RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **238159**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428800**

(22) Data zgłoszenia: **01.02.2019**

(51) Int.Cl.
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(54) **Psia linia komórkowa typu NK**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
10.08.2020 BUP 17/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
12.07.2021 WUP 15/21

(73) Uprawniony z patentu:
INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ IM. LUDWIKA HIRSZFELDA POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Wrocław, PL
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
ANDRZEJ RAPAK, Brzeg, PL
ALEKSANDRA PAWLAK, Wrocław, PL
EWA ZIOŁO, Wrocław, PL
EDYTA WYSOKIŃSKA, Lewin Brzeski, PL
LEON STRZĄDAŁA, Wrocław, PL
BOŻENA OBMIŃSKA-MRUKOWICZ, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Mirosława Ważyńska

PL 238159 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy nowej wyizolowanej psiej linii komórkowej NK CNK-89, wyprowadzonej z płynu wysiękowego psa rasy Cocker Spaniel chorego na białaczkę NKT. Przedmiotowa linia komórkowa CNK-89 jest przeznaczona do zastosowania jako model do badania przesiewowego związków i/lub substancji aktywujących i/lub stymulujących komórki NK pochodzenia zarówno psiego, jak i innych ssaków, zwłaszcza ludzi. Ponadto, linia komórkowa CNK-89 według wynalazku jest przeznaczona do zastosowania w badaniach oddziaływań komórek typu NK z innymi typami komórek, zwłaszcza z komórkami nowotworowymi.

Komórki NK (ang. Natural Killer – naturalni zabójcy) stanowią główną grupę komórek układu odpornościowego odpowiedzialną za zjawisko naturalnej cytotoksyczności. Podobnie jak inne komórki wrodzonego układu odpornościowego, komórki NK stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami (wirusami) i własnymi zmienionymi (nowotworowo) komórkami (K. S. Campbell and J. Hasegawa, „Natural killer cell biology: An update and future directions", J. Allergy Clin. Immunol., vol. 132, no. 3, pp. 536–544, 2013).

Działanie komórek wrodzonego układu immunologicznego jest natychmiastowe i przyczynia się do pobudzenia innych komórek układu immunologicznego, począwszy od komórek NK, konwencjonalnych limfocytów T CD4+ lub CD8+, komórek dendrytycznych do limfocytów B. Komórki NK wykazują zdolność do gwałtownej i szybkiej sekrecji cytokin – IFN i IL-4, a także IL-2, -5, -6, -10, -13, TNF, TGF-β i GM-CFS. Komórki NK dojrzewają w szpiku kostnym i pochodzą od wspólnej komórki progenitorowej z limfocytami T. Na ich powierzchni występują markery białkowe CD16, CD56, CD57, przy jednoczesnym braku CD3. Główną funkcją komórek NK jest niszczenie komórek zakażonych wirusami, a także komórek nowotworowych, uszkodzonych i pochodzących z obcych gatunków. Ponadto, działanie komórek NK odbywa się niezależnie od tzw. restrykcji MHC (czyli głównego układu zgodności tkankowej), co również jest ich unikalną cechą. Aktywność cytotoksyczna regulowana jest poprzez odpowiednią ekspresję powierzchniowych receptorów aktywujących i hamujących. Na komórkach NK występują 3 główne „nadrodziny" receptorów: receptory cytotoksyczności naturalnej (ang. natural cytotoxity receptors – NCRs) – aktywatory cytolizy, receptory immunoglobulinopodobne (ang. killer Ig-like receptors – KIR) – aktywatory i inhibitory cytolizy oraz receptory lektynowe typu C (ang. killer lectine like receptors – KLR) – występujące w postaci heterodimerów, aktywatory i inhibitory cytolizy. Ważne dla procesów cytotoksyczności są także molekuły z grupy SLAM (np. CD244) i LAMP (CD107a) Aktywująco na komórki NK działają niektóre interleukiny i interferony (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFNγ). Hamująco działają: prostaglandyny E2 oraz TGF-β. Cytotoksyczność komórek NK wynika głównie z wyrzucenia zawartości ziaren cytoplazmatycznych, zawierających substancje wywołujące śmierć komórki docelowej, granzym i perforynę. Inny mechanizm związany jest z wydzielaniem białek aktywujących receptory śmierci; TNF, TRAIL, Fas ligand. Trzeci mechanizm związany jest z obecnością receptora CD16 wiążącego przeciwciała (M. J. Smyth et al., „Activation of NK cell cytotoxicity", Mol. Immunol., vol. 42, no. 4, pp. 501–510, 2005). W związku z powyższym, znacząca liczba badań koncentruje się obecnie nad zastosowaniem zmodyfikowanych komórek NK w immunoterapii nowotworów i innych chorób. W badaniach nad funkcją komórek NK wykorzystuje się głównie populacje komórek izolowanych z krwi obwodowej. Takie postępowanie jest jednak uciążliwe i prowadzi do otrzymywania niepowtarzalnych wyników.

W celu uzyskania powtarzalnych wyników w badaniach wykorzystuje się ludzką linię NK-92 (np. Gong JH, et al. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia 8: 652–658, 1994; Klingemann HG, et al. A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. Biol. Blood Marrow Transplant. 2: 68–75, 1996) wyprowadzoną z krwi pacjenta z chłoniakiem nieziarniczym. Linia ta jest jednak trudna w hodowli i wymaga suplementowania interleukiną 2. Obecność IL-2 powoduje, że hodowane komórki NK są częściowo zaktywowane co utrudnia badanie wpływu innych związków.

Ze względu na histopatologiczne podobieństwo psich i ludzkich nowotworów układu krwiotwórczego (Valli V E, Jacobs R M, Parodi A L, Vernau W, Moore P F. Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals, Second Series ed. Washington, D.C.: AFIP-American Registry of Pathology. 2002) zasadnym jest podejmowanie badań mających na celu uzyskanie stabilnej linii komórkowej komórek NK pochodzenia psiego, która mogłaby stanowić model do badań komórek NK. Ponadto, istnieje stosunkowo niewiele doniesień dokumentujących pomyślne wyprowadzenie stabilnej linii komórkowej wy-

wodzącej się z układu odpornościowego psa z nowotworem układu krwiotwórczego (patrz np. Steplewski Z, Jeglum K A, Rosales C, Weintraub N. Canine lymphoma-associated antigens defined by murine monoclonal antibodies. Cancer Immunol Immunother 1987; 24:197–201, Nakaichi M, Taura Y, Kanki M, Mamba K, Momoi Y, Tsujimoto H, et al. Establishment and characterization of a new canine B-cell leukemia cell line. J Vet Med Sci 1996; 58:469–71, Momoi Y, Okai Y, Watari T, Goitsuka R, Tsujimoto H, Hasegawa A. Establishment and characterization of a canine T- lymphoblastoid cell line derived from malignant lymphoma. Vet Immunol Immunopathol 1997; 59:1120, Ghernati I, Auger C, Chabanne L, Corbin A, Bonnefont C, Magnol J P, et al. Characterization of a canine long-term T cell line (DLC 01) established from a dog with Sezary syndrome and producing retroviral particles. Leukemia 1999; 13:1281–90). W przypadku psów, dodatkowym problemem jest niska zawartość komórek NK w populacji limfocytów. W literaturze patentowej opisano tylko jedną psią linię komórkową, patrz US 7,897,150 B1 gdzie ujawniono wyizolowaną psią linię komórkową chłoniaka z obwodowych komórek T oraz jej zastosowania. W związku z powyższym istnieje duże zapotrzebowanie na nowe linie komórek NK, w szczególności linie komórek NK pochodzenia psiego, które będą łatwe w hodowli i nie będą tak kosztowne w utrzymaniu jak hodowle ludzkich linii komórek NK.

Celem wynalazku jest zapewnienie nowej linii komórek NK, która będzie łatwa w hodowli, mniej kosztowna w utrzymaniu niż dotychczas dostępne linie komórek NK i pozwoli na uzyskanie powtarzalnych rezultatów badań.

Przedmiotem wynalazku jest wyizolowana psia linia komórek NK – CNK-89 (zdeponowana w DSMZ, nr dostępu DSM ACC3317).

Korzystnie, komórki linii komórkowej CNK-89 mają ekspresję markerów, charakterystycznych dla komórek NK: CD5, CD8, CD45, CD56 i CD79a oraz receptorów NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46.

Korzystnie, linia komórkowa CNK-89 jest stosowana jako model do badania przesiewowego substancji aktywujących i/lub stymulujących komórki NK, zarówno psie jak i innych ssaków, zwłaszcza ludzi, który jest łatwy w hodowli i nie wymaga rygorystycznych warunków hodowlanych oraz dodawania jakichkolwiek dodatkowych czynników wzrostowych lub cytokin, mogących powodować aktywację lub częściową aktywację komórek typu NK, co czyni go również korzystnym z ekonomicznego punktu widzenia.

Korzystnie, linia komórkowa CNK-89 jest stosowana do badania związków będących potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi czy w badaniach oddziaływań komórek NK z innymi komórkami, zwłaszcza komórkami nowotworowymi.

Psia linia komórek NK według wynalazku zapewnia nową stabilną linię komórkową CNK-89 (zdeponowana w DSMZ nr dostępu DSM ACC3317) wyprowadzoną z płynu wysiękowego psa rasy Cocker Spaniel chorego na białaczkę NKT.

Linia komórkowa według wynalazku jest unikalną linią komórkową zapewniającą model do badania komórek NK. Stanowi ona odpowiedź na potrzebę zapewnienia stabilnej i nie aktywowanej linii komórek NK, a dzięki stosunkowo łatwej hodowli i braku konieczności suplementacji podłoża hodowlanego kosztownymi dodatkami, takimi jak m.in. IL-2, jest atrakcyjną alternatywą wobec trudnych w hodowli i wymagających kosztownej suplementacji podłoży dla ludzkich linii komórek NK. Stabilność linii komórkowej została potwierdzona za pomocą wielokrotnie powtarzanych badań profilu ekspresji antygenów powierzchniowych. Jak wykazano w przedstawionym poniżej przykładzie wykonania 3, linia komórkowa według wynalazku nadaje się do oznaczania cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych, która ma miejsce po stymulacji komórek CNK-89 środkami aktywującymi komórki NK, a zmierzona została poprzez poziom wydzielonego IFNgamma.

OPIS FIGUR

Fig. 1 przedstawia ekspresję markerów powierzchniowych w komórkach CNK-89 zmierzoną w analizie z użyciem cytometrii przepływowej.

Fig. 2 przedstawia wyniki elektroforezy żelowej przedstawiające ekspresję receptorów komórek NK oznaczonych metodą RT-PCR w komórkach CNK-89. Jako kontrolę negatywną użyto psich komórek CLBL-1 i CL-1. Jako kontrolę pozytywną użyto komórek psiej śledziony (spleen) i komórek krwi obwodowej PBMC.

Fig. 3 przedstawia wyniki elektroforezy żelowej potwierdzające aktywację CD16, perforyny i granzymu B w wyniku traktowania komórek CNK-89 różnymi interleukinami.

Fig. 4 przedstawia wyniki testu ELISA za pomocą którego zmierzono wydzielanie IFNgamma przez psie komórki CNK-89 wskutek stymulacji związkami niskocząsteczkowymi.

Fig. 5 przedstawia wyniki testu ELISA za pomocą którego zmierzono wydzielanie IFNgamma przez komórki NK92. Wyniki wskazują na zbliżoną reakcję ludzkiej linii komórkowej NK92 i psiej linii komórkowej CNK-89 na stymulację związkami niskocząsteczkowymi.

Fig. 6 przedstawia wyniki cytometrii przepływowej ukazujące efekt cytotoksyczny komórek CNK-89 względem komórek CLBL-1.

Fig. 7 przedstawia pomiar cytotoksyczności bezpośredniej komórek CNK-89 nietraktowanych (NT) i traktowanych IL-12 i IL-12+18 względem komórek GL-1.

PRZYKŁADY WYKONANIA

P r z y k ł a d 1 Otrzymanie i charakterystyka komórek CNK-89.

Linię komórkową CNK-89 otrzymano z płynu wysiękowego pobranego z płuca psa rasy Cocker Spaniel chorego na białaczkę NKT. Zawiesinę komórek przemywano trzykrotnie PBS, a następnie hodowano w medium Advanced RPMI-1640 (Gibco nr kat. 12633) zawierającym 20% cielęcą surowicę płodową (FCS). Komórki pasażowano co 4–5 dni. Po dwóch tygodniach nieadherentne komórki limfoidalne oddzielono od komórek adherentnych i kilkakrotnie subklonowano w celu uzyskania stabilnej i homogennej linii komórkowej. Uzyskana linia komórkowa posiada markery powierzchniowe CD5, CD8, CD45, CD56 i CD79a oraz brak markerów CD3, CD4, CD14, CD20, CD21, CD34, CD117, Thy-1, IgG, IgM i MHC II oznaczone z zastosowaniem przeciwciał wymienionych w Tabeli 1 za pomocą cytofluorymetru przepływowego (FACS Calibur; Becton Dickinson, USA) (Fig. 1). Za pomocą RT-PCR wykazano obecność receptorów CD56, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 i perforyny oraz brak p16, Ly49 i granzymu B (Fig. 2).

Linia CNK-89 jest stabilna. Przez 18 miesięcy, przeprowadzając oznaczenia co 3 miesiące, nie stwierdzono zmian w fenotypie komórek.

T a b e l a 1. Wykaz przeciwciał do immunofenotypowania

Antygen	Przeciwciało	Izotyp	Producent
CD3 (FITC)	CA17.2A12	mIgG1	AbD Serotec
CD4 (PE)	YKIX302.9	rIgG2a	AbD Serotec
CD5 (FITC)	YKIX322.3	rIgG2a	AbD Serotec
CD8 (Alexa Fluor® 647)	YCATE55.9	rIgG1	AbD Serotec
CD14 (Alexa Fluor® 647)	TÜK4	mIgG2a	AbD Serotec
CD20	Sc7733	gIgG	Santa Cruz
CD21 (Alexa Fluor® 647)	CA2.1D6	mIgG1	AbD Serotec
CD45 (PE)	YKIX716.13	mIgG2b	AbD Serotec
CD56 (PE)	MOC-1	mIgG1	Dako
CD79A (RPE)	HM57	mIgG1	Dako
CD117 (PE)	YB5.B8	mIgG1	BD Pharmingen
Thy-1	YKIX337.217	rIgG2b	AbD Serotec
MHC II (FITC)	YKIX334.2	rIgG2a	AbD Serotec
IgG (FITC)	F7884	rIgG	Sigma Aldrich
IgM (FITC)	Polyclonal	gIgG	AbD Serotec

P r z y k ł a d 2 Aktywacja komórek CNK-89 przy pomocy interleukin.

Komórki CNK-89 traktowano się interleukinami 2, 12, 15,18, 21 (RD System) o stężeniu 10 ng/ml lub ich mieszaninami od 4 do 48 godzin, a następnie mierzono ilość wydzielanego IFN gamma lub TNFalfa metodą ELISA (Sigma-Aldrich) oraz oznaczano ekspresję CD16, granzymu i perforyny metodą RT-PCR (Fig. 3). Wykazano, iż sama interleukina 2 nie wpływa na ekspresję CD 16, granzymu ani perforyny, natomiast kombinacja interleukin 12 i 18 oraz 15 i 21 zwiększa ekspresję granzymu i perforyny. Kombinacja wszystkich użytych interleukin, jako jedyna, zwiększa ekspresję CD16.

P r z y k ł a d 3 Aktywacja komórek CNK-89 i NK92 związkami niskocząsteczkowymi.

Komórki CNK-89 i NK92 traktowano się przez 48 godzin związkami z firmy Sigma-Aldrich; Talidomidem (T144) (Tal 50 μM), jonoforami wapnia (jonomycyna (19657) 1 μM, kalcimycyna (C9275) 10 μM), aktywatorami kinazy PKC (PMA (P8139) 10 nM, mebutynian ingenolu (SML1318 100 nM, witaminami 1 μM (A, C, D) lub kombinacjami tych związków, a następnie mierzono ilość wydzielanego IFNgamma metodą ELISA (Fig. 4 i 5). W obu liniach komórkowych pojedyncze substancje nie wpływają na aktywację komórek, natomiast kombinacja jonoforów wapnia z aktywatorami kinazy PKC oraz kombinacje witamin C+D, C+A i D+A znacznie zwiększają wydzielanie IFNgamma.

P r z y k ł a d 4 Oznaczenie aktywności cytotoksycznej komórek CNK-89.

Komórki CNK-89 traktowano interleukinami 2, 12, 15, 18 i 21 o stężeniu 10 ng/ml przez kilka godzin, a następnie medium znad komórek dodano do docelowych psich komórek nowotworowych i po 24–48 godzinach mierzono poziom apoptozy komórek nowotworowych metodą cytofluorymetrii przepływowej (FACS Calibur; Becton Dickinson, USA) poprzez podwójne barwienie komórek jodkiem propidyny (Sigma-Aldrich, P4170) i aneksyną V (Sigma-Aldrich, A9210) (Fig. 6). Sama interleukina 2 nie wpływa na bezpośrednią cytotoksyczność komórek CNK-89, natomiast kombinacja interleukin 12 i 18, 15 i 21 oraz wszystkich interleukin obniża żywotność docelowych komórek psiego chłoniaka CLBL-1 o 30–40%. Ta analiza potwierdza, że linia CNK-89 zachowuje się podobnie do ludzkich komórek NK.

P r z y k ł a d 5 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek CNK-89.

Nietraktowane komórki CNK-89 lub aktywowane interleukinami IL-12 lub IL-12 w połączeniu z IL-18 o stężeniu 10 ng/ml mieszano z komórkami psiej białaczki GL-1 uprzednio znakowanymi barwnikiem DiOC6 (Thermofisher, nr kat. D273), a następnie po 24 godz. mierzono poziom apoptozy komórek nowotworowych poprzez barwienie jodkiem propidyny podobnie jak w przykładzie 4 (Fig. 7). Użyto różnych proporcji komórek CNK-89 do GL-1 od 10:1 do 40:1. Potwierdzono, iż komórki CNK-89 ulegają aktywacji pod wpływem IL-12 samodzielnie oraz IL-12 w połączeniu z IL-18.

Zastrzeżenia patentowe

1. Wyizolowana psia linia komórek NK – CNK-89 (zdeponowana w DSMZ, nr dostępu DSM ACC3317).
2. Linia komórkowa CNK-89 według zastrz. 1, **znamienna tym**, że komórki wykazują ekspresję markerów CD5, CD8, CD45, CD56 i CD79a oraz receptorów NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46.
3. Linia komórkowa CNK-89 jak określona w zastrz. 1 albo 2 do zastosowania jako model do badania przesiewowego substancji aktywujących i/lub stymulujących komórki typu NK, zarówno psie, jak i innych ssaków, zwłaszcza ludzi.
4. Linia komórkowa CNK-89 jak określona w zastrz. 1 albo 2 do zastosowania według zastrz. 3, **znamienna tym**, że komórki linii komórkowej CNK-89 mogą być wykorzystane do badania związków będących potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi.
5. Linia komórkowa CNK-89 jak określona zastrz. 1 albo 2 do zastosowania w badaniach oddziaływań komórek typu NK z innymi komórkami.
6. Linia komórkowa CNK-89 jak określona w zastrz. 1 albo 2 do zastosowania według zastrz. 5, **znamienna tym**, że komórkami oddziałującymi z komórkami typu NK są komórki nowotworowe.

Rysunki

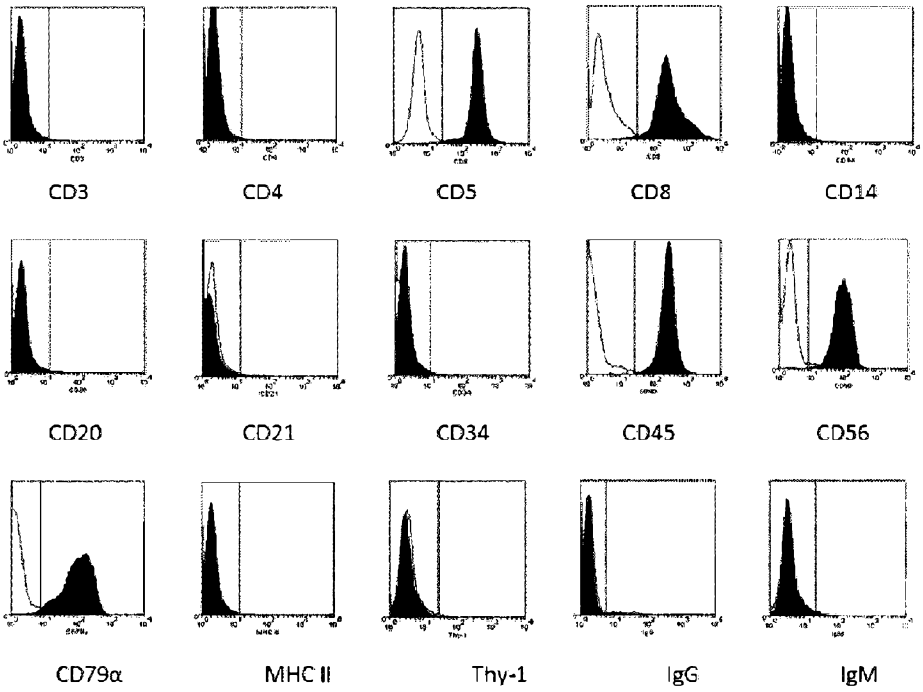


Fig. 1

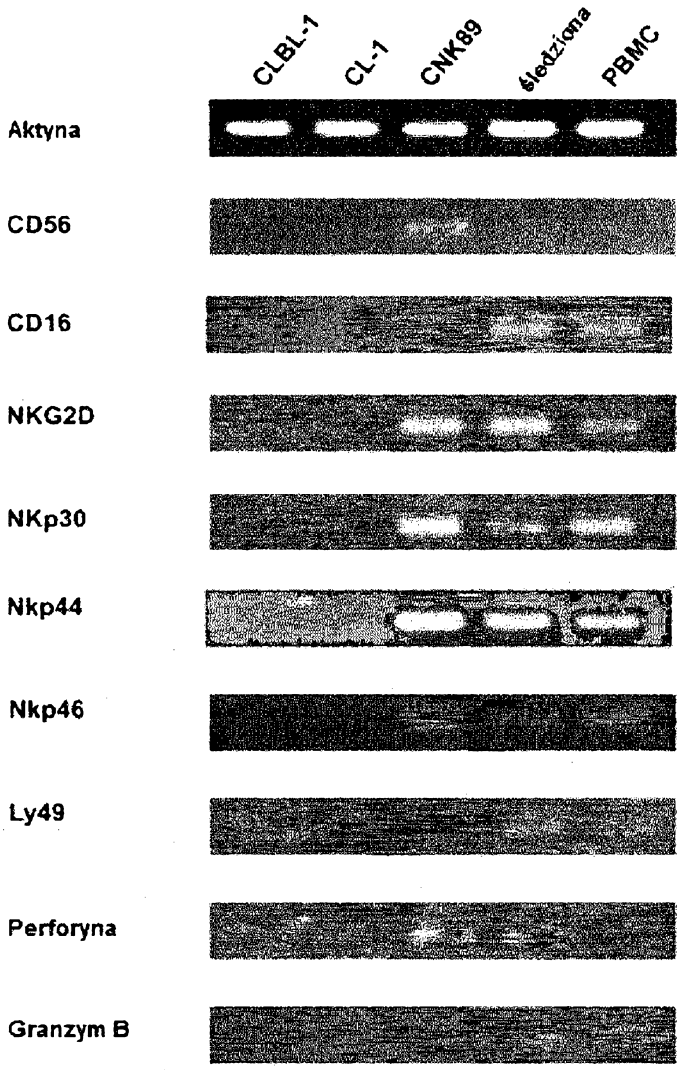

CLBL-1
CL-1
CNK89
śledziona
PBMC
Aktyna
CD56
CD16
NKG2D
NKp30
Nkp44
Nkp46
Ly49
Perforyna
Granzym B

Fig. 2

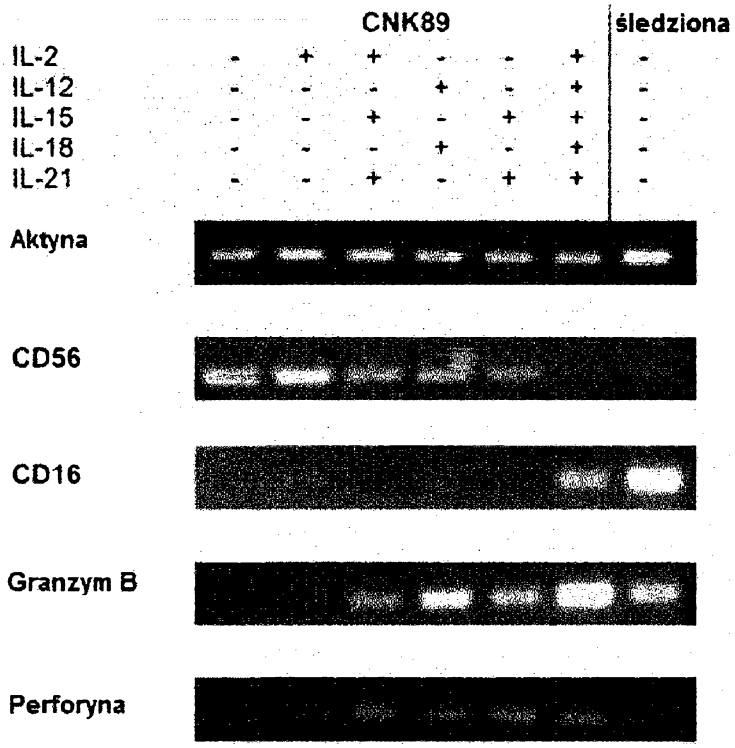

CNK89
śledziona
IL-2
IL-12
IL-15
IL-18
IL-21
Aktyna
CD56
CD16
Granzym B
Perforyna

Fig. 3

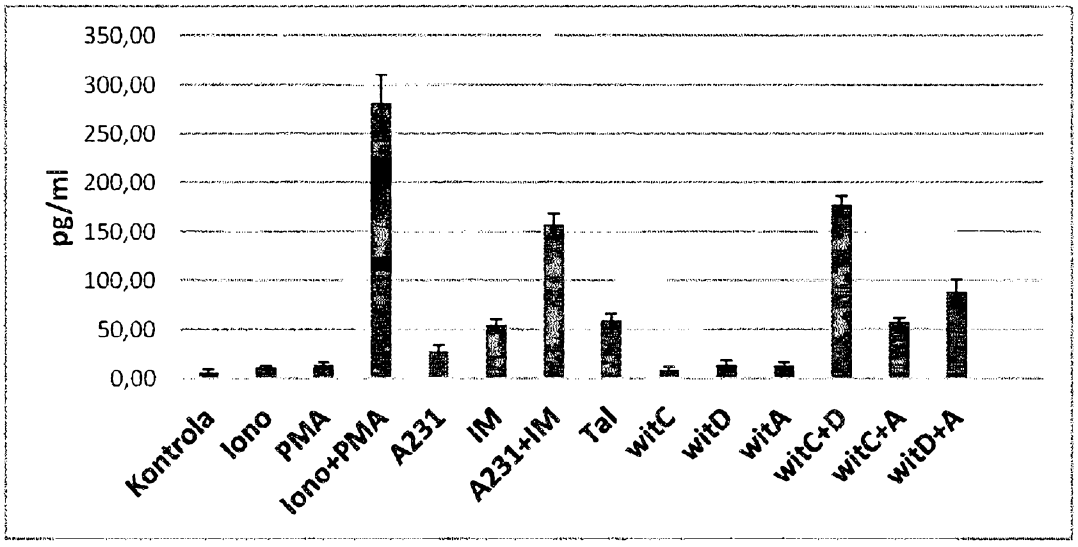

350,00
300,00
250,00
200,00
150,00
100,00
50,00
0,00
pg/ml
Kontrola
Iono
PMA
Iono+PMA
A231
IM
A231+IM
Tal
witC
witD
witA
witC+D
witC+A
witD+A

Fig. 4

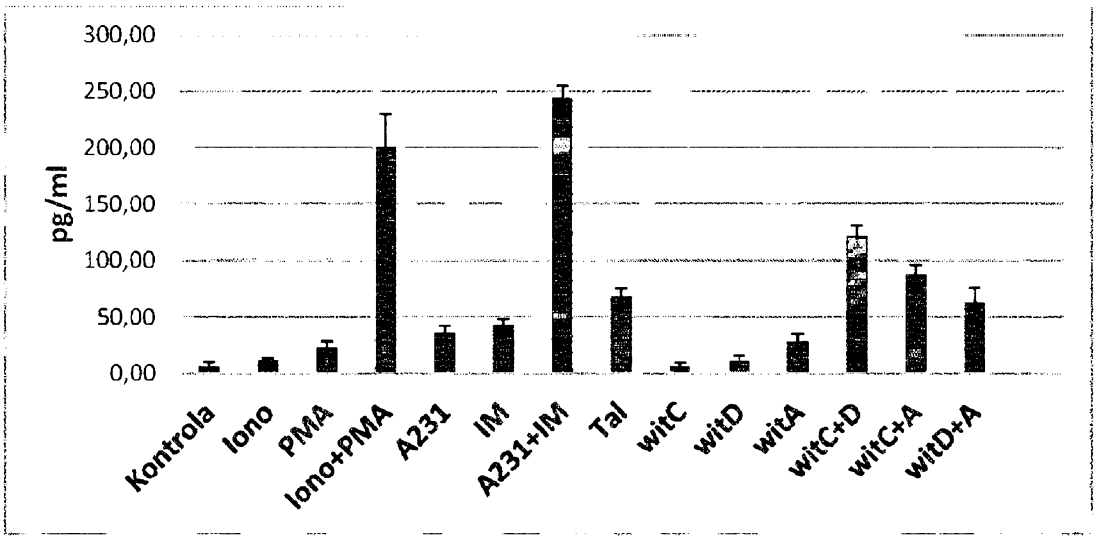

300,00
250,00
200,00
150,00
100,00
50,00
0,00
pg/ml
Kontrola
Iono
PMA
Iono+PMA
A231
IM
A231+IM
Tal
witC
witD
witA
witC+D
witC+A
witD+A

Fig. 5

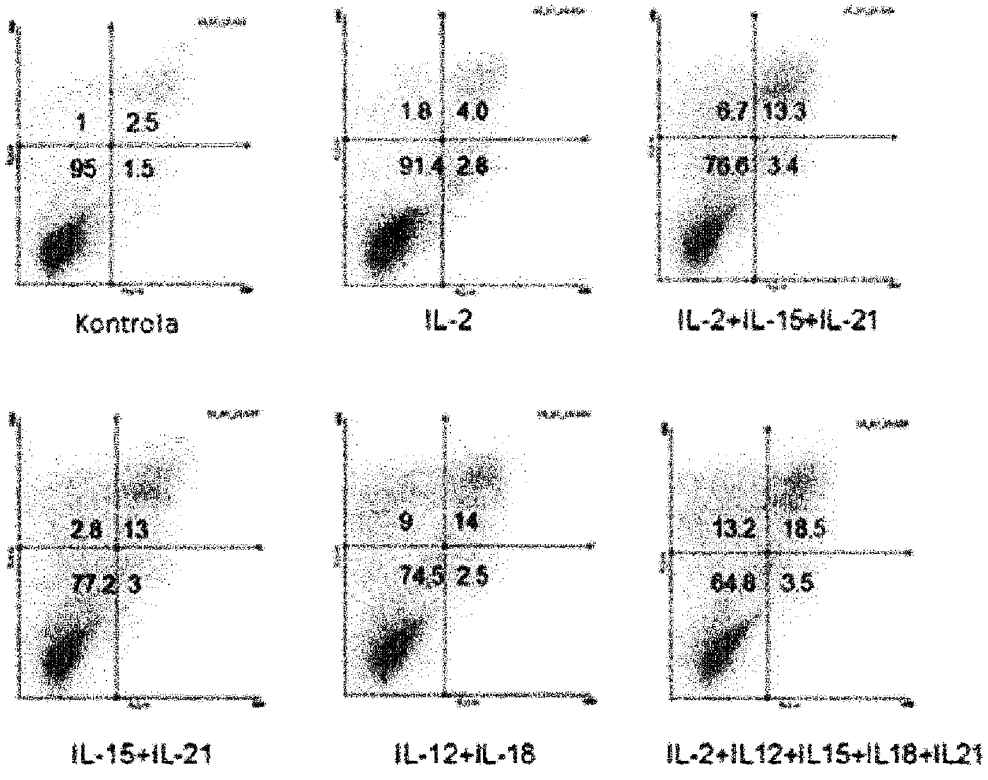

1
2.5
95
1.5
Kontrola
1.8
4.0
91.4
2.6
IL-2
6.7
13.3
76.6
3.4
IL-2+IL-15+IL-21
2.8
13
77.2
3
IL-15+IL-21
9
14
74.5
2.5
IL-12+IL-18
13.2
18.5
64.8
3.5
IL-2+IL12+IL15+IL18+IL21

Fig. 6

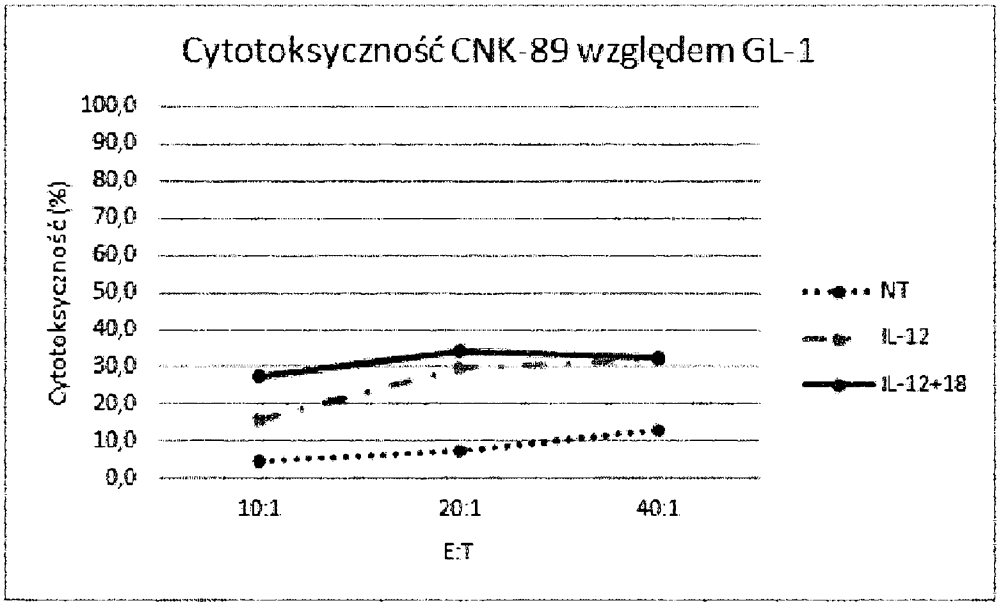

Cytotoksyczność CNK-89 względem GL-1
Cytotoksyczność (%)
100,0
90,0
80,0
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
10:1
20:1
40:1
E:T
NT
IL-12
IL-12+18

Fig. 7