklonálních protilátek GSPST-1 a HMS-1.

V tomto případě se zřetelem na HMS-1 protilátku a GSPST-1 protilátku se získané buňky vstříkují do břišní dutiny BALB/ aAJc1-nu holé myši ("nude mouse") (ve věku osmi týdnů, sameček. Nippon Kurea) a po 10 až 14 dnech se od nich získá ascit, vysolí se 33 % síranu amonného a dialyzuje se s PBS.

V tomto příkladu se popisuje způsob, podle kterého se používá CF-1 buněk jakožto antigenů pro imunizaci. Je však možné získat monoklonální protilátku stejným způsobem také použitím jiných slezinných stromálních buněk včetně stromálních buněčných linií krvetvorné tkáně odvozené od lidských slezinných stromálních buněk a vynález se tedy neomezuje na shora uvedené monoklonální protilátky, nýbrž zahrnuje všechny monoklonální protilátky mající stejné charakteristiky a připravené stejným způsobem a všechny hybridomy, produkující takové monoklonální protilátky.

Hybridom, produkující monoklonální protilátku HMS-1 podle vynálezu, je nová fúzovaná buňka, připravená za použití slezinných buněk krysy Wistar Imamich a linie myších myelomových buněk SP2/O-Ag14 jakožto mateřských buněk, a byl uložen 9. srpna 1993 pod označením HMS-1 (kryší myší hybridom) pod přírůstkovým číslem FERM BP-4383 v ústavu National Institute of Bioscience and Human Technology. Agency of Industrial Science and Technology. Japonsko (adresa: 1-3, Higashi 1-chome. Tsukuba-shi. Ibaraki 305, Japan) podle Mezinárodní budapeštské dohody týkající se uložení mikroorganismů pro účely vynálezu.

5) Vlastnosti protilátek

(i) Reaktivita protilátek (reaktivita na CF-1 buňky)

Výsledky zkoušek reaktivity získaných monoklonálních protilátek GSPST-1 a HMS-1 k buňkám CF-1 podle imunofluorescenční analýzy jsou na obr. 1 až 3. Na obr. 1 jsou výsledky analýzy kontroly v nepřítomnosti protilátky, na obr. 2 jsou výsledky analýzy schopnosti vázání GSPST-1 na buňky CF-1 a na obr. 3 jsou výsledky analýzy schopnosti vázání HMS-1 na buňky CF-1. Na svislé ose je vždy relativní počet buněk a na vodorovné ose je fluorescenční intenzita. Z obr. 1 až 3 je zřejmé, že monoklonální protilátky GSPST-1 a HMS-1 vykazují schopnosti vázání na buňky CF-1 a rozpoznávají povrchové antigeny buněk CF-1.

(Reaktivita na buňky kostní dřeně)

Výsledky zkoušek reaktivity získaných monoklonálních protilátek GSPST-1 a HMS-1 na normální buňky kostní dřeně podle průtokové cytometrie (FACScan. Becton Dickinson) jsou na obr. 4 až 6. Na obr. 4 jsou výsledky analýzy kontroly v nepřítomnosti protilátky, na obr. 5 jsou výsledky analýzy schopnosti vázání GSPST-1 na buňky kostní dřeně a na obr. 6 jsou výsledky analýzy schopnosti vázání HMS-1 na buňky kostní dřeně. Na svislé ose je vždy relativní počet buněk a na vodorovné ose je fluorescenční intenzita. Z obr. 4 až 6 je zřejmé, že monoklonální protilátka GSPST-1 nevykazuje vůbec schopnost vázání na buňky kostní dřeně, přičemž HMS-1 vykazuje schopnost vázání na některé buňky kostní dřeně.

(ii) Typizace protilátek

Na základě typizace podtřídy IgG získaných monoklonálních protilátek (za použití krysy Mono Ab-ID-Sp Zymed) je zřejmé, že GSPST-1 je IgG2a a HMS-1 je IgG2b.

5

(iii) Inhibiční potence transplantace kostní dřeně

Provádí se zkouška inhibice transplantace kostní dřeně za použití protilátek ke zjištění jejich charakteristik. Výsledky jsou na obr. 7 a 8. Z obr. 7 a 8. je zřejmé, že zatímco HMS-1 inhibuje transplantaci kostní dřeně, nebylo zjištěno působení GSPST-1. Tyto výsledky se získaly při podání ocasní žíly $1,0 \times 10^5$ /hlavu buněk kostní dřeně a monoklonálních protilátek C57BL/6J myši, ozářené osudnou dávkou záření (900 cGy) a pozorováním vytváření slezinných kolonií. Výrazem "neošetřené" se na obr. 8 míní případ, kdy nebyly podány buňky kostní dřeně. Jako výsledek zkoušky možno konstatovat, že monoklonální protilátka HMS-1 podle vynálezu vykazuje inhibici transplantace kostní dřeně a je zřejmé, že tato protilátka také vestavuje krvetvorné kmenové buňky a vytváří CFU-S kolonie.

15

Pracovníkům v oboru je zřejmé, že působení monoklonální protilátky k inhibici transplantace kostní dřeně odpovídá aktivitě inhibici vestavění krvetvorných kmenových buněk a vytváření CFU-S kolonií. Například v případě monoklonální protilátky (ACK-2 protilátka. C-soubor protilátky), za použití žírné buňky jako antigenu, se uvádí, že má funkci inhibice transplantace kostní dřeně u myši podobně jako monoklonální protilátky (Blood, 78, str. 1706, 1991), podle výsledků zkoušek inhibice transplantace kostní dřeně se uvádí, že protilátka inhibuje vestavění krvetvorných kmenových buněk a vytváření CFU-S kolonií.

20

Shora zmíněná protilátka ACK-2 se připravuje použitím žírné buňky jakožto antigenu a žírná buňka je diferenciovaná a proliferovaná krvetvorná buňka z krvetvorné kmenové buňky. Stromální buňka krvetvorné tkáně, použitá podle vynálezu, není krvetvornou buňkou nýbrž buňkou podporující diferenciaci a proliferaci krvetvorné buňky, a proto jsou obě tyto buňky výrazně odlišné.

25

Když se zavádí hybridom produkující HMS-1 do břišní dutiny holé myši, neumírá myš z nahromadění ascitu. Proto je domněnka, že účinek HMS-1 inhibice transplantace kostní dřeně není jev v důsledku apoptozy (označovaný jako spontánní destrukce buněk, jev, že nukleární chromatinová DNA se štěpí v nukleosomové jednotce [tak zvaná "ladder formation"], přičemž dochází k úmrtí buněk) nýbrž jev vázání monoklonální protilátky na molekulu pro vestavění krvetvorných buněk do krvetvorné tkáně. Proto je zřejmé, že antigen, rozpoznávaný HMS-1, je důležitou látkou pro vestavění krvetvorných kmenových buněk do krvetvorné tkáně.

30

Ze shora popsané zkoušky je zřejmé, že monoklonální protilátka HMS-1 podle vynálezu rozpoznává povrchový antigen slezinné stromální buňky mající podpůrnou potenci vestavění krvetvorných kmenových buněk a vykazuje charakteristiky inhibice vestavění krvetvorných kmenových buněk.

35

Proto HMS-1 má potenci inhibovat vestavění buněk kostní dřeně do krvetvorné tkáně. Uvádí se, že leukemické buňky se uvolňují z kostní dřeně podle poklesu exprese VLA4 a VLA5 adheze molekul krvetvorných buněk již popsaných (VLA molekulová exprese může být zahrnuta v uvolňování akutních myeloidních leukemických buněk z kostní dřeně (Leuk. Res., 16 (5), str. 469 až 474, 1992) a je domněnka, že monoklonální protilátka k VLA4 a VLA5 zlepšuje vliv léčiv pro leukemii uvolňováním leukemických buněk z kostní dřeně. Proto shora popsaná HMS-1 se může používat podobně před ošetřením leukemie k dosažení určitého výsledku.

40

45

Monoklonální protilátky podle vynálezu jsou popsány specificky na případě shora uvedeného příkladu. Monoklonální protilátky podle vynálezu zahrnují tuto příkladnou protilátku, přičemž

však vynález není na ni omezen, nýbrž zahrnuje všechny monoklonální protilátky, které mají stejné charakteristiky a stejnou funkci a jsou připraveny stejným způsobem.

5 Průmyslová využitelnost

Monoklonální protilátky rozpoznávající látku důležitou pro vestavění buněk kostní dřeně do krvetvorné tkáně jakožto antigen a s charakteristikami inhibice vestavění krvetvorných kmenových buněk vhodné pro výrobu léčiv s funkcí podpory působení protirakovinových léčiv, například protirakovinových léčiv leukemie uvolňováním akutních myeloidních leukemických buněk z kostní dřeně.

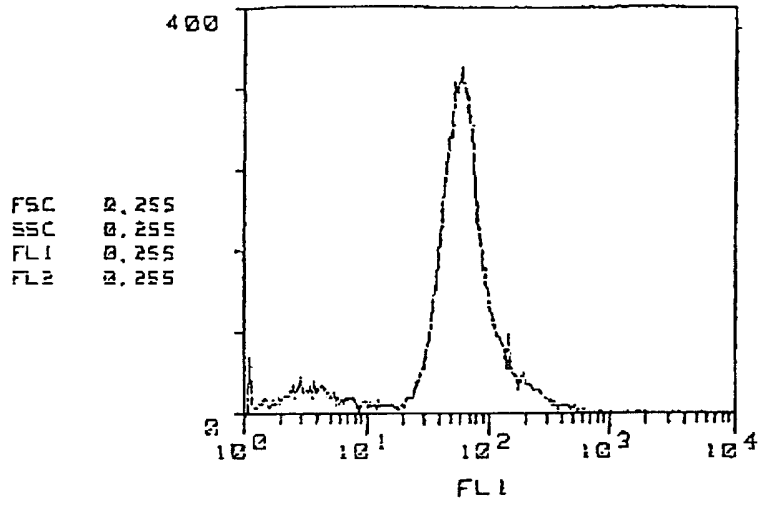
15

PATENTOVÉ NÁROKY

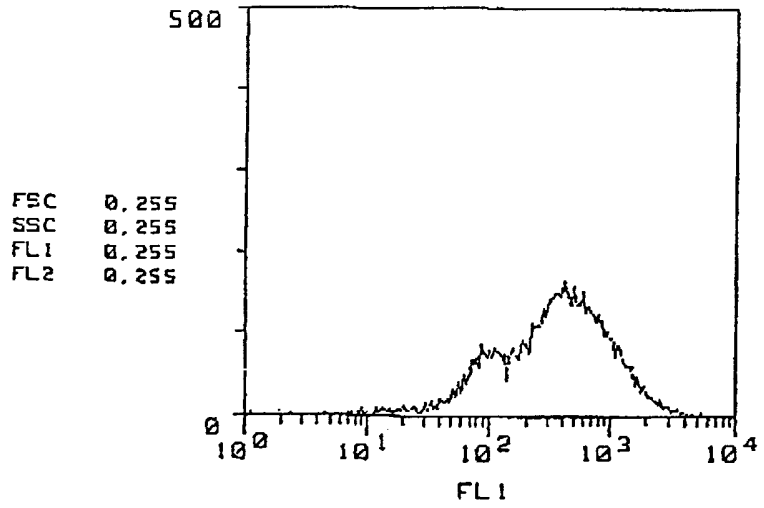
1. Monoklonální protilátka, která se specificky váže na povrchový antigen slezinných stromálních buněk a inhibuje vestavění krvetvorných kmenových buněk, přičemž slezinné stromální buňky napomáhají vestavění krvetvorných kmenových buněk a jsou získané ze zvířat ošetřených rG-CSF.
2. Hybridom produkující monoklonální protilátku podle nároku 1.
3. Hybridom podle nároku 2 uložený pod číslem FERM-4383 v organizaci National Institute of Bioscience and Human Technology.
4. Monoklonální protilátka podle nároku 1, kterou je protilátka HMS-1, produkovaná hybridomem uloženým pod číslem FERM-4383.

35

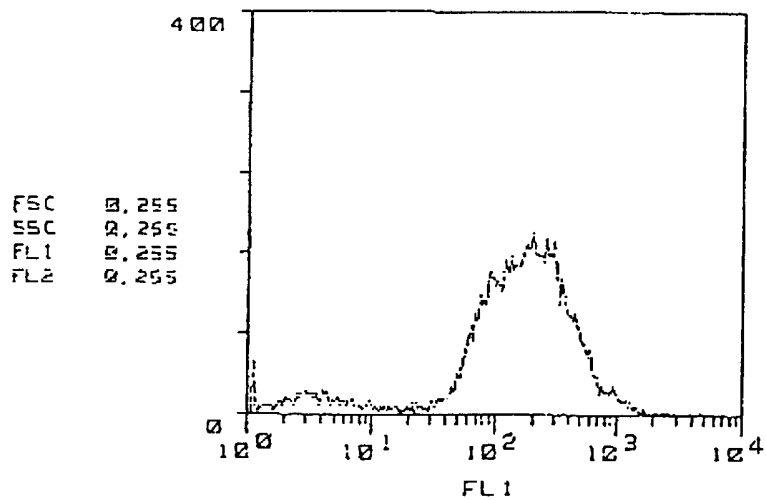
5 výkresů



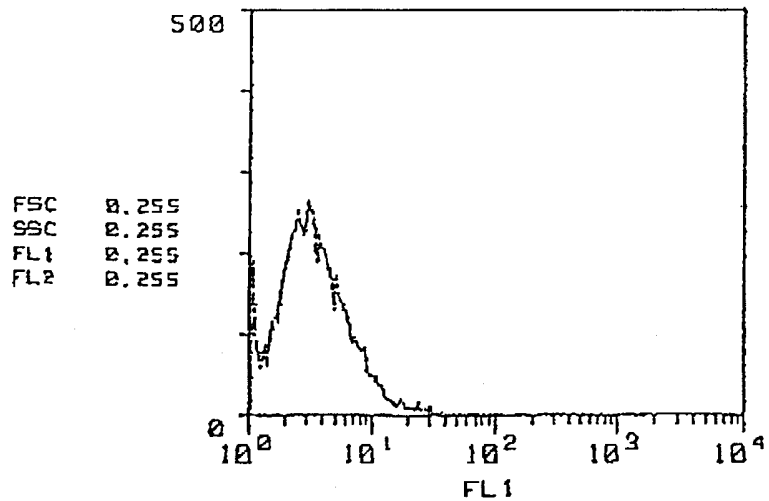
Obr. 1



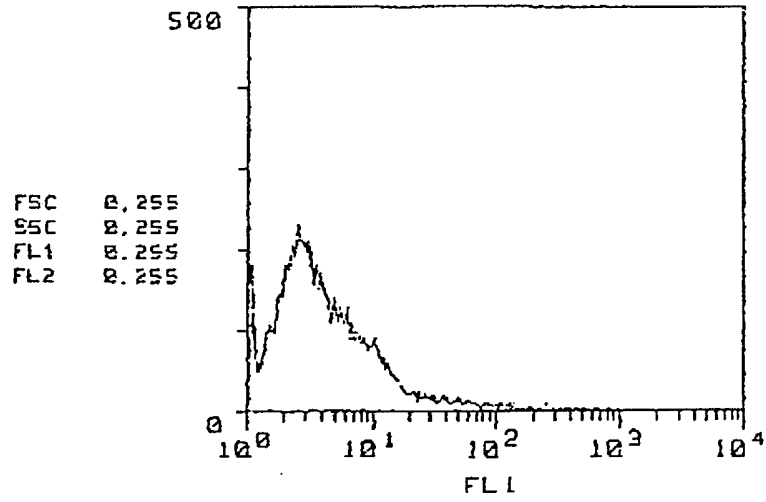
Obr. 2



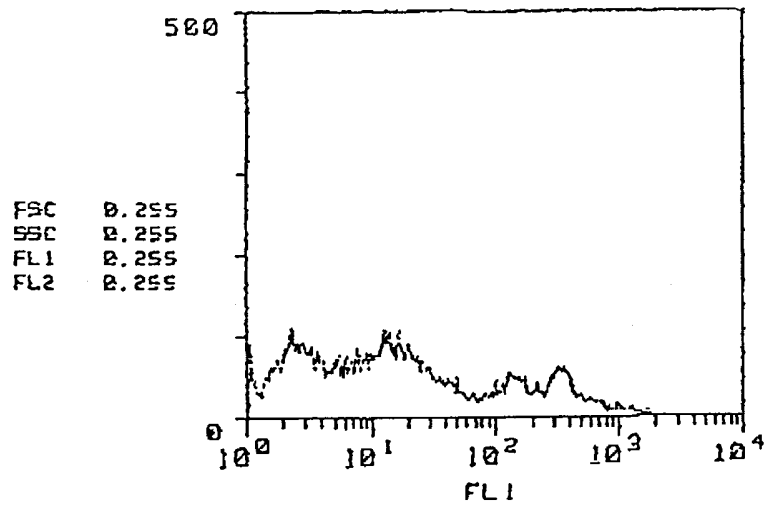
Obr. 3



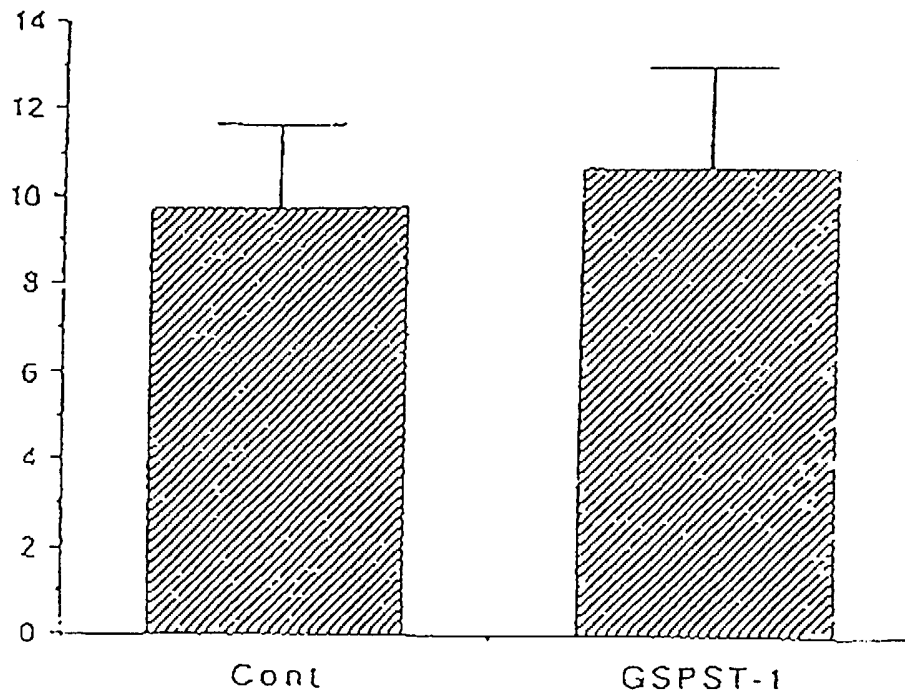
Obr. 4



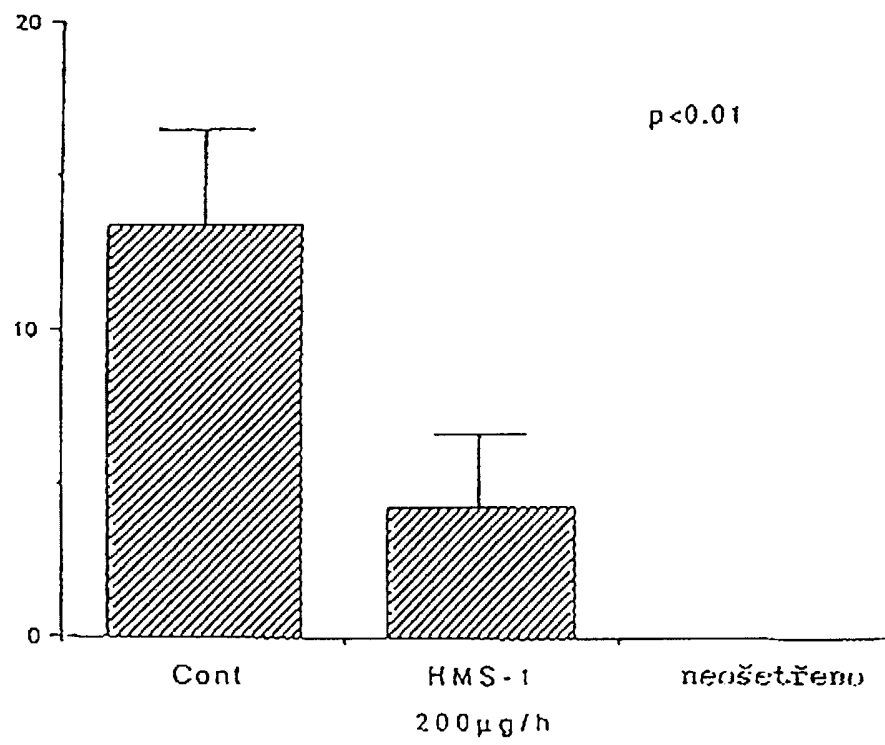
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr.8

Konec dokumentu
