



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P940790 A2

HR P940790 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) MKP⁶: **C 12 P 1/00**
C 12 N 5/00
A 61 K 39/395

(21) Broj prijave: P940790
(22) Datum podnošenja prijave patenta: 26.10.1994.
(43) Datum objave prijave patenta: 30.06.1997.

(31) Broj prve prijave: 99.970
(60) Podaci iz bivšeg SZP-a:

(32) Datum podnošenja prve prijave: 04.12.1979.
(²¹)P-3066/80; (²²)03.12.1980.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

Ortho Pharmaceutical Corporation, Route 202, Raritan, 08869 NJ, US

(72) Izumitelj:

Patrick Chung-Shu King, 1096 Rector Road, Bridgewater, NJ, US

Gideon Goldstein, 30 Dorison Drive, Short Hills, NJ, US

(74) Zastupnik:

CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.o.o., Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

**NIZ HIBRIDNIH STANICA ZA DOBIVANJE MONOKLONALNOG ANTITIJELA ZA LJUDSKI
TIMOCITNI ANTIGEN, SAMO ANTITIJELO I POSTUPCI ZA NJEGOVO DOBIVANJE**

(57) Sažetak: Niz hibridnih stanica za dobivanje monoklonalnog antitijela za ljudski antigen pronađen je na otprilike 70% normalnih ljudskih timocita. Hibrid je stvoren spajanjem splenocita iz imuniziranih CAF₁ miševih s P3X63Ag8UI mieloma stanica. Dijagnostičke i terapijske upotrebe monoklonalnog tijela su također opisane.

HR P940790 A2

Ovaj izum se odnosi općenito na nove nizove hibridnih stanica a specifičnije na nizove hibridnih stanica za dobivanje monoklonalnog antitijela za antigen koji je nađen kod približno 70% normalnih ljudskih timocita, zatim na ovako dobiveno antitijelo i na terapijske i dijagnostičke metode i smjese koje koriste ovo tijelo.

5

Fuzija mišjih mielomskih stanica za stanice slezene iz imuniziranog miša, izvršena od strane Kohlera i Milsteina 1975. god. /Nature, 256, 495-497 (1975)/ prvi put je pokazala da je moguće dobiti kontinuirani niz stanica praveći homogenu (takozvano "monoklonalno") antitijelo. Od tog početnog rada učinjeno je mnogo napora u pravcu dobivanja različitih hibridnih stanica (koje se zovu "hibridome" i korištenjem antitijela načinjenog od strane ovih hibridoma za različita znanstvena istraživanja. Vidi, na primjer, Current Topics in Microbiology and Immunology, volume 81, "Lymphocyte Hybridomas", F. Melchers, M. Potter and N. Warner, izdavači, Springer-Verlag, 1978. i reference date u ovom djelu; C. J. Barnstable et al, Cell, 14, 9-20 (svibanj, 1978); Handbook of Experimental Immunology, treće izdanje, sv. 2, D. M. Wier, izdavač, Blackwell, 1978, poglavlje 25, Chemical and Engineering News, siječanj 1, 1979, str. 15-17. Ove reference istovremeno ukazuju na nagrade i komplikacije u pokušaju da se dobije monoklonalno antitijelo iz hibridoma. Iako se opća tehnika dobro razumije u samom konceptu, postoje mnoge teškoće, koje se sreću u ovom radu, i mnoge varijante ove tehnike koje se zahtijevaju za svaki specifičan slučaj. Ustvari, ne postoji sigurnost, prije pokušaja da se napravi data hibridoma, da će se dobiti željena hibridoma, da će ona proizvesti antitijelo, ako se ona dobije, ili da će tako proizvedeno tijelo imati željenu specifičnost. Na stupanj uspjeha u biti utječe tip upotrijebljenog antigena i tehnika selekcije koja se koristi za izoliranje željene hibridome.

20

Pokušano dobivanje monoklonalnog antitijela za ljudske antigene stanica limfocita priopćeno je samo u nekoliko primjera. Vidi, na primjer, Current Topics in Microbiology and Immunology, ibid., 66-69 i 164-169. Antigeni, koji su korišteni u ovim priopćenim ogledima, kultivirani su na nizovima stanica humane limfoblastoidne leukemije i humane kronične limfocitne leukemije. Mnoge od dobivenih hibridoma izgleda da proizvode antitijelo za različite antigene kod svih ljudskih stanica. Nijedna od dobivenih hibridoma nije proizvela antitijelo protiv prethodno definirane klase ljudskih limfocita. Nedavno su ovi prijavitelji i drugi autorizirali članke koji objelodanjuju dobivanje i ispitivanje hibridoma koje prave antitijelo za neke T-stanične antigene. Vidi, na primjer, Reinherz, E. L. et al., J. Immunology, 123, 1312-1317 (1979); Reinherz, E. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4061-4065 (1979) i Kung, P. C. et al, Science, 206, 347-349 (1979).

30

Treba shvatiti da postoje dvije osnovne klase limfocita koje su uključene u imunom sustavu čovjeka i životinja. Prva od ovih klasa (stanica koja potječe of timusa ili T-stanica) diferencirana je u timusu iz hemopoietičnih osnovnih stanica. Pošto se nalaze unutar timusa, diferencirane stanice se nazivaju "timociti". Zrele T-stanice izlaze iz timusa i kruže između tkiva, limfatika i krvnih tokova. Ove T-stanice formiraju veliki dio rezervoara recirkulirajućih malih limfocita. One imaju imunološku specifičnost i direktno su uključene u stanicama posredovane imune reakcije (kao što je odbijanje presađivanja) kao efektorske stanice. Iako T-stanice ne luče humoralna antitijela, one su ponekad potrebne za lučenje ovih antitijela od strane druge klase limfocita, o kojima se dolje diskutira. Neki tipovi T-stanica igraju regulirajuću ulogu u drugim aspektima imunog sustava. Mehanizam ovog procesa kooperacije stanica još uvijek se potpuno ne razumije.

40

Druga klasa limfocita (stanice koje se izvode iz koštane srži ili B-stanice) su one koje luče antitijelo. One se također razvijaju iz hemopoietičnih osnovnih stanica, ali njihova diferencijacija nije određena timusom. U pticama, one se diferenciraju u jednom organu, koji je analogan timusu, koji se naziva Fabricijusova vreća. Međutim, kod sisavaca nije pronađen ekvivalentni organ i smatra se da se ove B-stanice diferenciraju unutar koštane srži.

45

Sada se zna da se T-stanice dijele na najmanje nekoliko podtipova, koji se nazivaju "pomagačke", "prigušujuće" i "ubijajuće" T-stanice, koje imaju funkciju potpomaganja neke reakcije, zaustavljanja neke reakcije ili ubijanja (razlaganja) stranih stanica. Ove podklase se dobro razumiju za mišje sustave, ali su tek nedavno opisane za ljudske sustave. vidi, na primjer, R. L. Evans et al., Journal of Experimental Medicine, vol. 145, 221-232, 1977, i L. Chess and S. F. Sdilosman - "Functional Analysis of Distinct Human T-Cell Subsets Bearing Unigue Differentiation Antigens", in "Contemporary Topics in Immunobiology", O. Stutman, izdavač, Plenum Press, 1977, vol. 7, 363-379.

50

Sposobnost identifikacije ili prigušivanja klasa ili podklasa T-stanica je značajna za dijagnozu ili liječenje različitih imunoregulatorskih poremećaja ili stanja.

55

Na primjer, neke leukemije i limfome (oboljenja limfe) imaju različitu prognozu u zavisnosti od toga da li potječu od B-stanica ili T-stanica. Na taj način, procjena prognoze bolesti zavisi od razlikovanja ove dvije klase limfocita. Vidi, na primjer, A. C. Aisenberg and J. C. Long, The American Journal of Medicine, 58, 300 (ožujak, 1975); D. Belpomme et al., u "Immunological Diagnosis of Leukemias and Lymphomas", S. Thierfelder et al., izd., Springer, Heidelberg, 1977, 33-45 i D. Belpomme et al., British Journal of Hematology, 1978, 38, 85.

60

Neka bolesna stanja (npr. juvenilni reumatoidni artritis, zloćudnosti i agamaglobulinemija) u vezi su sa nepostojanjem ravnoteže podklasa T-stanica. Sugerirano je da su autoimune bolesti općenito u vezi sa viškom "pomagačkih" T-stanica ili nedostatkom nekih "suzbijajućih" T-stanica, dok je agamaglobulinemija u vezi sa viškom nekih "suzbijajućih" T-stanica ili nedostatkom "pomagačkih" T-stanica. Zloćudnosti su općenito u vezi sa viškom "suzbijajućih" T-stanica.

5

Kod nekih leukemija, višak T-stanica se proizvodi u zaustavljenom stanju razvoja. Na taj način dijagnoza može zavisiti od sposobnosti da se detektira, ova neuravnoteženost ili višak i odredi koji je razvojni stupanj u višku. Vidi, na primjer, J. Kersey et al., "Surface Markers Define Human Lymphoid Malignancies with Differing Prognosis", u Hematology and Blood Transfusion, vol. 20, Springer-Verlag, 1977, 17-24, i u tom radu sadržane reference, i El. L. Reinherz et al., J. Clin. Invest. 64, 392-397 (1979).

10

Stečena agamaglobulinemija, bolesno stanje u kojem se ne proizvodi imuni globulin, obuhvaća najmanje dva različita tipa. U tipu I nemogućnost proizvodnje imunog globulina izazvana je viškom suzbijajućih T-stanica, dok je u tipu II prouzrokovana nedostatkom pomagačkih T-stanica. U oba tipa, izgleda da nema defekta ili nedostatka kod pacijentovih B-stanica, limfocita koji su odgovorni za stvarno lučenje antitijela; međutim, ove B-stanice su ili suzbijene ili "nepotpomognute", što rezultira u uveliko smanjenoj ili nepostojećoj proizvodnji imunog globulina. Tip stečene agamaglobulinemije, na taj način može se odrediti ispitivanjem da li postoji višak suzbijajućih T-stanica ili odsustvo pomagačkih T-stanica.

15

Na terapijskoj strani, postoji sugestija, iako do sada nije definitivno dokazana, da davanje antitijela protiv podtipa T-stanica u višku može imati terapijsku prednost kod autoimune bolesti ili zloćudnosti. Na primjer, rak na pomagačkim T-stanicama (neke kožne T-stanične limfome i neke T-stanične akutne limfoblastoidne leukemije) mogu se liječiti antitijelom za antigen pomagačke T-stanice. Liječenje autoimune bolesti prouzrokovane viškom pomagačkih stanica može se također vršiti na isti način. Liječenje bolesti (npr. zloćudnosti ili stečene agamaglobulinemije tipa I) prouzrokovanih viškom suzbijajućih T-stanica, može se izvršiti davanjem antitijela za antigen suzbijajućih T-stanica.

20

25

Priopćeno je da se antiserumi protiv čitave klase ljudskih T-stanica (takozvani antihumani timocitni globulin ili ATG) mogu terapijski koristiti kod pacijenata koji su primili presađene organe. Pošto stanicama posredovana reakcija (mehanizam kojim se odbijaju transplantati) zavisí od T-stanica, davanje antitijela za T-stanice sprečava ili zadržava ovaj proces odbijanja. Vidi, na primjer, Cosini et al., "Randomized Clinical Trial of ATG in Cadaver Renal Allgraft Recipients: Importance of T Cell Monitoring", Surgery, 40, 155-163 (1976) i reference date u ovom radu.

30

Identifikacija i suzbijanje klasa i podklasa humanih T-stanica ranije je vršena korištenjem spontanih autoantitijela ili selektivnih antiseruma za humane T-stanice dobivenih imunizacijom životinja sa humanim T-stanicama, ispuštanjem krvi životinjama da se dobije serum adsorbiranjem antiseruma sa (na primjer) autolognim ali ne i alogenim B-stanicama da se udalje antitijela neželjene reaktivnosti. Dobivanje ovih antiseruma je izrazito teško, naročito u stupnjevima adsorpcije i pročišćavanja. Čak i adsorbirani i pročišćeni antiserumi, pored željenog antitijela, iz različitih razloga, sadrže i mnoge nečistoće. Prvo, serum sadrži milijune molekula antitijela čak i prije imunizacije T-stanica. Drugo, imunizacija prouzrokuje proizvodnju antitijela protiv mnoštva različitih antigena koji su nađeni kod svih injektiranih humanih T-stanica. Ne postoji selektivna proizvodnja antitijela protiv jednog antigena. Treće, koncentracija specifičnog antitijela, koje je dobiveno primjenom ovih metoda, obično je vrlo mala (na primjer inaktivna pri razrjeđenjima većim od 1:100) i odnos specifičnog prema nespecifičnom antitijelu je manji od $1 \cdot 10^6$.

35

40

Vidi, na primjer, članak Chessa i Schlossmana, koji je gore referiran (na str. 365 i dalje) i članak u Chemical and Engineering News (koji je također gore referiran), u kojima su opisani nedostaci ranijih antiseruma i prednosti monoklalnog antitijela. Sada je otkrivena nova hibridoma (označena kao OKT6) koja je u stanju da proizvodi novo monoklono antitijelo protiv antigena nađenog kod približno 70% normalnih humanih timocita ali ne i kod normalnih humanih perifernih limfoidnih stanica (T-stanica, B-stanica ili nufitih stanica) ili stanica koštane srži.

45

Tako proizvedeno antitijelo je monospecifično za jednu determinantu kod približno 70% normalnih humanih timocita i praktično ne sadrži neki drugi anti-humani imuni globulin, nasuprot ranijim antiserumima (koji su inherentno kontaminirani sa antitijelom reaktivnim prema brojnim humanim antigenima) i ranijim monoklonalnim antitijelima (koja nisu monospecifična za humani timocitni antigen). Pored toga, ova hibridoma može se tako kultivirati da proizvede antitijelo bez potrebe imuniziranja i ubijanja životinja, čemu slijedi mukotrpna adsorpcija i pročišćavanja - što je bilo nužno da se dobiju čak i nečisti antiserumi ranije prakse.

50

55

Prema tome jedan predmet ovog izuma je osiguravanje hibridoma koje proizvode antitijela protiv antigena nađenog kod oko 70% normalnih humanih timocita.

Jedan daljnji aspekt ovog izuma je da se osiguraju metode za dobivanje ovih hibridoma.

60

Daljnji predmet ovog izuma je da se osigura praktično homogeno antitijelo protiv antigena nađenog kod oko 70% normalnih humanih timocita.

5 Još jedan daljnji predmet ovog izuma je da se osiguraju metode za liječenje i dijagnozu bolesti ili identifikaciju T-stanice ili podklase timocita a koje koriste ovo antitijelo.

Drugi predmeti i prednosti ovog izuma biti će jasni iz proučavanja ovog otkrića.

10 U cilju osiguravanja gore datih predmeta i prednosti ovim izumom se daje nova hibridoma koja proizvodi novo antitijelo za antigen nađen kod približno 70% normalnih humanih timocita (ali ne i kod normalnih humanih perifernih limfoidnih stanica ili stanica koštane srži), zatim samo antitijelo i dijagnostičke i terapijske metode koje koriste ovo antitijelo. Ova hibridoma je dobivena uz opću primjenu Milsteina i Kohlera. Nakon imunizacije miševa sa normalnim humanim timocitima, stanice slezene imuniziranih miševa su fuzionirane sa stanicama iz jedne vrste mišjih mieloma i dobivene hibridome su sortirane radi dobivanja onih koje sadrže antitijelo i koje su dale selektivno vezivanje za normalne E rozetne pozitivne humane T-stanice ili timocite. Željene hibridome su zatim klonirane i okarakterizirane. Kao rezultat toga, dobivena je hibridoma koja proizvodi antitijelo (označeno kao OKT6) protiv antigen kod približno 15 70% normalnih humanih timocita. Ne samo da ovo antitijelo reagira sa oko 70% normalnih humanih timocita, već ono također ne reagira sa normalnim perifernim krvnim limfoidnim stanicama ili stanicama koštane srži.

20 Sa aspekta teškoća ukazanih za raniju praksu i nedostatka uspjeha vezanih za korištenje vrsta malignih stanica kao antigena, iznenađujuće je da ova metoda daje željenu hibridomu. Treba naglasiti da nepredvidljiva priroda dobivanja hibridne stanice ne omogućava da se vrši ekstrapolacija od jednog sustava antigena ili stanica do drugog sustava. Ustvari ovi prijavitelji su otkrili da upotreba vrste T-stanica - malignatnih stanica ili pročišćenih antigena odvojenih od površine stanica kao antigena nije bila uspješna u biti.

25 I predmetna hibridoma i iz nje proizvedeno antitijelo ovdje su identificirani oznakom "OKT6", poseban materijal će biti očit iz konteksta. Predmetna hibridoma je deponirana 21. studenog 1979. godine kod American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, i dobiven je ATCC prijemni broj CRL8020.

30 Dobivanje i karakteriziranje ove hibridome i rezultirajućeg antitijela bolje će se razumjeti upućivanjem na slijedeći opis i primjere ilustriranja.

Postupak za dobivanje hibridome općenito obuhvaća slijedeće stupnjeve:

35 A. Imuniziranje miševa sa normalnim humanim timocitima, lako je nađeno da su od prednosti miševi ženke CAF₁, podrazumijeva se da se mogu koristiti i drugi sojevi miševa. Program imunizacije i koncentracija timocita trebaju biti takvi da se proizvedu upotrebljive količine pogodno premiranih splenocita. Nađeno je da su efektivne tri imunizacije u dvotjednim intervalima sa 2×10^7 stanica/miš/injekcija u 0,2 ml fosfatom puferirane slane otopine.

40 B. Odstranjivanje slezena iz imuniziranih miševa i pravljenje suspenzije slezene u odgovarajućem mediju. Dovoljno je oko 1 ml medija na slezenu. Ove eksperimentalne tehnike su dobro poznate.

C. Fuzioniranje suspendiranih stanica slezene sa mišjim mielomskim stanicama iz pogodne vrste stanica upotrebom pogodnog pomagaa fuzije. Pogodan odnos je oko 5 slezenskih stanica na jednu mielomsku stanicu. Ukupna zapremina od oko 0,5 do 1,0 ml medija za fuziju, odgovara za oko 10^8 splenocita. Poznate su i mogu se dobiti mnoge vrste mielomskih stanica miša, općenito od članova akademskih zajednica (udruženja) ili različitih depozitnih banaka, kao što je Salk Institute Cell Distribution Center, La Jolla, CA. Upotrijebljena vrsta stanica treba pogodno biti takozvanog tipa "otpornog prema lijekovima", tako da nefuzionirane mielomske stanice ne prežive u selektivnom mediju, dok će hibridi preživjeti. Najviše uobičajena klasa je vrsta stanica 8-azagvanina, koja nema 50 enzim hipoksantin gvanin fosforibozil transferazu i otuda neće biti potpomognuta od strane HAT (hipoksantin, aminopterin i timidin) medija. Također je općenito od prednosti da upotrijebljena vrsta mielomskih stanica bude takozvanog "neizlučujućeg" tipa, što znači da sama ne proizvodi neko antitijelo, iako se mogu koristiti i izlučujući tipovi. Međutim, u nekim slučajevima mogu biti od prednosti lučeće mijelomske vrste. lako je pogodan pomagač fuzije polietilenglikol, koji ima srednju molekulsku težinu od oko 1000 do oko 4000 (koji se u prometu dobiva kao PEG1000, itd.), mogu se koristiti i drugi pospješivači fuzije - koji su poznati u praksi.

60 D. Razrjeđivanje i kultiviranje u odvojenim posudama, smjese nefuzioniranih stanica slezene, nefuzioniranih mielomskih stanica, i fuzioniranih stanica u selektivnom mediju koji neće potpomagati nefuzionirane mielomske stanice u toku perioda vremena dovoljnog da omogući smrt nefuzioniranih stanica (oko tjedan dana). Razrjeđivanje može biti ograničavajućeg tipa, u kojem je zapremina razrjeđivača izračunata statističkim putem tako da se izolira izvjestan broj stanica (npr. 1 - 4) u svakom odvojenom kontejneru (npr. svakom udubljenju mikrotitarske posude).

Medij je onaj (npr. HAT medij) koji neće potpomoći prema lijekovima otpornu (npr. otpornu prema 8-azagvaninu) nefuzioniranu vrstu mielomskih stanica. Otuda se gube ove mielomske stanice. Kao nefuzionirane stanice slezene nisu malignatne one koje imaju samo konačan broj generacija. Na taj način, poslije izvjesnog perioda vremena (oko tjedan dana) ove nefuzionirane stanice slezene prestaju da se reproduciraju. S druge strane, fuzionirane stanice nastavljaju da se reproduciraju jer posjeduju malignantnu osobinu mielomskog pretka i sposobnost preživljavanja u selektivnoj sredini osobine pretka - stanice slezene.

E. Procjenjivanje plivajućeg gornjeg sloja u svakoj posudi (udubljenju) koja sadrži hibridomu u odnosu na prisustvo antitijela za E rozetne pozitivne pročišćene humane T-stanice ili timocite.

F. Selekcioniranje (npr. ograničavanjem razrjeđenja) i kloniranje hibridoma koje proizvode željeno antitijelo.

Kada je jednom selekcionirana i klonirana željena hibridoma rezultirajuće antitijelo može se dobiti primjenom jednog od dva načina. Najčistije monoklonalno antitijelo se dobiva in vitro kultiviranjem željene hibridome u pogodnom mediju u toku pogodnog vremenskog intervala, čemu slijedi izdvajanje željenog antitijela iz gornjeg sloja tekućine. Pogodni medij i pogodni vremenski period kultiviranja su poznati ili se lako mogu odrediti. Ova in vitro tehnika proizvodi praktično monospecifično monoklonalno antitijelo, praktično bez drugog specifičnog antihumanog imunoglobulina. Prisutna je mala količina drugog imuno globulina jer medij sadrži ksenogeni serum (npr. fetalni teleći serum). Međutim, ova in vitro metoda ne mora proizvesti dovoljnu količinu ili koncentraciju antitijela za neke svrhe, jer je koncentracija monoklonalnog antitijela samo oko 50 µg/ml.

Radi dobivanja mnogo veće koncentracije nešto manje čistog monoklonalnog antitijela, željena hibridoma se može injekcijom dati miševima, pogodno singenskim ili semi-singenskim miševima. Hibridoma će prouzrokovati formiranje tumora koji proizvode antitijelo poslije pogodnog perioda inkubacije, što će rezultirati u visokoj koncentraciji željenog antitijela (oko 5 - 20 mg/ml) u krvnoj struji i peritonealnom eksudatu (trbušna vodena bolest) miša domaćina. Iako ovi miševi domaćini također imaju normalna antitijela u njihovoj krvi i izlučenjima, koncentracija ovih normalnih antitijela je samo oko 5% koncentracije monoklonalnog antitijela. Pored toga, pošto ova normalna antitijela nisu antihumana po svojoj specifičnosti, monoklonalno antitijelo dobiveno iz požnjevenih eksudata ili iz seruma, praktično je bez prisustva bilo kojeg kontaminirajućeg antihumanog imunog globulina. Ovo monoklonalno antitijelo je visoke koncentracije (aktivno pri razrjeđenjima od 1:50000 ili još većim razrjeđenjima) i visokog odnosa specifičnog prema nespecifičnom imunom globulinu (oko 1/20). Imuni globulin koji je pri tome proizveden i inkorporira K lake mielomske lance, su nespecifični, "bezvezni" peptidi, koji samo razrjeđuju monoklonalno antitijelo ne oduzimajući mu njegovu specifičnost.

Primjer 1

Dobivanje monoklonalnih antitijela

A. Imunizacija i hibridizacija tjelesnih stanica

Ženke CAF₁ miševa (Jackson Laboratories, stare 6 - 8 tjedana) su imunizirane intraperitonealno sa 2×10^7 humanih timocita u 0,2 ml fosfatne slane puferirane otopine u dvotjednim intervalima. Četiri dana, nakon treće imunizacije, iz miševa su odstranjene slezene i napravljena je jednostavna stanična suspenzija prešanjem tkiva kroz sito od nehrđajućeg čelika.

Fuzija stanica izvršena je prema postupku Kohlera i Milsteina. 1×10^8 splenocita je fuzionirano u 0,5 ml fuzionog medija koji sadrži 35% polietilenglikola (PEG1000) i 5% dimetilsulfoksida u RPMI 1640 mediju (Gibco, Grand Island, NY) sa 2×10^7 P3x63Ag8U1 mielomskih stanica dobivenih od firme Dr. M. Scharff, Albert Einstein Collage of Medicine, Bronx, NY. Ove mielomske stanice luče IgG₁ K lake lance.

B. Selekcija i razvoj hibridome

Poslije izvršene fuzije stanica, stanice su kultivirane u HAT mediju (hipoksantin, aminopterin i timidin) pri 37°C sa 5%-tnim CO₂ u vlažnoj atmosferi. Nekoliko tjedana kasnije, 40 do 100 µl gornjeg sloja tekućine iz kultura, koje sadrže hibridome, dodano je loptici od 10⁶ perifernih limfoita izdvojenih u E rozetne pozitivne (E⁺) i E rozetne negativne populacije (E⁻), koje su napravljene iz krvi zdravih humanih davalaca kao što je opisano od strane Mendesa (J. Immunol. 111, 860 (1973)). Detekcija mišjih hibridomnih antitijela, vezanih za ove stanice, određena je indirektnom imunofluorescencijom. Stanice inkubirane sa gornjim slojevima tekućine kultura obojene su fluoresceniranim kozanti-miš IgG (G/M FITC) (Meloy Laboratories, Springfield, VA; F/p=2,5) i fluorescentnim antitijelom prevučene stanice su zatim analizirane na citofluorografu FC200/4800A (Ortho Instruments, Westwood, MA) kao što je to opisano u

promjeru III. Kulture hibridoma koje sadrže antitijela koja reagiraju specifično sa E+ limfocitima (T-stanice) i/ili timociti su selekcionirane i klonirane dva puta primjenom metoda ograničenog razrjeđivanja u prisustvu hranilačkih stanica. Nakon toga su ekstrakti prenešeni intraperitonealno davanjem injekcije od 1×10^7 stanica datog ekstrakta (0,2 ml zapr.) u CAF₁ miševe premirane sa 2,6,10,14-tetrametilpentadekanom (koji firma Aldrich Chemical Company prodaje pod imenom Pristine). Malignantni eksudati iz ovih miševa su zatim upotrijebljeni da se okarakteriziraju limfociti, kao što je dolje opisano u primjeru 2. Standardnim tehnikama je demonstrirano da je predmetno hibridno antitijelo OKT6 podklase tgG₁.

Primjer 2

Karakterizacija reaktivnosti OKT6

A. Izoliranje limfocitnih populacija

Humane periferne krvne mononuklearne stanice su izolirane iz zdravih dobrovoljnih davalaca (starosti 15 - 40 godina) primjenom Ficoll-Hypaqueovog centrifugiranja sa gradijentom gustoće (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) čemu slijedi tehnika Boyum, Scand. J. Ciin. Lab. Invest. 21 (suppl. 97), 77 (1968). Nefrakcionirane mononuklearne stanice su razdvojene u površinske Ig⁺(B) i Ig⁻(T plus nula) populacije primjenom kromatografije na kolon Sephadex G-200 anti-F(ab')₂, kao što je ranije opisana od strane Chessa et al., u J. Immunol. 113, 1113 (1974). T-stanice su izdvojene E rozetiranjem Ig⁻ populacije sa 5%-tnim ovčjim eritrocitima (Microbiological Associates, Bethesda, MD). Rozetirana smjesa je raslojena preko Ficoll-Hypaquea i izdvojena E⁺ loptica tretira sa 0,155 M otopinom NH₄Cl (10 ml na 10⁸ stanica). Tako dobivena populacija T-stanica je bila < 2% EAC rozetno pozitivna i > 95% E rozetno pozitivna što je određeno standardnim metodama. Pored toga, ne-rozetirajuća Ig⁻ (nula stanice) populacija je požnjevena iz Ficollve međufaze. Ova posljednja populacija je bila < 5% E⁺ i ≤ 2% s Ig⁺. Površinska Ig⁺ (B) populacija je dobivena iz kolone Sephadex G-200 čemu je slijedilo eluiranje sa normalnim humanim gama globulinom, kao što je ranije opisano. Ova populacija je bila > 95% površinski Ig⁺ i < 5% E⁺.

Stanice normalne humane koštane srži dobivene su iz posteriorne kriješte tankog crijeva normalnih humanih dobrovoljaca primjenom aspiracije iglom.

B. Izolacija timocita

Normalna humana timusna žlijezda je dobivena iz pacijenta starosti od dva mjeseca do 14 godina, koji su podvrgnuti kirurgiji srca. Svježe dobiveni dijelovi timusne žlijezde su odmah stavljani u 5%-tni fetalni teleći serum u mediju 199 (Gipco), fino isjeckani kliještima i škarama i potom pretvoreni u jednostanične suspenzije prešanjem kroz žičano sito. Stanice su zatim naslojene preko Ficoll-Hypaque i ispređene i ispirane kao što je ranije opisano u gore datom odjeljku A. Tako dobiveni timociti su bili > 95% plodni i ≥ 90% E rozetno pozitivni.

C. Vrste stanica T soja i T akutnih limfoblastnih leukemijskih stanica

T stanične vrste CEM, HSB-2 i MOLT-4 su date od strane Dr. H. Lazarusa (Sidney Farbar Cancer Institute, Boston, MA). Leukemijske stanice su dobivene od 25 pacijenata sa dijagnozom T stanica sasvim. Ovi pojedinačni tumori su ranije bili određeni da su soja T stanica na osnovu njihovog spontanog rozetnog formiranja sa ovčjim eritrocitima (> 20% E⁺) i reaktivnosti prema specifičnim heteroantisermima anti-HTL (B. K.) i A99 za T- stanice, kao što je ranije opisano. Tumorske populacije su konzervirane na niskoj temperaturi od -196°C sa parnom fazom tekućeg dušika pomoću 10%-tnog DMSO i 20%-tnog AB humanog seruma do momenta karakterizacije površine. Sve tumorske populacije (koje su pri tome analizirane) bile su više od 90% blasti što je utvrđeno morfologijom citocentrifugiranih preparata prema Wright-Giemsu.

Primjer 3

Citofluorografska analiza i odvajanje stanica

Citofluorografska analiza monoklonalnih antitijela svih staničnih populacija izvršena je pomoću indirektno imunofluorescencije sa fluorescein-konjugiranim koza-anti-mišjim IgG (G/M FITC) (Meloy Laboratories) uz korištenje Citofluorografa FC200/4800A (Ortho Instruments). Ukratko, 1×10^6 stanica tretirano je sa 0,15 ml OKTS pri 1:500 razrjeđenju, inkubirano pri 4°C u toku 30 minuta i 2 puta isprano. Stanice su zatim reagirale sa 0,15 ml G/M FITC razrjeđenja 1:40 pri 4°C u toku 30 minuta, centrifugirane i 3 puta isprane. Stanice su zatim analizirane na citofluorografu i jačina fluorescencije po stanici je registrirana na pulsnom visinskom analizatoru. Sličan tok reaktivnosti je nađen pri razrjeđenju od 1:10000, ali je dalje razrjeđivanje prouzrokovalo gubitak reaktivnosti. Fon

obojenja je dobiven zamjenjujući 0,15 ml alikvotni dio eksudata 1:500 iz CAF₁ miša kojem je intraperitonealno data injekcija klona koji ne proizvodi hibrid. U ogledima koji obuhvaćaju antitijelo i kompletno posredovanu limfolizu, timociti i periferne T stanice su kultivirani preko noći čemu je slijedilo selektivno liziranje a zatim analiziranje na citofluorografu.

5

Primjer 4

Razlaganje limfoidnih populacija sa monoklonalnim antitijelom i komplementom

10 40x10⁶ perifernih T stanica ili timocita stavljeno je u plastičnu epruvetu od 15 ml (Falcon, Oxnard, CA). Loptice stanice su inkubirane sa 0,8 ml OKT3; OKT8 ili normalnom kontrolom eksudata razrijeđenim u PBS 1:200, ponovno suspendirane i inkubirane 60 minuta pri 20°C. Zatim je dodano 0,2 n svježeg zečjeg komplementa u populacije tretirane antitijelom, ponovno suspendirano i dalje inkubirano pri 37°C u kupatilu sa mućkajućom vodom toku vremenskog perioda od 60 minuta. Na kraju ovog vremenskog perioda stanice su ispredene dolje i plodne stanice su numerirane sa
15 Trypanovom plavom ekskluzijom. Poslije brojenja stanice su ispirane dva puta u 5%-tnom FCS i stavljene u finalni medij /RPMI 1640 (Grand Island Biological Company Grand Island, NY) koji sadrži 20% AB⁺ humanog seruma, 1 % penicilin- streptomicina, 200 mM L-glutamina, 25 mM HEPES pufera i 0,5% natrij-bikarbonata/, inkubirane preko noći u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ pri 37°C

Kratak opis crteža

Sl. 1 prikazuje uzorak fluorescencije koji je dobiven na citofluorografu poslije reagiranja normalnih humanih timocita sa OKT6 i drugim monoklonalnim antitijelima pri razrjeđenju od 1:500 i G/M FITC. Fon fluorescentnog bojenja je dobiven inkubiranjem svake populacije sa eksudatnom tekućinom (razrjeđenja 1:500) iz miša kojem je injekcijom dat neproizvodni klon.
25

Sl. 2 prikazuje stupnjeve intratimične diferencijacije u čovjeku.

30 Dobivanje hibridoma i dobivanje i karakterizacija rezultirajućeg antitijela izvršeni su kao što je opisano u gore datim primjerima. Iako su velike količine predmetnog antitijela dobivene injektiranjem predmetnog hibridoma intraperitonealno miševima i ubiranjem malignatnih eksudata, očito se podrazumijeva da se ove hibridome mogu kultivirati in vitro primjenom dobro poznatih tehnika u ovoj praksi i da se antitijelo može ukloniti iz gornjeg sloja tekućine.

35 Tabela 1 prikazuje reaktivnost OKT6, OKT8, OKT9 i OKT10 prema različitim humanim limfoidnim staničnim populacijama. OKT6 monoklonalno antitijelo je reaktivno sa približno 70% normalnih humanih timocita a ne sa bilo kojom drugom od ispitivanih limfoidnih stanica. Ovaj model reaktivnosti je test kojim se može detektirati predmetno antitijelo OKT6 i razlikovati od drugih antitijela.

40 Sl. 1 prikazuje reprezentativni fluorescentni model koji je dobiven na citofluorografu poslije reagiranja suspenzija normalnih humanih timocita sa 1:500 razrjeđenjem OKT3, OKT4, OKT5, OKT6, OKT8, OKT9, OKT10 i G/M FITC. Slični modeli reaktivnosti su nađeni sa 12 dodatnih populacija normalnih humanih timocita koje su pri tome ispitivane. Kao što je prikazano, postoje znatne razlike u postotku reaktivnosti i jačini fluorescencije kod svakog od ovih monoklonalnih antitijela. Na primjer, OKT9 reagira sa približno 10% timocita sa malom jačinom fluorescencije dok
45 OKT5, OKT6, OKT8 i OKT10 reagiraju sa približno 70~^o timocita pri većoj jačini fluorescencije OKT4, koji reagira sa 75% timocita, je intermedijer između OKT9 monoklonalnih antitijela koja daju model veće jačine fluorescencije. Pored toga sl. 1 prikazuje da je približno 15% timocita detektirano sa OKT3 primjenom indirektno imunofluorescencije. Nije prikazan OKT1, čiji je model reaktivnosti praktično identičan sa OKT3 kod timocita. Model reaktivnosti na sl. 1 je drugi test pomoću kojeg se predmetno antitijelo OKT6 može detektirati i razlikovati od drugih antitijela

50

Tabela 2 prikazuje raspodjelu antigena koja je definirana različitim monoklonalnim antitijelima kod humanih perifernih T stanica i limfocita, kao što je određeno serijama lizirajućih (razlažućih) eksperimenata koji su opisani u primjeru 4. Pošto su samo OKT3, OKT4 i OKT8 bili komplementi fiksirajući monoklonalna antitijela, ova tri su i korištena. Kao što je prikazano .na tabeli 2A, cjelokupna populacija T stanica reagira sa OKT3 dok OKT4, OKT5 i OKT8 reagiraju sa
55 60% odnosno 25% i 34% T stanica. Liziranje (razlaganje sa OKT4 i komplementom smanjio je ukupni broj za 62% i specifično izbacilo OKT4⁺ populaciju. Pored toga, postoci OKT5⁺ i OKT7⁺ stanica su porasli i nije bilo efekta na apsolutni broj OKT5⁺ i OKT8⁺ T stanica. Ovi eksperimenti sugeriraju da se OKT4⁺ razlikuje od OKT5⁺ i OKT8⁺ i populacija Daljnja potpora za ovaj zaključak je dobivena liziranjem (razlaganjem) T stanica sa OKT8⁺ i komplementom. U ovom slučaju postotak OKT4⁺ T stanica je porastao, a apsolutni broj je ostao isti, a OKT8⁺ OKT5⁺ su eliminirane. Pored toga, ovi rezultati demonstriraju da je OKT8⁺ populacija recipročna OKT4⁺ populaciji i sadrže
60 cjelokupnu OKT5⁺ populaciju T stanica koje su predviđene.

Slični eksperimenti sa populacijama humanih timocita dali su različite rezultate. Kao što je prikazano na tabeli 2B, približno 75% timocita je bilo OKT4⁺ ili OKT8⁺. Osim toga, naredno liziranje (razlaganje) sa OKT4 ili OKT8 ima za posljedicu da je ostalo samo 25% timocita. Većina preostalih timocita je reaktivna u odnosu na OKT3, dok je samo manji dio reaktivan prema OKT6. Ovi nalazi pokazuju da veći dio populacije humanih timocita nosi OKT4, OKT5, OKT6 i OKT8 površinske antigene kod iste stanice. Pored toga, tabela 2 pokazuje da naredno tretiranje sa OKT8 ili OKT4, dovode do znatnog povećanja zrelih timocita koji nose OKT3 antigen. Na taj način, veći dio OKT3 reaktivnih timocita je već izdvojen u OKT4⁺ ili OKT8⁺ podvrste jer je veći dio zaostalih stanica, nakon izvršenog OKT4 ili OKT8 liziranja, k OKT3⁺. Ako je OKT3⁺ podpopulacija bila OKT4⁺ i OKT8⁺, tad bi liziranje sa bilo kojim antitijelom uklonio OKT3 reaktivne timocite. Da bi se dalje odredio odnos OKT3 reaktivne timocitne podpopulacije prema drugim timocitnim frakcijama, koje su definirane kao monoklonalno tijelo (antitijelo timociti su tretirani sa OKT3 i komplementom i preostale stanice su zatim uspoređene sa netretiranim populacijama timocita. Kao što je prikazano na tabeli 2B, OKT3 i komplementi su uklonili 25% timocita. Osim toga, nije bilo glavnog gubitka OKT4, OKT5, OKT6 ili OKT8 reaktivnih populacija. Ovi nalazi sugeriraju da je ogromna većina timocita koja nosi OKT6 marker sadržana u OKT3⁻ populaciji. Pored toga oni dalje sugeriraju da su timociti koji simultano izražavaju antigene definirane sa OKT4, OKT5 i OKT8, isto tako ograničeni na OKT3⁻ populaciju. Također treba primijetiti da OKT9 reaktivna populacija timocita nije smanjena nakon tretiranja nefrakcioniranih timocita sa OKT3 i komplementom, čime se pokazuje da je OKT9⁺ podpopulacija uveliko ograničena na OKT3⁻ populaciju timocita.

Na osnovu ovih rezultata, moguće je opisati stanje intratimičnog razvoja humanih timocita. Kao što je prikazano na sl. 2, praktično svi timociti nose marker OKT10. Pored toga, timociti u ranom stadiju stječu OKT9 marker (Thy1 odnosno Thy2). Ovaj stupanj definira manji dio timocita i uračunava približno 10% nefrakcionirane populacije. Nakon toga, humani timociti stječu timocitni jedinstveni antigen koji je definiran sa OKT6 i konkurentno izražavaju OKT4, OKT5 i OKT8 (Thy4). Ova posljednja populacija predstavlja većinu timocitni uračunava do oko 70 - 80% timične populacije. Daljnjim sazrijevanjem timociti gube OKT6 reaktivnost, stječu OKT3 (i OKT1) reaktivnost, i izdvajaju se u podvrste OKT4⁺ i OKT5⁺/OKT8⁺ (Thy7 i Thy8). Najzad, izgleda da dok se timocit eksportira u periferni odjeljak T stanice, .on gubi OKT10 marker jer ovaj antigen ne postoji kod praktično svih perifernih T limfocita. Moguća prelazna stanja između ova tri glavna stupnja timičnog razvoja su označena sa Thy3, Thy5 i Thy6 na sl. 2.

Pošto se smatra da akutna limfoblastna leukemija T vrste potječe od nezrelih timocita, određen je odnos između tumorskih stanica iz individua sa T-ALL i onih predloženih stanja intratimične diferencijacije. Ispitivano je 25 populacija tumorskih stanica iz individua sa T-ALL i 3 vrste T stanica koje su ranije proučavane sa uobičajenim reagensima Anti-T stanica i E rozetiranjem. Kao što je pokazano na tabeli 3, većina T-ALL leukemijskih stanica je bila reaktivna sa samim OKT10 ili OKT9 i OKT10, i nije reagirala sa drugim monoklonalnim antitijelima. Tako je 15 od 25 proučavanih slučajeva pokazalo da ima rane timocitne antigene (stupanj I). Nasuprot tome, 5 od 25 ispitivanih slučajeva je bilo reaktivno prema OKT6, što sugerira izvođenje iz zrelije timusne populacije (stupanj II). Ova T-ALL grupa je sama po sebi heterogena u odnosu na OKT4, OKT6 i OKT9 reaktivnost, kao što je pokazano na tabeli 3. Stanice iz 2 do 5 pacijenata imaju najveći dio uobičajenih timocitnih antigena uključujući OKT4, OKT6 i OKT8. Vrijedi spomenuti da OKT5 nije prisutan kod bilo kojeg od ovih 5 tumora sa stupnjem II čak iako je primijećena OKT8 reaktivnost. Ovaj posljednji rezultat jasno sugerira da OKT5 i OKT8 definiraju različite antigene ili različite determinante kod istog antigena. Najzad, 1 od 25 pacijentnih tumora dolazi od zrele populacije timocita (stupanj III) kao što je definirano njegovom reaktivnošću na OKT3. Ovaj individualni tumor, pored toga, bio je reaktivan prema OKT5, OKT8 i OKT10. Od 25 analiziranih leukemijskih populacija samo 4 tumora nisu mogla biti jasno kategorizirana. Tri su bila pozitivna prema OKT4 i OKT8, ali nisu reagirala sa OKT3 i OKT6 i najvjerojatnije predstavljaju prijelazna stanja od Thy4 i Thy7,8. Jedan od 25 slučajeva izgleda da je prijelaz od Thy3 do Thy4 jer je posjedovao OKT8 i OKT10 reaktivnost. Vrste T stanica, koje potječu od T-ALL populacija tumora, također su predstavljale stanice iz specifičnog stanja intratimične diferencijacije. Kao što je prikazano na tabeli 4, HSB je bio isključivo reaktivan prema OKT9 i OKT10 i otuda bi mogao definirati populaciju tumora koja potječe iz stupnja I. Nasuprot tome, CEM je bio reaktivan prema OKT4, OKT6, OKT8, OKT9 i OKT10 i izgleda da potječe iz stupnja II timocita. Najzad, MOLT-4 izgleda da predstavlja leukemijsku transformaciju na stanju između HSB-2 i CEM jer je izražavao OKT6, OKT9 i OKT10.

Pošto je pokazano da pacijenti sa kasnijim stupnjevima (npr. stupnjem II) T stanične akutne limfoblastne leukemije imaju produženo preživljavanje bez oboljenja nego oni sa stupnjem I ALL, upotreba OKT6 antitijela omogućava zaključke koji se odnose na prognozu za datog pacijenta sa T stanicama ALL.

Tabela 5 pokazuje odnos između razina perifernih T stanica i T staničnih podvrsta i različitih stanja oboljenja. Ovi odnosi se mogu koristiti za dijagnostičke svrhe (npr. da se detektiraju akutne infektivne mononukleoze) analiziranjem uzoraka krvi individue na koju se sumnja da ima jedno od ovih bolesnih stanja da bi se odredile razine T stanica i podvrsta T stanica. Ovi odnosi se također mogu koristiti za terapijske svrhe tamo gdje je uzrok bolesnog stanja povišena razina podvrste T stanica (npr. tip I stečene agamaglobulinemije). Za terapijske svrhe, davanje odgovarajućeg monoklonalnog antitijela nekom pacijentu sa povišenom razinom podvrste T stanica smanjit će ili

eliminirati višak. Odnosi prikazani na tabelama 2 do 5 su daljnji način na koji se OKT6 antitijelo može detektirati i razlikovati od drugih antitijela.

- 5 Druga monoklonalna antitijela i hibridome koje ih proizvode, a koji su dobiveni od strane ovih prijavitelja (označene sa OKT1, OKT3, OKT4 i OKT5) opisane su i zahtjevane u slijedećim SAD patentnim prijavama: SN 22 132, predata 20. ožujka 1979. godine; SN 33 639, predata 26. travnja 1979. godine; SN 33 669, predata 26. travnja 1979. godine, i SN 76 642, predata 18. rujna 1979. godine, i SN 82 515, predata 9. listopada 1979. godine. Druge hibridome, koje proizvode monoklonalno antitijelo, a koje su dobivene od strane ovih prijavitelja (označene OKTB, OKT9 i OKT10) opisane su i zahtjevane u SAD patentnim prijavama predatim istog dana kada je predata i ova prijava a nazivaju se:

15 Vrsta hibridne stanice za dobivanje monoklonalnog antitijela (fiksiranog za komplement) za humane suzbijajuće T stanice, samo antitijelo i metode njegove primjene; Vrsta hibridne stanice za dobivanje monoklonalnog antitijela za humani rani timocitni antigen, samo antitijelo i metode njegove primjene, i Vrsta hibridne stanice za dobivanje monoklonalnog antitijela za humani protimocitni antigen, samo antitijelo i metode njegove primjene.

Ove prijave su date referencom u ovoj prijavi.

20 Prema ovom izumu data je hibridoma, koja je u stanju da proizvede antitijelo protiv antigena nađenog kod približno 70% normalnih humanih timocita, postupak za dobivanje ove hibridome, monoklonalno antitijelo protiv antigena nađenog kod približno 70% normalnih humanih timocita, postupci za dobivanje ovog antitijela i postupci i smjese za tretiranje (liječenje) ili dijagnozu bolesti ili identifikaciju T stanice ili podklasa timocita uz primjenu ovog antitijela.

Tabela 1

25 Reaktivnost monoklonalnih antitijela kod humanih limfoidnih populacija

| monoklonalno antitijelo | periferna krv (30*) | | koštana srž (6) | timus (22) |
|-------------------------|---------------------|----------------|-----------------|------------|
| | E ⁺ | E ⁻ | | |
| OKT6 | 0 % | 0 % | 0 % | 70 % |
| OKT8 | 30 % | 0 % | < 2 % | 80 % |
| OKT9 | 0 % | 0 % | 0 % | ≤ 10 % |
| OKT10 | <5 % | 10 % | ≤ 20 % | 95 % |

30 * Brojevi u zagradama predstavljaju broj ispitivanih uzoraka; postotne vrijednosti označavaju srednje vrijednosti.

Tabela 2. Razlike raspodjele antigena defimiranih monoklonalnim antitijelom kod humanih perifernih T i timocita

| Limfoidna populacija | ukupan broj izdvojenih | postotna (%) reaktivnost preostalih ćelija sa monoklonalnim antitijelima | | | | | | | | | |
|------------------------|------------------------|--|------|------|------|------|------|-------|--|--|--|
| A. periferne | ukupan broj izdvojenih | OKT3 | OKT4 | OKT5 | OKT6 | OKT8 | OKT9 | OKT10 | | | |
| T stanice | | | | | | | | | | | |
| neliječene* | 40 x 10 ⁶ | 98 | 60 | 25 | 0 | 34 | - | - | | | |
| OKT4 + C ⁺ | 15,2 x 10 ⁶ | 95 | 0 | 70 | 0 | 95 | - | - | | | |
| OKT8 + C ⁺⁺ | 25,2 x 10 ⁶ | 95 | 92 | 0 | 0 | 0 | - | - | | | |
| B. timociti | | | | | | | | | | | |
| neliječeni* | 40 x 10 ⁶ | 30 | 75 | 70 | 65 | 75 | 8 | 92 | | | |
| OKT4 + C ⁺ | 10 x 10 ⁶ | 80 | 0 | 85 | 10 | 55 | 6 | 75 | | | |
| OKT8 + C ⁺ | 9,5 x 10 ⁶ | 85 | 65 | 0 | 13 | 0 | 5 | 85 | | | |
| OKT3 + C ⁺ | 30 x 10 ⁶ | 0 | 60 | 80 | 82 | 90 | 12 | 86 | | | |

* Neliječene populacije i populacije, koje su liječene samim komplementom, ne mogu se razlikovati pri ponovnoj analizi. Nespecifično analiziranje je bilo $\leq 5\%$ kod svih slučajeva. Dobiveni rezultati su reprezentativni za 6 eksperimenata.

+C⁺ = komplement

Tabela 3. Čelijske površinske karakteristike akutne limfoblastne leukemije T-vrste

| diferencijativno stanje | postotna (%) reaktivnost sa monoklonalnim antitijelima | | | | | | | | | | broj testiranih T-ALL (n = 25) | |
|-------------------------|--|------|------|------|------|------|-------|---|---|---|-----------------------------------|-------------------|
| | OKT3 | OKT4 | OKT5 | OKT6 | OKT8 | OKT9 | OKT10 | | | | | |
| stupanj I | | | | | | | | | | | | |
| A. profimocit (Thy1)+ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | 7 |
| B. rani timocit (Thy2) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 8 |
| stupanj II | | | | | | | | | | | | |
| uobičajen timocit | | | | | | | | | | | | |
| (Thy3) | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | 1 |
| (Thy4) | - | + | - | - | + | + | + | - | - | + | + | 1 |
| (Thy3-4) | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | 2 |
| (Thy4-6) | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | + | 1 |
| stupanj III | | | | | | | | | | | | |
| kasni timocit (Thy8) | + | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | $\frac{ml}{21}$ * |

* Dodatna četiri tumora ne mogu se lako kategorirati u stupanj I-III. Vidi tekst specifikacije radi njihove karakterizacije.

5

+ Ova oznaka se odnosi na sl. 2.

++ Pozitivna (+) reaktivnost je definirana kao $\geq 30\%$ specifične fluorescencije iznad osnovne kontrolne probe, dok je negativna reaktivnost nemoguće razlikovati od osnovnog (fonskog) obojenja kod suspenzija tumorskih.

Tabela 4

Reaktivnost sa monoklonalnim antitijelima

| vrsta | OKT3 | OKT4 | OKT5 | OKT6 | OKT8 | OKT9 | OKT10 |
|--------|------|------|------|------|------|------|-------|
| HSB-2 | -* | - | - | - | - | + | + |
| CEM | - | + | - | + | + | + | + |
| MOLT-4 | - | - | - | + | + | + | + |

5

* Kriterijem za negativnu (-) ili pozitivnu (+) reaktivnost bio je isti kao u tabeli 3.

Tabela 5.

10 Nivoi perifernih T ćelija u bolesnim stanjima

| bolesno stanje | nivoi T ćelija | | | | |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | OKT3 ⁺ | OKT4 ⁺ | OKT5 ⁺ | OKT8 ⁺ | OKT6 ⁺ |
| primarna žučna ciroza (2) | N | + | - | - | - |
| multipla skleroza (napred. bolest) (8) | - | N | - | - | - |
| Myastenia Gravis (rano liječena) (3) | O | O | O | O | O |
| akutni presad prema domaćinu (3) | Odo - | - | O | + | + |
| stečena agamaglobulinemija tip I | | | + | | |
| tip II | | O | | | |
| hiper IgE (4) | - | N | O do - | O do - | - |
| akutna infektivna mononukleoza (4)* | + | O do -- | ++ | ++ | O |
| Hodkins-ova bolest stanja I & II | N | N | N | N | O |
| stanja III & IV | N | N | N | N | O |
| psorijaza (3/5) | N | + do ++ | N | N | O |

N = unutar normalnih granica

++ = uveliko iznad normalnog

15 O = odsutno

- = ispod normalnog

+ = iznad normalnog

-- = uveliko ispod normalnog

* Ovi nivoi se vraćaju na normalne nedjelju dana prije nestajanja kliničkih simptoma

20

Brojevi u zagradama pokazuju broj razmatranih pacijenata.

lako je opisana samo jedna hibridoma koja proizvodi jedno antitijelo protiv humanog timocitnog antigena, namjera je da ovaj izum obuhvati sva monoklonalna antitijela koja pokazuju gore opisane karakteristike. Određeno je da predmetno antitijelo OKT6 pripada podklasi IgG₁, koja je jedna od četiri podklase mišjeg IgG. Ove podklase imunog globulina G razlikuju se jedna od druge u takozvanim "fiksiranim" regijama, iako će tijelo za specifični antigen imati takozvanu "promjenjivu" regiju koja je funkcionalno identična bez obzira na činjenicu kojoj podklasi imunog globulina G pripada. To znači monoklonalno antitijelo, koje pokazuje karakteristiku, koja je ovdje opisana, može biti podklase IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, ili IgG₃ ili klasa IgM, IgA ili drugih poznatih Ig klasa. Razlike između ovih klasa ili podklasa neće utjecati na selektivnost reakcionog toka antitijela, ali mogu utjecati na daljnju reakciju antitijela sa drugim tvarima, kao što je (na primjer) komplement ili anti-mišja antitijela. Iako je predmetno antitijelo specifično IgG₁, smatra se da antitijela, koja imaju ovdje ilustrirani tok reaktivnosti, spadaju u opseg ovog izuma, bez obzira na to kojoj klasi ili podklasi imunog globulina pripadaju.

U ovaj izum su dalje uključeni postupci za dobivanje gore opisani monoklonalnih antitijela uz korištenje gore ilustrirane tehnike hibridoma. Iako je ovdje dat samo jedan primjer hibridome, smatra se da stručnjak verziran u ovoj oblasti može slijediti imunizaciju, fuziju i postupke selekcije, koji su ovdje dati, i dobije druge hibridome koje mogu proizvoditi

antitijela, koja imaju gore opisane karakteristike reaktivnosti. Pošto individualna hibridoma koja je dobivena iz poznate vrste mišje mielomske stanice iz stanica poznate vrste miša dalje ne može biti identificirana, osim upućivanjem na antitijelo, proizvedeno od strane ove hibridome, smatra se da su sve hibridome, koje proizvode antitijelo sa gore opisanim karakteristikama, uključene u opseg ovog izuma, kao i postupci za dobivanje ovog antitijela, uz korištenje spomenute hibridome.

Dalji aspekti ovog izuma su metode liječenja ili dijagnoze bolesti koje koriste monoklonalno antitijelo OKT6 ili neko drugo monoklonalno antitijelo, koje pokazuje gore dat mehanizam reaktivnosti. Predmetno antitijelo se može koristiti da se detektiraju i proučavaju intratimične diferencijacije kao što je sumirano na sl. 2. Nenormalnosti u stupnju II diferencijacije indiciraju s odstupanjem od oko 70% OKT6⁺ timocita. Osim toga, predmetno antitijelo može se koristiti za dijagnozu bolesnih stanja kao što je pokazano na tabeli 5. Ove tehnike se mogu koristiti uz primjenu samog OKT6 antitijela ili kombinaciji sa drugim antitijelima (npr. OKT3 - OKT10). Mehanizmi reaktivnosti sa panelom antitijela za T stanice i podvrste T stanica omogućit će precizniju detekciju nekih bolesnih stanja nego što je to bilo moguće primjenom ranijih metoda dijagnoze.

Liječenje bolesnih stanja (npr. malignih stanja kao što je stupanj II ALL), koja se manifestiraju kao višak OKT6⁺ stanica može se vršiti davanjem terapijski efektivne količine OKT6 antitijela individui koja treba ovakvo liječenje. Selektivnom reakcijom sa OKT6⁺ antigenom, efektivna količina OKT6 antitijela će sniziti višak OKT6⁺ stanica, čime se popravljaju (poboljšavaju) efekti ovog viška. U ovaj izum su uključene i dijagnostičke i terapijske smjese, koje sadrže efektivne količine OKT6 antitijela u smjesi sa dijagnostički odnosno farmaceutski prihvatljivim nosačima.

PATENTNI ZAHTJEVI

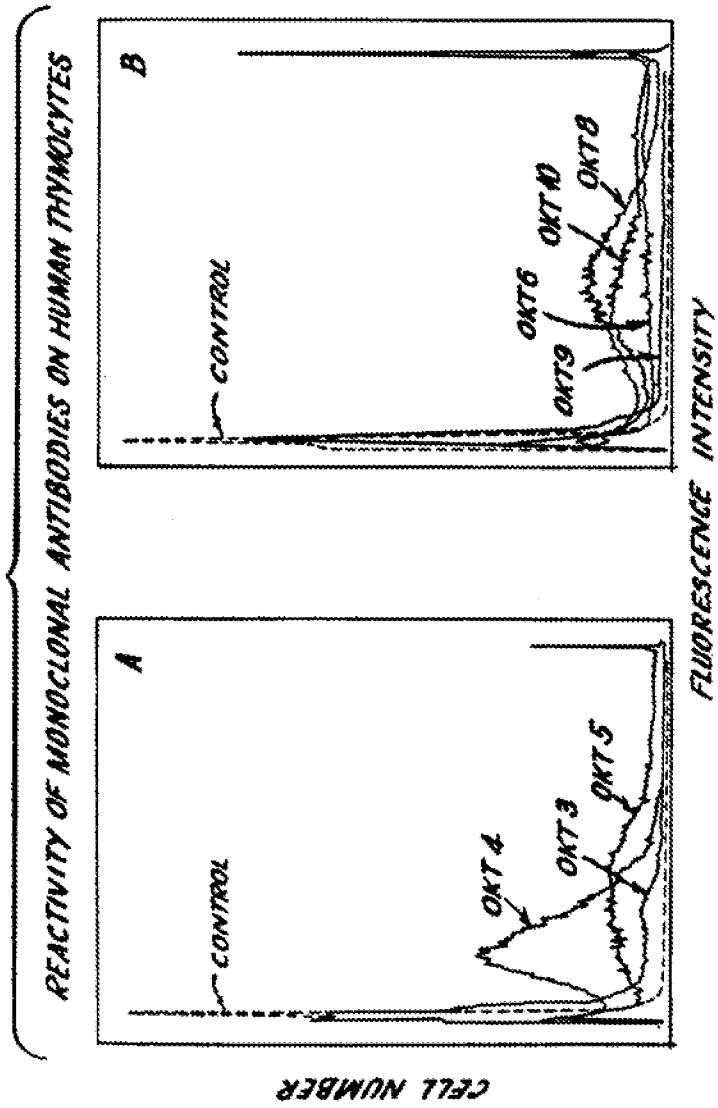
1. Mišje monoklonalno antitijelo, **naznačeno time**, da
 - (i) reagira s približno 70% normalnih humanih timocita, ali
 - (ii) ne reagira s nijednom od normalnih humanih perifernih stanica iz skupine koju čine
 - (iii) T stanice i nula stanice, B stanice i nula stanice; i
ne reagira s normalnim humanim stanicama koštane moždine.
2. Monoklonalno antitijelo prema zahtjevu 1, **naznačeno time**, da spada u razred IgG.
3. Monoklonalno antitijelo prema zahtjevu 1 ili zahtjevu 2, **naznačeno time**, da pokazuje oblik reaktivnosti prema normalnim humanim timocitima prikazan na slici 1.
4. Monoklonalno antitijelo prema bilo kojem zahtjevu od 1 do 3, **naznačeno time**, da pokazuje oblik reaktivnosti prema perifernim T stanicama i timocitima prikazan u tablici 2.
5. Monoklonalno antitijelo prema bilo kojem zahtjevu od 1 do 4, **naznačeno time**, da pokazuje oblik reaktivnosti prema T stanicama stupnja ALL prikazan u tablici 3.
6. Monoklonalno antitijelo prema bilo kojem zahtjevu od 1 do 5, **naznačeno time**, da definira populaciju T stanica (OKT6⁺) koja je niža od normalnih razina u primarnoj cirozi žuči, multiploj sklerozi i hiper IgE, viša od normalnih razina u akutnoj reakciji domaćina u smislu odbacivanja transplantanata, i potpuno odsutna kod mijastenije gravis, akutne infekcijske mononukleoze, svih stupnjeva Hodgkinsove bolesti i psorijaze.
7. Monoklonalno antitijelo prema bilo kojem zahtjevu od 1 do 6, **naznačeno time**, da je proizvedeno pomoću hibridoma nastalog fuzijom stanica iz linije mišjeg mijeloma i stanica slezene iz miša prethodno imuniziranog s humanim timocitima.
8. Monoklonalno antitijelo, **naznačeno time**, da je proizvedeno pomoću hibridoma ATCC CRL 8020 (OKT6).
9. Hibridom za proizvodnju monoklonskog antitijela prema bilo kojem zahtjevu od 1 do 7, **naznačen time**, da je dobiven fuzijom stanica slezene iz miša prethodno imuniziranog s humanim timocitima i stanica iz mišje mijelomske linije.
10. Hibridom, **naznačen time**, da je to ATCC CRL 8020.
11. Metoda za proizvodnju monoklonskog antitijela prema bilo kojem zahtjevu od 1 do 7, **naznačena time**, da obuhvaća sljedeće stupnjeve:
 - i) imunizaciju miša s humanim timocitima;
 - ii) vađenje slezene iz spomenutog miša i izradu suspenzije stanica slezene;
 - iii) spajanje spomenutih stanica slezene s mišjim mijelomskim stanicama u prisutnosti promotora fuzije;
 - iv) razrjeđivanje i uzgajanje fuzioniranih stanica u odvojenim jamicama u mediju koji ne podržava nefuzionirane stanice mijeloma;
 - v) ocjenjivanje supernatanta u svakoj jamici koja sadrži hibridom u pogledu prisutnosti antitijela koje ima svojstva navedena u bilo kojem zahtjevu od 1 do 7;
 - vi) odabir i kloniranje hibridoma koji proizvode željeno antitijelo; i
 - vii) skupljanje antitijela iz supernatanta iznad spomenutih klonova.

12. Metoda za proizvodnju mišjeg monoklonskog antitijela prema bilo kojem zahtjevu od 1 do 7, **naznačena time**, da obuhvaća slijedeće stupnjeve:
- i) imunizaciju miša s humanim timocitima;
 - ii) vađenje slezene iz spomenutog miša i izradu suspenzije stanica slezene;
 - 5 iii) spajanje stanica slezene s mišjim mijelomskim stanicama u prisutnosti promotora fuzije;
 - iv) razrjeđivanje i uzgajanje fuzioniranih stanica u odvojenim jamicama u mediju koji ne podržava nefuzionirane stanice mijeloma;
 - v) ocjenjivanje supernatanta u svakoj jamici koja sadrži hibridom u pogledu prisutnosti antitijela koje ima svojstva navedena u bilo kojem zahtjevu od 1 do 7;
 - 10 vi) odabir i kloniranje hibridoma koji proizvode željeno antitijelo;
 - vii) prijenos spomenutih klonova intraperitonealno u miša; i
 - viii) skupljanje malignog ascita ili seruma iz tog miša.
13. Metoda za proizvodnju monoklonskog antitijela, **naznačena time**, da uključuje uzgoj hibridoma ATCC CRL 8020 u prikladnom mediju i skupljanje antitijela iz supernatanta iznad tog hibridoma.
- 15 14. Metoda za proizvodnju monoklonskog antitijela, **naznačena time**, da uključuje ubrizgavanje hibridoma ATCC CRL 8020 u miša i dobivanje antitijela iz malignog ascita ili seruma iz tog miša.
15. Metoda detekcije nedostatka ili viška OKT6⁺ stanica u osobi, **naznačena time**, da uključuje reakciju T stanica ili timocitnog sastava dobivenog iz te osobe s dijagnostički učinkovitom količinom antitijela prema zahtjevu 6, ili zahtjevu 7 kad je u skladu sa zahtjevom 6 ili zahtjevom 8 i mjerenje postotka od ukupne populacije perifernih T stanica i timocita koja reagira s tim antitijelom.
- 20 16. Metoda prema zahtjevu 7, **naznačena time**, da se radi o suvišku T stanica ALL.
17. Monoklonsko antitijelo prema zahtjevu 6, ili zahtjevu 7 kad je u skladu sa zahtjevom 6 ili zahtjevom 8, **naznačeno time**, da se upotrebljava za liječenje suviška OKT6+ stanica u osobe kojoj je potrebno takvo liječenje.
- 25 18. Sastav, **naznačen time**, da osim dijagnostički prihvatljivog nosača u mješavini sadrži i monoklonsko antitijelo prema zahtjevu 6, ili zahtjevu 7 kad je u skladu sa zahtjevom 6 ili zahtjevom 8 i upotrebljava sa za detekciju nedostatka ili suviška OKT6+ stanica u sastavu T stanica ili astavu timocita.
19. Sastav, **naznačen time**, da osim farmaceutski prihvatljivog nosača sadrži u mješavini učinkovitu količinu monoklonskog antitijela prema zahtjevu 6, zahtjevu 7 kad je u skladu sa zahtjevom 6, ili zahtjevom 8, pri čemu je količina antitijela učinkovita za smanjenje ili odstranjivanje suviška OKT6+ stanica u osobi koja ima takav suvišak.
- 30 20. Metoda za proizvodnju sastava prema zahtjevu 18 ili zahtjevu 19, **naznačena time**, da obuhvaća miješanje monoklonskog antitijela prema zahtjevu 6, zahtjevu 7 kad je u skladu sa zahtjevom 6, ili zahtjevom 8 s dijagnostički ili farmaceutski prihvatljivim nosačem.

35 SAŽETAK

Niz hibridnih stanica za dobivanje monoklalnog antitijela za ljudski antigen pronađen je na otprilike 70% normalnih ljudskih timocita. Hibrid je stvoren spajanjem splenocita iz imuniziranih CAF₁ miševih s P3X63Ag8UI mieloma stanica. Dijagnostičke i terapijske upotrebe monoklalnog tijela su također opisane.

Sl. 1.



Sl. 2.

INTRATHYMIC DIFFERENTIATION IN MAN

