

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Patent beschränkt
aufrechterhalten nach
§ 12 Abs. 3 ErstrG

(12) **PATENTSCHRIFT**

(11) **DD 274 446 B5**

(51) Int. Cl.⁵: C 12 N 5/28

DEUTSCHES PATENTAMT

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Aufrechterhaltung kann Einspruch eingelegt werden

(21) Aktenzeichen:	(22) Anmeldetag:	(44) Veröff.-tag der DD-Patentschrift:	(45) Veröff.-tag der Aufrechterhaltung:
DDC 12 N / 318 477 1	29. 07. 88	20. 12. 89	31. 03. 94

(30) Unionspriorität:

(72) Erfinder:	Grunow, Roland, Dr. sc. med., 10409 Berlin, DE; Jahn, Sigbert, Dr. med., 13051 Berlin, DE
(73) Patentinhaber:	Medizinische Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin, Schumannstr. 20/21, 10117 Berlin, DE
(74) Vertreter:	Wehlan, Helmut, Dr. rer. nat., Oderstr. 21, 10247 Berlin

(54) **Verfahren zur Herstellung der Parentalzelllinie CB-Fu 2**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:

Baron, D. u. Hartlaub, U., Humane monoklonale Antikörper, Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart –
New York 1987, Tab. S. 24
James, K., Bell, G. T., J. Immunol. Meth., 100 (1987) 5–40, Tab. IV
Ichimori, Y. et al., Biochem., Biophys. Res. Com. 129 (1985) 26–33
US 4 634 666

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung einer Parentalzelllinie aus Human- und Mauszellen, dadurch gekennzeichnet, daß periphere Blutlymphozyten eines an Rheumatoidarthritis erkrankten Menschen mit der Mausmyelomzelllinie P3 × 63Ag8/653 fusioniert werden und die Heteromyelomzelllinie CB-Fu 2 (ZIM-0314) selektiert wird, die keine eigene Antikörperproduktion aufweist.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der Parentalzelllinie CB-Fu 2 (ZIM 0314), die zur Immortalisierung antikörperproduzierender B-Lymphozyten, insbesondere des Menschen, geeignet ist. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Medizin.

Die effektive Gewinnung humaner monoklonaler Antikörper (hmAk) gegen die verschiedensten Antigenspezifitäten ist weltweit bisher durch zwei Hauptprobleme erschwert (Engleman, E. G., S. K. Founty, J. Larrick u. A. Raubitschek: Human hybridomas and monoclonal antibodies. Plenum Press, New York 1985):

1. Die Verfügbarkeit einer Fusionszelllinie, die mit vergleichbarer Fusionsfrequenz wie im Maus × Maus-System in der Lage ist, humane B-Lymphozyten zu immortalisieren.

2. Die geringe Frequenz an Antigen-spezifischen B-Precursorzellen im peripheren Blut des Menschen.

Mit diesen beiden Problemen ist eine geringe Ausbeute an Hybridomzellklonen verbunden, die spezifische Antikörper gegen ein vorgegebenes Antigen produzieren. Damit ist auch mit großer Wahrscheinlichkeit der Umstand zu erklären, daß weltweit trotz intensiver Bemühungen die Herstellung hmAk gegen Strukturproteine des HIV durch somatische Zellhybridisierung bisher nur in wenigen Fällen beschrieben wurde (Bonapour, R., K. Rosenthal, L. Rabin, V. Sharma, L. Young, J. Fernandez, E. Engleman, G. Reyes und J. Lifson: Characterization and epitope mapping of a human monoclonal antibody reactive with the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. J. Immunol. 139 (1987), 4027-4033; McClure, J., EP 251 612). Es ist bereits bekannt, durch Fusion humaner B-Lymphozyten mit murinen Myelomzellen Zelllinien herzustellen, die keine eigene Antikörperproduktion aufweisen und als Parentalzelllinien für eine weitere Fusion mit humanen antikörperproduzierenden Zellen (z. B. EBV-transformierten B-Lymphozyten) zur stabileren Produktion humaner mAk zu verwenden (Baron, D., und U. Hartlaub: Humane monoklonale Antikörper, Theorie – Herstellung – Anwendung, Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart New York 1987, tabellarische Übersicht S. 24; US 4 634 666 (C 12 N 5/00); James, K., und G. T. Bell, J. Immunol. Meth. 100 (1987) 5-40, besonders Tabelle IV, S. 15).

Bekannt ist auch die Herstellung von Heteromyelomzellen durch Fusion humaner peripherer Blutlymphozyten mit Mausmyelomzellen der Zelllinie P3 × 63Ag8/653. Die erhaltene Zelllinie ist HAT-sensitiv und weist Resistenz gegenüber 8-Azaguanin auf (Ichimori, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Com 129 [1985] 26-33).

Die bisherigen Ergebnisse bei der Fusionierung von menschlichen Lymphozyten mit Mäuse-Myeloma waren nicht zufriedenstellend. So heißt es in der DT-OS 3616324:

„Die Fusion von menschlichen Lymphozyten mit Mäuse-Myeloma bringt Zellen mit den gleichen ausgezeichneten In-vitro-Charakteristika wie die Maus-Maus-Hybridomas hervor, jedoch mit dem großen Nachteil, daß solche Hybride eine inherente genetische Instabilität aufweisen. In diesem Zusammenhang ist es speziell nachteilig, daß sie das menschliche Chromosom, das die Information für die leichten Kappa-Ketten des Immunglobulin-Moleküls trägt, ausstoßen“ und an anderer Stelle (DT-OS 3301 249), daß bei dieser „Methode auch bei sorgfältigstem Klonen die Produktivität nicht erhalten werden kann“.

Die zitierten Literaturstellen zeigen kritisch das ungelöste Problem der Human-Hybridom-Technik auf: die niedrige Fusionsrate. Es ist das Ziel der Erfindung, der medizinischen Diagnostik eine Fusionszelllinie zur Verfügung zu stellen, die sich zur Immortalisierung antikörperproduzierender B-Lymphozyten eignet und die eine hohe Fusionsfrequenz aufweist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem sich eine hocheffektive Fusionszelllinie zur Immortalisierung von Lymphozyten, insbesondere von humanen B-Lymphozyten, herstellen läßt. Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß humane B-Lymphozyten von einer Patientin mit Rheumatoidarthritis mit Zellen der Maus-Myelomzelllinie P3 × 63Ag8/653 fusioniert wurden. Durch mehrfache Klonierungen wurde aus diesen Fusionen eine Reihe von Hybridzelllinien gewonnen, die keine eigene Antikörperproduktion aufwiesen. Die Zelllinien wurden in einem 8-Azaguanin-haltigen Zellkulturmedium hinsichtlich eines Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT)-Defektes selektiert. Von diesen Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT)-sensitiven Zelllinien wurden die fusionsgenen und Wachstumseigenschaften getestet. Auf der Grundlage dieser Parameter wurden die Eigenschaften der Zelllinien durch mehrfache Klonierung stabilisiert. Eine der so gewonnenen Heteromyelomzelllinien hat die Bezeichnung CB-Fu 2 (ZIM-0314) erhalten. Diese Human-Maus-Heterofusionszelllinie zeichnet sich überraschenderweise durch eine hohe Fusionsfrequenz und eine hohe Immortalisierungsrate von immunglobulinproduzierenden B-Lymphozyten aus. Mit dieser Zelllinie CB-Fu 2 können sowohl humane als auch B-Lymphozyten von anderen Spezies effektiv immortalisiert werden; dazu gehören auch Virus-transformierte, z. B. durch Epstein-Barr-Virus (EBV), humane B-Lymphozyten.

Das überraschend gute Ergebnis wird darauf zurückgeführt, daß als Quelle der B-Lymphozyten eine Patientin mit Rheumatoidarthritis gewählt wurde. Das heißt, daß diese Quelle gegenüber gesunden Probanden aktiviert war, was für die Heteromyelomzelllinie günstige Wachstumseigenschaften mit sich brachte.

Unter Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Zelllinie wurde eine Reihe von humanen monoklonalen Antikörpern (hmAk) gewonnen. Dazu gehören mAk gegen Strukturproteine des Human-Immunodeficiency-Virus (HIV) und gegen bakterielle Antigene.

Die neue Heteromyelomzelllinie CB-Fu 2 ist in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstituts für Molekularbiologie (ZIM) der Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin-Buch, unter der Nummer ZIM-0314 registriert. Sie zeichnet sich gegenüber bisher bekannten Fusionszelllinien (James, K., G. T. Bell, J. Immunol. Meth., 100 [1987] 5-40) durch

- eine hohe Fusionsfrequenz mit peripheren Blutlymphozyten
- eine hohe Stabilität der Hybridzelllinien
- eine hohe Antikörper-Produktionsrate der Hybridzelllinien aus.

Ausführungsbeispiele

1. Herstellung der Parentalzelllinie CB-Fu 2:

Periphere Blutlymphozyten von einer Patientin mit Rheumatoidarthritis wurden durch Zentrifugation im Dichtegradienten gewonnen. 5×10^7 mononukleäre Zellen wurden mit 10^7 Zellen der Maus-Myelomzelllinie P3 $\times$ 63Ag8/653 in serumfreiem Zellkulturmedium RPMI 1640 (Flow-Lab., BRD) gemeinsam sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment aufgelockert. Die Fusion wurde durch den Zusatz eines Gemisches aus 45% Polyethylenglykol (PEG 1500), 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 45% RPMI 1640 induziert. Nach dem langsamen Verdünnen des Fusionsmediums mit RPMI 1640 wurden die Zellen in 596-well-Zellkulturplatten überführt, so daß sich 10^5 mononukleäre Zellen/well ergaben. Nach Zugabe von HAT-Zellkulturmedium in der üblichen Konzentration wurden die Zellen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Nach ca. 2–3 Wochen konnten die heranwachsenden Klone hinsichtlich ihrer Antikörperproduktion getestet werden. Es wurden danach solche Kulturen ausgewählt und kloniert, die keine Antikörperproduktion aufwiesen. Aus den Klonierungen wurden die am schnellsten wachsenden Klone vergrößert und in ein Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 10% FKS und 20 µg/ml 8-Azaguanin aufgenommen und je nach Wachstum alterierend mit Medium mit und ohne 8-Azaguanin gefüttert. Zellkulturen mit stabilem Wachstum in 8-Azaguanin-haltigem Medium werden darin mehrfach kloniert. Aus diesen Klonierungen wurden wiederum die am schnellsten wachsenden Zellklone vergrößert. Eine der so entstandenen HAT-sensitiven Zelllinie wurde mit CB-Fu 2 bezeichnet.

2. Charakterisierung der Parentalzelllinie CB-Fu 2

Die stabilisierte Heteromyelomzelllinie CB-Fu 2 wird durch folgende Parameter charakterisiert:

2.1. Herkunft:

Heteromyelomzelllinie, die aus Fusion von humanen Lymphozyten mit der Maus-Myelomzelllinie P3 $\times$ 63Ag8/653 hervorgegangen ist.

2.2. Zellkulturmedium:

RPMI 1640 (oder ein anderes geeignetes Medium) supplementiert mit 5–10% FKS.

2.3. Immunglobulinproduktion:

Die Zelllinie CB-Fu 2 produziert und sezerniert selbst keine Immunglobuline bzw. deren Fragmente. Nach Fusion mit humanen B-Lymphozyten produzieren die Hybridoma zwischen 1 und 30 µg/ml Immunglobulin/24 h/5 $\times$ 10⁵ Zellen.

2.4. Verdopplungszeit:

In der logarithmischen Wachstumsphase beträgt die Verdopplungszeit 16–18 h.

2.5. Karyotyp:

Durch klassische G-Bänderung werden 75–80 Chromosomen pro Zellkern festgestellt. Der Anteil humaner DNA wurde durch Hybridisierung mit ³²P-markierten Plasmiden, welche humanspezifische Alu-Sequenzen enthielten, verifiziert.

2.6. Selektionsmarker:

CB-Fu 2 ist HAT-sensitiv und Quabain-resistent. Revertanten werden bisher nicht beobachtet. Die Zelllinie kann mit anderen Selektionsmarkern modifiziert werden, wie z. B. Transfektion von Resistenzgenen gegen Hygromycin oder Neomycin.

2.7. Klonierungsbedingungen:

Die Zellen CB-Fu 2 sowie die davon abstammenden Hybridoma können durch die Grenzverdünnungstechnik auf Peritonealmakrophagen der Maus kloniert werden.

2.8. Fusionskapazität:

Die Fusionsfrequenz, gemessen an der Anzahl wachsender Klone, beträgt mit peripheren Blutlymphozyten 10⁻⁴ bis 10⁻⁵ und 10⁻³ mit EBV-transformierten Zellen. 70 bis 100% der initialen Zellkulturen produzieren Immunglobulin bei einer Zelleinsaat von 10⁵/well.

Ähnliche Fusionsraten (10⁻⁴ bis 10⁻⁵) werden mit Milzzellen von der Maus und vom Menschen erzielt. Es können auch Lymphozyten aus anderen Organkompartimenten immortalisiert werden.

3. Herstellung spezifischer humaner monoklonaler Antikörper

Wie unter 1. beschrieben, werden periphere Blutlymphozyten gewonnen und z. B. 5×10^7 mononukleäre Zellen mit 1×10^7 CB-Fu 2-Zellen, wie angegeben, fusioniert. Die B-Lymphozyten können vorher auch mit EBV, wie folgt, transformiert und angereichert werden. $5 - 10 \times 10^6$ mononukleäre Zellen werden im Zellkulturüberstand der EBV-produzierenden Zelllinie B95/8 4 h bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen gewaschen und mit einer Dichte von 20–50 $\times$ 10³/ml unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 3–6 Wochen können die wachsenden Klone hinsichtlich der spezifischen Antikörperproduktion getestet und u. U. für die Fusion mit CB-Fu 2-Zellen verwendet werden. Beispielsweise kann so mit peripheren Blutlymphozyten von HIV-infizierten Probanden verfahren werden. 14–21 Tage nach Fusion können die wachsenden Klone mit Enzymimmunoassays (oder anderen geeigneten Verfahren) hinsichtlich der Immunglobulinproduktion und der Sezernierung spezifischer Antikörper, z. B. gegen HIV-Strukturproteine, getestet werden. Positive Zellkulturen werden bis zur sicheren Monoklonalität mit der Grenzverdünnungstechnik kloniert. Auf diese Weise wurden humane monoklonale Antikörper gegen das p25-Core-Protein (CB-hp25-1 bis -3) und das gp41-Transmembran-Protein (CB-hgp41-1 und -2) des HIV erzeugt. Die Spezifität der Antikörper wurde in Western-Blot- und Immunfluoreszenzuntersuchungen bestätigt. Die Antikörperproduzierenden Zelllinien zeigen eine derartige Stabilität, daß sie bis zur Maßstabsvergrößerung in einem 50-l-Bioreaktor vermehrt und zur Antikörperproduktion gezüchtet werden können. Die Hybridome werden als H-CB-hp25 und H-CB-hgp41 bezeichnet. Sie sind in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstituts für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin-Buch, unter folgenden Nummern registriert:

H-CB-hp25-1 als ZIM-0315

H-CB-hp25-2 als ZIM-0316

H-CB-hp25-3 als ZIM-0317

H-CB-hgp41-1 als ZIM-0318

H-CB-hgp41-2 als ZIM-0319.