

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 65263 B1

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/01 (2006.01)

C 12 N 15/02 (2006.01)

C 12 N 15/08 (2006.01)



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 105566

(22) Заявено на 06.06.2001

(24) Начало на действие  
на патента от: 08.12.1999

Приоритетни данни

(31) 09/209,920 (32) 10.12.1998 (33) US

(41) Публикувана заявка в  
бюлетин № 3 на 29.03.2002

(45) Отпечатано на 31.10.2007

(46) Публикувано в бюлетин № 10  
на 31.10.2007

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):

BAYER CORPORATION, 15205 PITTS-  
BURGH, 100 BAYER ROAD, PENNSYL-  
VANIA (US)

(72) Изобретател(и):

Myung-Sam Cho  
94564 Pinole, California (US)

(74) Представител по индустриална  
собственост:

Георги Цветанов Перев, 1124 София,  
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на РСТ заявка:

PCT/US1999/029332, 08.12.1999

(87) № и дата на РСТ публикация:

WO2000/034462, 15.06.2000

(54) ЧОВЕШКА ХИБРИДНА КЛЕТКА ГОСТОПРИЕМНИК ЗА ЕКСПРЕСИЯ НА ГЕНИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ

(57) Изобретението се отнася до хибридни клетки човек/човек, създадени чрез сливане на човешки ембрионални клетки от бъбрек (293S) и модифицирани клетки от Бъркитова лимфома (2B8). Слетите клетки са полезни като клетки гостоприемници за експресия на рекомбинантни гени от бозайници. Предимствата при използването на тези хибридни клонове от клетки на човешки бъбрек и В-клетки, наречени НКВs, за експресия на гени от бозайници са, че клетките са негативни за експресия на имуноглобулин и растат лесно в среда без плазмени белтъци (със или без добавка на рекомбинантен инсулин), като суспензионни култури във флакони чрез разклащане или във ферментор. Освен това клетките са много податливи за трансфекция с ДНК и секретират високи нива от хетероложни рекомбинантни белтъци, като моноклонални антитела, разтворим ICAM-1, rIL-4 и rFVIII.

22 претенции, 3 фигури

BG 65263 B1

# (54) ЧОВЕШКА ХИБРИДНА КЛЕТКА ГОСТО-ПРИЕМНИК ЗА ЕКСПРЕСИЯ НА ГЕНИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ

Сродни заявки: Заявката на Cho и Chan означена като MSB-7254 (US 09/209, 915), "Vectors Having Terminal Repeat Sequence of Epstein-Barr Virus" и заявката на Cho et al., означена като MSB-7255 (US 09/209, 916), "Expression system for factor VIII", са свързани със същата тема. И двете заявки са подадени на 10 декември, 1998 година.

## Област на техниката

Това изобретение се отнася най-общо до генно инженерни клетъчни линии от бозайници, за получаване на биологично активен белтък. По-специално, изобретението се отнася до човешки хибридни клетъчни клонове, получени от сливането на човешки ембрионални клетки от бъбрек (293S) и клетки от Бъркитова лимфома. Тези човешки хибридни клетки могат да се използват за получаване на хетероложни белтъци.

## Предшестващо състояние на техниката

До днес повечето терапевтични рекомбинантни белтъци са получени от бозайници, но не от човешки клетки. Някои примери са: Клетки от овариум на китайски хамстер (CHO) (dhfr-) (Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216-4220) с амплифициращ селективен маркер дихидрофолат редуктаза (Kaufman et al., 1982, Mol. Biol., 159: 601-621; Gasser et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6522-6526) използвани за получаване на терапевтичен рекомбинантен белтък.

Известни са различни терапевтични белтъци, получени по рекомбинантен път от клетки на бозайници, например рекомбинантен фактор VIII (rFVIII) (Kaufman et al., 1988, J. Biol. Chem., 263: 6352-6362), тъканен плазминогенен активатор (tPA) (US 4, 766, 075 to Goeddel et al., 1988), еритропоетин (EPO) (US 4, 703, 008 to Lin, 1987) и моноклонални антитела (mAbs) (US 4,816, 397 to Boss et al., 1989).

За получаване на rFVIII са използвани бъбречни клетки (BHK21) от новороден хамстер (BHK), след G418 селекция и метотрексат (MTX) амплификация на устойчиви G418 клетки (US 4,

965, 199 to Capon et al., 1990).

За получаване на човешки анти-TNF антитела по инженерен път (EHAT) са използвани миши миеломни клетки (NSO) (US 4, 816, 397 to Boss et al., 1989). От тази клетъчна линия обаче се получават белтъци, които имат специфичен миши въглехидратен строеж, които не са удачни за използване при човек.

Човешка клетъчна линия Namalwa (получена от Бъркитова лимфома) е използвана за получаване на алфа-интерферон от Wellcome Research Laboratory и за получаване на проурокиназа (Sato et al., 1996, Cytotechnology, 18: 167-185, 1996), тъканен-плазминогенен активатор (tPA) (Khan et al., 1995, Biochem. Soc. Trans, 23:S99), фактор стимулиращ образуването на гранулоцитно-макрофагилна колония (Okamoto et al., 1991, Arch. Biochem. Biophys., 286: 562-568), интерферони и лимфотоксин (Hosoi et al., 1991, Cytotechnology, 5: 17-34) и гранулоцитен колонио-стимулиращ фактор (Hosoi et al., 1991, Cytotechnology, 7: 25-32) от Tokyo Research Laboratories. Обаче тези клетки много трудно се трансфектират с ДНК.

Walls et al., (1989, Gene, 81: 139-149) съобщават за използването на dhfr/MTX коамплификационна стратегия, при експресията на функционален белтък С в човешки ембрионални клетки от бъбрек (293S клетки). Известно е, че клетките 293 (Stillman et al., 1985, Mol. Cell. Biol., 5: 2051-2060), образуват големи агрегати в суспензия, особено при висока концентрация на калций (> 100 microM), което улеснява голямата агрегация и ниската жизнеспособност на клетките (Peshwa et al., 1993, Biotech and Bioeng, 41: 179-187). Всички цитирани източници са включени тук в справката.

## Техническа същност на изобретението

Сега са създадени клонове от човешки хибридни клетки, които се трансфектират лесно чрез електропорация или положително заредени липозоми и които са адаптирани да растат лесно в суспензионна култура. Могат да се експресират хетероложни белтъци като се използват ниски нива (50-100 nM) на MTX амплификация в среда за човешки клетки. В допълнение, клетките се адаптират лесно за растеж в среда свободна от серум.

Тези клетки са продукт от сливането на човешки ембрионални клетки от бъбрек (293S) и клетки от Бъркитова лимфома. Накратко процедурата е представена на Фигура 1. Тези хибридни клонове, наречени НКВs, имат дефектен EBV-геном, получен от HH514-16, който е клетъчна линия, произлязла от клетки на Бъркитова лимфома, P3HR1 (Hinuma et al., 1967, J. Virol., 1: 1045-1051). Клетките P3HR1 притежават необезсмъртен EBV. HH514-16 е клон от P3HR1 (Hinuma et al., 1967, J. Virol., 1: 1045-1051), който притежава необезсмъртен EBV. HH514-16 са загубили het-ДНК, латентно-подписната ДНК, по време на клонирането (Rabson et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3660-3664). Следователно, EBV от НКВ клоновете е необезсмъртен вирус и съществува в латентно състояние.

НКВs са човешки хибридни клетки гостоприемници, подходящи за получаване на терапевтични белтъци по рекомбинантен път. Тези клетки гостоприемници са получени чрез хибридизация на различни родителски клетъчни линии, всяка една от които има различни предимства. Клетките гостоприемници, които притежават предимствата на всяка една от родителските клетъчни линии, са получени от клетки в резултат на хибридизацията.

Клетките гостоприемници могат по генно инженерен път да експресират високи нива на голям набор белтъци. Белтъците които могат да се получат чрез комбинираните клетки гостоприемници включват, но не се ограничават до, разтворим ICAM-1, рекомбинантен интерлевкин-4 (IL-4), tPA, EPO, rF VIII и BDD-FVIII (варианти на Фактор VIII с отстранен В-домен) и производни на тези белтъци. Фактор VIII има доменна организация от A-1-A2-B-A3-C1-C2 и се синтезира като едноверижен полипептид от 2351 аминокиселини, от които 19 аминокиселини са сигнални пептид, който се отстранява при транслокация в лумена на ендоплазматичния ретикулум. Трудно е да се постигнат високи нива на експресия на фактор VIII ( $> 0.2 \text{ pg/c/d}$ ) поради това, че фактор VIII е силно гликозилиран (Lind et al., 1995, Eur. J. Biochem., 232: 19-27; Kaufman et al., 1989, Mol. Cell Biol., 9: 1233-1242). В клетките на бозайници експресията на фактор VIII обикновено е с 2-3 порядъка пониска, отколкото тази, наблюдавана за други гени, като се използват сходни вектори и

подходи. Продуктивността на клетъчните линии за получаване на фактор VIII е в обхвата от 0.5 - 1 microU/c/d ( $0.1-0.2 \text{ pg/c/d}$ ).

Показано е, че В-доменът на фактор VIII не е задължителен за прокоагулантна активност. Различни групи съобщават, че ако се използват по-къси варианти на фактор VIII се подобрява експресията на фактор VIII в клетки на бозайници (Lind et al., 1995, Eur. J. Biochem., 232: 19-27; Tajima et al., 1990, Proc 6<sup>th</sup> Int. Symp. H. T., p. 51-63; US 5, 661, 008 to Altmstedt, 1997). Обаче, експресионното ниво на фактор VIII вариантите остава под 1 pg/c/d от стабилен клетъчен клон. Намерено е също така, че въпреки че не се експресира ендегенен имуноглобулин (Ig), експресията на рекомбинантен Ig от комбинираните клетки гостоприемници е висока. Белтъци получени от НКВ11 клетки имат специфичен за човека профил на гликозилиране. Следователно, клоновете са оптимални клетки гостоприемници за продукция на генно-инженерен Ig и други белтъци.

Използваният тук термин клетка, получила началото си от Бъркитова лимфома е клетка, която е Бъркитова лимфомна клетка получена от Бъркитова лимфомна клетка, получена от друга клетка с произход Бъркитова лимфома, или клетка като резултат от митотично делене на която и да е от по-горните. "Получена от" в този контекст се има предвид, че включва, но не се ограничава до нормално митотично клетъчно делене и процеси като трансфекция, клетъчно сливане или други генно-инженерни или клетъчно биологични техники използвани, за да променят клетките или за да се получат клетки с нови свойства. По сходен начин, клетка получила началото си от бъбрек на човешки ембрион е клетка, която е човешка ембрионална бъбречна клетка, получена от човешка ембрионална бъбречна клетка, получена от друга клетка с произход от бъбрек на човешки ембрион, или клетка като резултат от митотично делене на която и да е от по-горните. Също така клетка, получила началото си от 293S е клетка, която е 293S клетка, получена от 293S клетка, получена от друга клетка с произход 293S, или клетка като резултат от митотично делене на която и да е от по-горните. Също така клетка, получила началото си от 2B8 е клетка, която е 2B8 клетка, получена от 2B8 клетка, получена от друга клетка с произход 2B8, или клетка като резултат от митотично делене на която и

да е от по-горните. Хетероложен белтък е белтък, който се получава от комбинирана клетка.

### Описание на фигурите

Фигура 1 показва накратко процедурата за получаване на НКВ клетки.

Фигура 2 показва физични карти на експресионни вектори, споменати в текста. Всички плазмиди са конструирани на базата на pBR322 конструктор и съдържат *dhfr* експресионна единица. Всички гени кодиращи интересувашите ни белтъци са под регулацията на CMV ехансер/промотор (CMV e/p); 5' интрона (MIS или CIS) е позициониран в 5' края на гените, с изключение на BZLF1. Поли А сигналната област е означена като рА. И двата плазмиди рSH157 и рCIS25DTR съдържат секвенция от EBV-TR (402 нд).

Фигура 3 показва сравнение между клетъчни линии гостоприемници за генна експресия при анализ на краткотрайна трансфекция. Трансфекцията се извършва при едни и същи условия: един и същ брой клетки от 293S, 2B8 и НКВ11 се трансфектират с едно и също количество от плазмидни ДНКи, като се използва един и същ трансфектиращ агент. Тъканните културални течности се събират на 2 ден след трансфекцията. Нивата на белтъчната продукция се определят чрез ELISA (IgG и ICAM-1; измерени като ng белтък/10<sup>6</sup> клетки/2дена) и чрез Coatest® кит за анализ (rFVIII); измерени като милиединици/10<sup>7</sup> клетки/2дена).

#### Специфични варианти

#### Материали и методи

НН514-16 са предоставени от Dr. George Miller (Yale University). Клетките 293S са получени от Dr. Brad Zerler (Molecular Therapeutic Institute, West Heaven, CT). Клетките 293S са клетки 293 (ATCC CRL-1573), които са адаптирани да растат в суспензионна култура (Stillman et al., 1985, Mol. Cell Biol., 5: 2051-2060)

#### Плазмиди

Всички използвани експресионни вектори в този доклад са основно на базата на pBR322-плазмид с функциониращ *dhfr* генен експресионен сегмент. Физичните карти на експресионните вектори са описани във Фигура 2. Плазмидите рSH157 и рCISDTR имат също така секвенция от терминален повтор на Epstein-Barr вирус (EBV-TR). Виж патентната заявка на Cho и Chan,

означена като MSB-7254, "Terminal repeat sequence of Epstein-Barr virus enhances drug selection ratio", за EBV-TR секвенцията. Векторът рSH131, който е депозиран в American Type Culture Collection, ATCC 98879, може да се използва за създаване на експресионни вектори за избран белтък, както е описано от Cho и Chan (MSB-7254, *supra.*).

#### ELISA

За измерване на tICAM-1 секрецията, моноклонално анти тяло за ICAM-1, C925 (McClelland et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7993-7997) се адсорбира върху облодънни микротитърни плати. Платата се блокират чрез третиране с разтвор на солеви фосфатен буфер (PBS), съдържащ 1 % говежди серумен албумин (BSA), а след това се инкубират с проби, съдържащи tICAM-1. След това платата се измиват с буфер за промиване (PBS плюс 0.005 % Tween 20) и се инкубират с биотинилиран C78.5, второ моноклонално анти тяло за различен епитоп върху tICAM-1 (McClelland et al., 1991, *supra.*). След измиване платата се инкубират с HRP-стрептавидин. След това платата се измиват с буфер за промиване, реагират с тетраметил бензидин (ТМВ) и реакцията се спира с 1N HCl. Концентрацията на tICAM-1 се определя чрез отчитане на OD при 450/570 nm и се сравнява със стандартната крива на пречистен tICAM-1.

За измерване на секрецията на имуноглобулин (Ig), за покриване на платото се използва анти-Ig анти тяло, а за детекция се използва биотинилирано анти-Ig анти тяло. Като стандарт се използва известна концентрация от Ig молекула. С други думи методът е същият.

За измерване на секрецията на интерлевкин-4 (IL-4), се използва анти-IL-4 анти тяло за покриване на платото, а за детекция се използва биотинилирано анти-IL-4 анти тяло. Като стандарт се използва пречистена IL-4 молекула.

Анализ за измерване на rFVIII секрецията

Молекулата rFVIII се определя количествено с реагенти от Coatest® VIII:C/4 кит (Chromogenix, Molndal, Sweden). US стандартен анти-хемофилен фактор (фактор VIII) известен като MEGA 1 (Office of Biologies Research and Review, Bethesda, MD) е използван като стандарт за измерване на EIA/RIA A/2 плата

(Corning, Corning, NY), предварително нагрят до 37°C върху Select Heat Blocks (VWR Scientific, San Francisco, CA). Фактор IXa, фактор X, фосфолипид и CaCl<sub>2</sub> се добавят към всяка проба и се инкубират за 10 min за активиране на фактор X. След това се добавя хромогенен субстрат (S2222) и се инкубира за 10 min, за да освободи хромогенната група, pNA. Тази реакция се спира чрез добавяне на 50 % оцетна киселина. След това се измерва колориметричната абсорбция при 405/450 nm със SPECTRAmax® 250 спектрофотометърно микротитърно устройство (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) и данните се изчисляват чрез SOFTmax® PRO software, доставен от Molecular Devices.

Получаване на НАТ-чувствителна и G418-устойчива Бъркитова лимфомна клетъчна линия

За получаване на НАТ-чувствителни клетки са създадени дефицитни на хипоксантин-гуанин фосфорибозил трансфераза (HGPRT) клетъчни линии (Szybalska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026-2034, 1962; Littlefield, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 50: 568-576, 1963), чрез стандартен протокол, описан от Siadak et al. (US 4, 834, 975, 1989).

НН514-516 клетки (получени от Dr. G. Miller, Yale University), които са свободни от EBV het-ДНК (Rabson et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3660-3664), се третират с 300 microg/ml етилов естер на метансулфоновата киселина (MSE) (Sigma, St. Louis, MO) в RPMI-1640 суспензионна среда (Life Science, Gaithersburg, MD), допълнена с 15 % фетален говежди серум (FBS) (Hyclone, Logan, UT) за 24 h. След измиване на клетките със среда, клетките се поставят в среда, съдържаща 6-тиогуанин (6TG) (Sigma) (5 microg/ml), за да се отберат HGPRT- негативни клетки. Концентрацията на 6TG се увеличаваше от 5 microg/ml до 30 microg/ml по време на шестмесечния период на селекция. След това клетките се анализират за чувствителността им към НАТ-съдържаща среда. При клониране чрез крайно разреждане са получени клонове от отделни клетки (SCCs) (1 клетка на ямка в 96-ямкови плата) от НАТ-чувствителна популация A5. Един от SCCs, A5/1D7 е трансфектиран с pSV2neo, който има нео ген под контрола на SV40 промотор в pBR вектор, за получаване на G418-устойчиви клетки. Един от G418 (1.5 mg/ml) устойчиви SCCs, означен като

2B8 (депозирани в American Type Culture Collection, No. CRL-12569) е използван за сливане.

## Примери за изпълнение на изобретението

### Пример 1.

Клетъчно сливане и получаване на клонове от отделни клетки

Първоначално клетъчното сливане се извършваше съгласно метода за сливане с полиетилен гликол (PEG), описан от Kennett (1979, Meth Enzymol., 58: 5-359). Пет милиона от 293S и от 2B8 клетки в логаритмична фаза на растеж се измиват с PBS без Ca<sup>++</sup> и Mg<sup>++</sup> (Life Technologies, Rockville, MD) и се поставят в 1 ямка от 6-ямково плато, предварително третирано с фъстъчен аглутинин (Sigma) (5 microg/ml). 6-ямковите плата натоварени с клетките се центрофугират при 400 g за 6 min в Beckman J-6M/E центрофуга (Beckman, Palo Alto, CA). След отстраняване на PBS от ямката, клетките се третират с 2 ml от 40 % (w/v) PEG (Sigma) за една минута. Като контрола, една ямка не се третира с PEG. Клетките се измиват три пъти с 5 ml PBS, съдържащ 5 % DMSO, последвано от трикратно измиване с PBS. Клетките се инкубират в свежа среда, допълнена с 15 % FBS за 25 min. Клетките се поставят в 96-ямкови плата (1.2 x 10<sup>6</sup> клетки на плато), като се използва свежа среда, съдържаща G418 (1 mg/ml) и НАТ (Life Technology) с добавен 15% FBS. Клетките се подхранват два пъти седмично със селективна среда. В този пример, като начална селекция, 293S клетките придобиват желаната характеристика да не са чувствителни към среда съдържаща НАТ и по подобен начин, 2B8 клетките, проявяват желаната характеристика да са устойчиви към G418.

Докато слетите клетки растат при селективни условия, смесените клетки не могат да растат при същите условия. Три седмици след селекцията, изходните популации се прехвърлят в големи по размер съдове. За получаване на SCCs, стабилно растящите 20 изходни популации се смесват и се подлагат на клониране чрез крайно разреждане (една клетка на ямка), чрез използване на селективна среда. Избират се деветнайсет SCCs от 15 x 96-ямкови плата след внимателен контрол на отделните клонове под микроскоп. Получените SCCs след експеримента на сливане се означават като НКВ клетки

(Хибридни клетки от човешки бъбрек- и В-клетки). Седем SCCs са избрани за изследване на трансфекцията. По-нататък тези седем SCCs се анализират за стабилна продукция на различни белтъци. Един от седемте SCCs, НКВ11, е избран като предпочитан клетъчен гостоприемник от бозайник за получаване на хетероложни белтъци. Виж Фигура 1 за кратко описание на процедурата.

#### Пример 2.

#### Характеризиране на НКВ клоновете

Въпреки че всички хибридни клетки са избрани при селективни условия, хибридният статус се потвърждава чрез преброяване на хромозомния набор в клетките. В действителност всички НКВs показват модален хромозомен набор от 90-110. Този хромозомен брой е сходен със су-

мата от модалния хромозомен набор на 293S и 2B8 (съответно 64 и 47, съгласно данните от ATCC). 293S (Stillman et al., 1985, Mol. Cell Biol., 5: 2051-2060) е суспензионно адаптирана 293 (ATCC CRL-1573).

Всички хибридни клетъчни клонове се анализират за експресия на ендогенен Ig (mu и kappa), чрез директна имунофлуоресценция, като се използват клетки фиксирани с метанол, за определяне на клетъчните клонове, секретиращи ендогенен Ig. В повторени експерименти за дълъг период от време, въз основа на имунофлуоресцентния тест се наблюдава, че експресията на тези клетки е негативна за mu и kappa-вериги (Таблица 1) и ELISA (данните не са показани).

**Таблица 1. Детекция на Ig-генна експресия**

| Клетки | Генна експресия   |                     |
|--------|-------------------|---------------------|
|        | Тежка верига (mu) | Лека верига (kappa) |
| 293S   | Негативна         | Негативна           |
| 2B8    | Позитивна         | Позитивна           |
| НКВ    | Негативна         | Негативна           |

Таблица 1 показва резултатите наблюдавани след имунофлуоресцентния анализ на три типа клетки. Клетките се ресуспендират в PBS и се нанасят като смир върху предметно стъкло. След изсъхване на клетките, предметните стъкла се фиксират в охладен (-20°C) метанол за 5 min. Клетките се оцветяват с FITC-анти човешки kappa и анти човешки mu вериги (разреждане 1:20) (Zymed Laboratories, Inc., So. San Francisco, CA) във влажна камера, при 37°C за 45 min. След изплакване на предметните стъкла с PBS за 10 min, препаратите се покриват с покривни стъкла, като се използва PBS/Глицерол (1:1). Клетките се наблюдават под флуоресцентен микроскоп (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

Чрез FACS анализ на НКВ клетки е потвърден специфичният за човек модел на свързване на сialова киселина, алфа(2-6) сialил-трансфераза, като се използва FITC конюгиран

Sambucus nigra лектин (SNA) (Sigma, St. Louis, MO). Белтъкът, секретирал от НКВ клетките (клон 1G2), показва алфа(2-3) и алфа(2-6) свързване на сialова киселина от анализа на гликозилиране, чрез метода на олигозахариден fingerprinting (данните не са показани). Това наблюдение показва, че клетките НКВ, получени от сливането на 293S и 2B8 клетки, поддържат специфичните за човек ензими за гликозилиране.

За да се анализира дали тези хибридни клетки притежават способността да експресират чужди гени, клетките се трансфектират с експресионни вектори за ICAM-1 и IgG (анти-TNF анти тяло). За да се анализира секрецията на IgG, НКВ клетките ( $5 \times 10^6$  клетки) се трансфектират чрез електропорация с 10 microg плазмидна ДНК, осигуряваща функционална експресия на тежки (gamma) и леки (kappa) вериги. За да се анализират нивата на секреция на разтворим

ICAM-1, НКВ клетките ( $5 \times 10^6$  клетки) се трансфектират чрез електропорация с 10  $\mu$ g плазмидна ДНК, осигуряваща функционална експресия на разтворим ICAM-1. Нивата на секреция се определят чрез ELISA за IgG или ICAM-1. Всичките 19 SCCs секретират относително високи нива на ICAM-1 (100-500 ng/ml/2d) и IgG (30-200 ng/ml/2d) при анализа на краткотрайна трансфекция (Таблица 2). Тези данни показват, че хибридните клетки поддържат експресията на трансфектираните Ig гени, въпреки че генната ек-

спресия на ендегенен Ig е потисната.

Epstein Barr вирусът (EBV) съществува като епизоми в 2B8 клетки. Всичките SCCs са позитивни за експресия на EBNA-1 (данните не са посочени), което показва, че те са позитивни за EBV. Обаче не е известно, дали пълният EBV геном продължава да съществува в хибридните клетки. Следователно, статусът на EBV генома в хибридните клетки се анализира чрез трансфектиране на клетки с EBV геномния фрагмент BZLF1, латентно потиснат trans-активиращ ген.

**Таблица 2. Анализ на краткотрайна трансфекция за секрецията на IgG и разтворим ICAM от НКВ клонове, които са получени скоро след процеса на клониране. Стойностите са нива на секреция на белтък (ng/ml/2d)**

| Клон НКВ | IgG  | Разтворим ICAM-1 |
|----------|------|------------------|
| 1        | ~150 | ~500             |
| 2        | ~30  | ~30              |
| 3        | ~20  | ~50              |
| 4        | ~80  | ~200             |
| 5        | ~100 | ~500             |
| 6        | ~50  | ~300             |
| 7        | ~40  | ~200             |
| 8        | ~30  | Nd               |
| 9        | ~80  | Nd               |
| 10       | ~80  | ~100             |
| 11       | ~200 | Nd               |
| 12       | ~100 | Nd               |
| 13       | ~80  | ~150             |
| 14       | ~80  | Nd               |
| 15       | ~30  | ~200             |
| 16       | ~80  | ~200             |
| 17       | ~160 | ~500             |
| 18       | ~80  | ~200             |
| 19       | ~80  | ~100             |

Nd = не е направен

НКВ клетки ( $5 \times 10^6$  клетки) се трансфектират с 10  $\mu$ g плазмидна ДНК (pSH121), осигуряваща функционална експресия на BZLF1. Откриването на EBV капсиден антиген (EBV-VCA) се осъществява чрез индиректна имунофлуоресценция, като се използва човешки серум, съдържащ анти EBV-VCA титър и FITC конюгиран анти-човешки IgG. Техническите детайли на имунофлуоресцентния тест са описани

по-горе. Както е показано на Таблица 3, mock трансфектираните клетки са негативни за експресия на EBV капсиден антиген (EBV-VCA), което показва, че те са негативни по отношение на репликацията на EBV. Обаче, малък процент от трансфектираните клетки са позитивни за антигенната експресия. Тези данни показват, че хибридните клетки, съдържат EBV геном в неговата латентна форма.

**Таблица 3. Индукция на EBV репликация чрез трансфекция с BZLF1**

| Клон НКВ | Експресия на вирусен капсиден антиген (%) |        |
|----------|-------------------------------------------|--------|
|          | Mock Трансфекция                          | BZLF1  |
| НКВ1     | Негативна                                 | 0.20 % |
| НКВ5     | Негативна                                 | 1-2 %  |
| НКВ7     | Негативна                                 | 0.20 % |
| НКВ11    | Негативна                                 | 0.20 % |
| НКВ13    | Негативна                                 | 0.50 % |
| НКВ17    | Негативна                                 | 0.20 % |
| НКВ19    | Негативна                                 | 1-2 %  |

Хибридните клетки се адаптират към среда свободна от серум чрез периодично двукратно намаляване на FBS във флаконите върху клатачка. След две седмици, клетките растат в среда без FBS. Клетките растат като малки агрегати във флакони на клатачка. За разлика от 293S клетки, хибридните клетки се адаптират лесно за растеж в суспензионна култура без серум. Хибридните клетки в среда свободна от серум и албумин, с добавка на трансферин и инсулин могат да се поддържат за период по-голям от една година в суспензионна култура, като флаконите се поддържат върху клатачка.

За да се сравнят нивата на секреция на трансфектираните генни продукти, един от клоновете, НКВ11 и родителските клетки 293S и 2B8, се трансфектират с pSM98 (разтворим ICAM-1),

pSH125 (анти-TNF IgG) и pCISF8 (rFVIII). Както е показано на Фигура 3, нивата на секреция на ICAM-1 и на IgG са много по-високи (приблизително 10 пъти) в НКВ11 клетки, отколкото в 293S клетки. Не се откриваха нива на секреция на двата белтъка в 2B8. Нивата на секреция на rFVIII в НКВ11 клетки са сходни с тези на 293S клетки. Тези данни показват, че ефективността на трансфекция на НКВ11 клетки е много по-добра, отколкото на родителските клетки.

#### Пример 3.

Получаване на стабилни НКВ клонове секретиращи хетероложни белтъци

Анализирант се хибридни клонове за стабилна експресия на белтъци в генно амплифицираща се система (dhfr/MTX). Най-напред

клетките се трансфектират с подходящ експресионен вектор и след това трансфектираните клетки (обикновено  $10^6$  клетки на 96-ямково плато) се поставят и избират/амплифицират в селективна среда, в която липсва хипоксантин и тимидин, но са добавени FBS и MTX (50 nM). След първото скриниране на платата, се избират клетки от ямките с най-висока секреция и се прехвърлят в 6-ямкови плата. По-нататък клетките от 6-ямковите плата се амплифицират при увеличаваща се концентрация на MTX (100, 200 и 400 nM) в средата. След това, изходните популации от 6-ямковите плата се скринират, за да се получи най-добрата популация. По възможност тези популации се използват за клониране на получе-

ните от отделни клетки клонове. Както е показано на Таблица 4, клетките НКВ11 са най-добри за получаване на високи нива от хетероложни човешки белтъци. За получаване на ICAM-1, Ig и IL-4 производни, клетките НКВ 11 са еднакво добри, както и CHO клетките (данните не са показани). Обаче клоновете НКВ растат по-бързо, отколкото CHO клонове и могат да се адаптират по-лесно за растеж в суспензионна култура и в условия без серум. В случай на получаване на BDD-FVIII, клоновете НКВ 11 показват десетократно по-голяма продуктивност, отколкото CHO клоновете. Горните резултати показват, че клетките НКВ 11 са оптимална човешка клетка гостоприемник, полезна за експресията на човешки терапевтични белтъци.

**Таблица 4. Хетероложни белтъци получени от НКВ клонове**

| Белтък    | Клетка<br>гостоприемник | MTX<br>Амплификация | Специфична<br>Продуктивност    |
|-----------|-------------------------|---------------------|--------------------------------|
| ICAM-1    | НКВ11                   | 100 nM              | 10 pg/c/d <sup>1)</sup>        |
| Ig        | НКВ13                   | 50 nM               | 12 pg/c/d                      |
| BDD-FVIII | НКВ11                   | 400 nM              | 5-10 $\mu$ U/c/d <sup>2)</sup> |
| IL-4SA    | НКВ11                   | 100 nM              | 5 pg/c/d <sup>3)</sup>         |

1) Нивото на продукция на ICAM-1 от НКВ клонове е сходно с това на 293S клетки. Клон НКВ секретиращ ICAM се адаптира по-лесно към суспензионна култура, докато клонове 293S се адаптират много трудно към суспензионна култура.

2) Нивото на секреция на BDD-FVIII е около 10 пъти по-високо, в сравнение с това на клоновете, получени от CHO клетки, трансфектирани със същия експресионен вектор.

3) Ако се използват НКВ11 е възможно получаване на количество 1 g от IL-4SA (T13D/R121E) 6 месеца след трансфекция, докато това отнема няколко месеца повече, ако се използват CHO клетки в експерименти проведени по едно и също време, като се използва същия експресионен вектор и сходен метод.

Клетъчните линии, получени от по-горе описаният метод включват: 1) клонове, секретир

ращи разтворим ICAM-1 (10 pg/клетка/ден), получени от НКВ11 клетки, трансфектирани с pSM98, след амплификация в 100 nM MTX, 2) клонове от отделни клетки, секретирани (12 pg/клетка/ден) моноклонално анти тяло (анти-TNF), получени от НКВ13, трансфектирани с pSS125, след амплификация в 50 nM MTX и клониране чрез крайно разреждане без MTX, 3) клонове от отделни клетки, секретирани (5-10 microU/c/d, в условия на среда без серум) скъсен rFVIII (BDD-FVIII), получени от НКВ11 клетки, трансфектирани с pCIS25DTR, след амплификация (400 nM MTX) и клониране чрез крайно разреждане без MTX, и 4) клонове, секретирани (5 pg/c/d) IL-4 производно (IL-4 селективен агонист, IL-4SA; с мутация на аминокиселините на две места, T13D и R121E), получени от НКВ11, трансфектирани с pSH157, след MTX амплификация. Секретиращият IL-4SA НКВ клон,

1G2 е използван за относително бърза продукция на малки количества белтък (количество грам). На Фигура 2 е представена физичната карта на експресионните вектори, споменати по-горе.

#### Обсъждане

Описаните тук хибридни човешки клетъчни линии показват желаните характеристики, притежавани от техните родителски клетъчни линии. Клетъчните линии НКВ, които са получени от сливането на човешки ембрионални клетки от бъбрек (или клетки, получени от човешки ембрионални бъбречни клетки) с клетки от Бъркитова лимфома (или клетки, получени от Бъркитови лимфомни клетки), са полезни за създаване на клетъчни линии за експресия на хетероложни белтъци.

Първоначалната цел за създаване на хибридни клетъчни линии от 293S и 2B8 беше да се разреши проблема с агрегацията на 293S клетки, които имат способността да се групират, когато растат в суспензионна култура (една нежелана характеристика). Клетките НКВ, които са създадени вследствие на хибридизационен метод, растат като монослой, когато се култивират в Т-флакони. Обаче, тези клетки растат като суспензионни клетки (не образуват големи агрегати), когато се култивират като суспензионна култура. НКВ клетките са много удобни за работа, лесно се трансфектират и ефективността на трансфекция е много по-висока, отколкото при 293S клетки.

Въпреки че в повечето случаи трансформацията или хибридизацията са необходими за получаване на стабилна клетъчна линия, те могат да доведат до промени в профила на гликозилиране (Yamashita, 1989, J. Biol. Chem., 264: 2415-2423), като е намерено, че НКВ11, която е соматична хибридна клетъчна линия има типичните за човек ензими за гликозилиране, например алфа (2-3) и алфа (2-6) сиалил трансферази. Освен това, белтъци получени от трансфектирани НКВ клетки имат нормалния за човек модел на гликозилиране на алфа (2-3) и алфа (2-6) връзки със сиалова киселина.

Накратко, НКВ са хибридни човешки клетки, притежаващи желани характеристики от всяка от родителските клетъчни линии; главно, растат лесно в суспензионна култура без агрегация (което се наблюдава при 2B8 клетки), лесни са за трансфекция и имат необходимите характе-

ристики за секреция (което се наблюдава при 293S клетки). Предпочитаната хибридна човешка клетъчна линия, НКВ11, е негативна за експресия на имуноглобулинов ген, както и 293S клетките. Тази отличителна черта е предимство в случаите когато е желателно по рекомбинантен път да се получат моноклонални антитела от човешки клетки. Откритието, че сливането на човешки клетки води до клетки, притежаващи полезни характеристики, дава надежди за бъдещи изследвания със сливане на клетки, чрез използване на 293S и други клетъчни линии с В-клетъчен произход, например Namalwa и 6F11, за получаване на нови комбинации от отличителни характеристики в хибридните клетки, чрез сливане на различни родителски клетъчни линии.

По-горните примери имат за цел да илюстрират изобретението като се предполага, че специалистите в областта могат да използват и други варианти. Подразбира се съответно, че обхватът на изобретението трябва да бъде ограничен само от претенциите по-долу.

#### Патентни претенции

1. Клетка получена от сливането на клетка, водеща началото си от бъбрек на човешки ембрион с клетка, произлязла от Бъркитова лимфома.

2. Клетка, съгласно претенция 1, характеризира се с това, че клетката водеща началото си от бъбрек на човешки ембрион е клетка с произход от 293.

3. Клетка, съгласно претенция 1, характеризира се с това, че клетката водеща началото си от бъбрек на човешки ембрион е клетка с произход от 293S.

4. Клетка, съгласно претенция 3, характеризира се с това, че клетката водеща началото си от Бъркитова лимфома е 2B8 клетка (ATCC депозирана под номер: CRL-12569).

5. Клетка, съгласно претенция 1, която експресира хетероложен белтък.

6. Клетка, съгласно претенция 5, характеризира се с това, че хетероложният белтък е избран от групата, състояща се от FVIII, BDD-FVIII, моноклонално антитяло, анти-TNF антитяло, rIL-4, tPA и EPO.

7. Клетъчна линия означена НКВ11 (ATCC депозирана под номер: CRL-12568).

8. Клетъчна линия експресираща хетеро-  
ложен белтък, като клетъчната линия е получена  
от клетъчна линия, означена като НКВ11 (АТСС  
депозирана под номер: CRL-12568).

9. Клетъчна линия съгласно претенция 8, 5  
характеризираща се с това, че белтъкът е ICAM-1.

10. Клетъчна линия съгласно претенция 8,  
характеризираща се с това, че белтъкът е BDD-  
FVIII.

11. Клетъчна линия съгласно претенция 8, 10  
характеризираща се с това, че белтъкът е мо-  
ноклонално анти тяло.

12. Клетъчна линия съгласно претенция 11,  
характеризираща се с това, че моноклоналното  
анти тяло е анти-TNF.

13. Клетъчна линия съгласно претенция 8,  
характеризираща се с това, че белтъкът е  $\alpha$ IL-4.

14. Клетъчна линия съгласно претенция 8,  
характеризираща се с това, че белтъкът е FVII1.

15. Клетъчна линия съгласно претенция 8, 20  
характеризираща се с това, че белтъкът е tPA.

16. Клетъчна линия съгласно Претенция 8,  
характеризираща се с това, че белтъкът е EPO.

17. Клетъчна линия съгласно претенция 8, 25  
характеризираща се с това, че белтъкът е IL-4SA  
(T13D/R121E), посочената клетъчна линия е оз-  
начена като 1G2 (АТСС депозирана под номер  
PTA-87).

18. Клетъчна линия съгласно претенция 8, 30  
характеризираща се с това, че белтъкът е човеш-  
ки протеин, притежаващ профил на гликозили-  
ране типичен за човек.

19. Метод за получаване на хибридни чо-  
вешки клетки, полезни за експресия на хетеро-  
ложен белтък, характеризиращ се с това, че  
включва следните етапи:

а) получаване на клетки, водещи начало-  
то си от бъбрек на човешки ембрион, притежа-  
ващи първата желана характеристика,

б) получаване на клетки, водещи начало-  
то си от човешка Бъркитова лимфома, притежа-  
ващи втората желана характеристика,

в) осъществяване на контакт между клет-  
ките от етап а) с клетките от етап б) при условия,  
позволяващи да се осъществи клетъчно сливане,

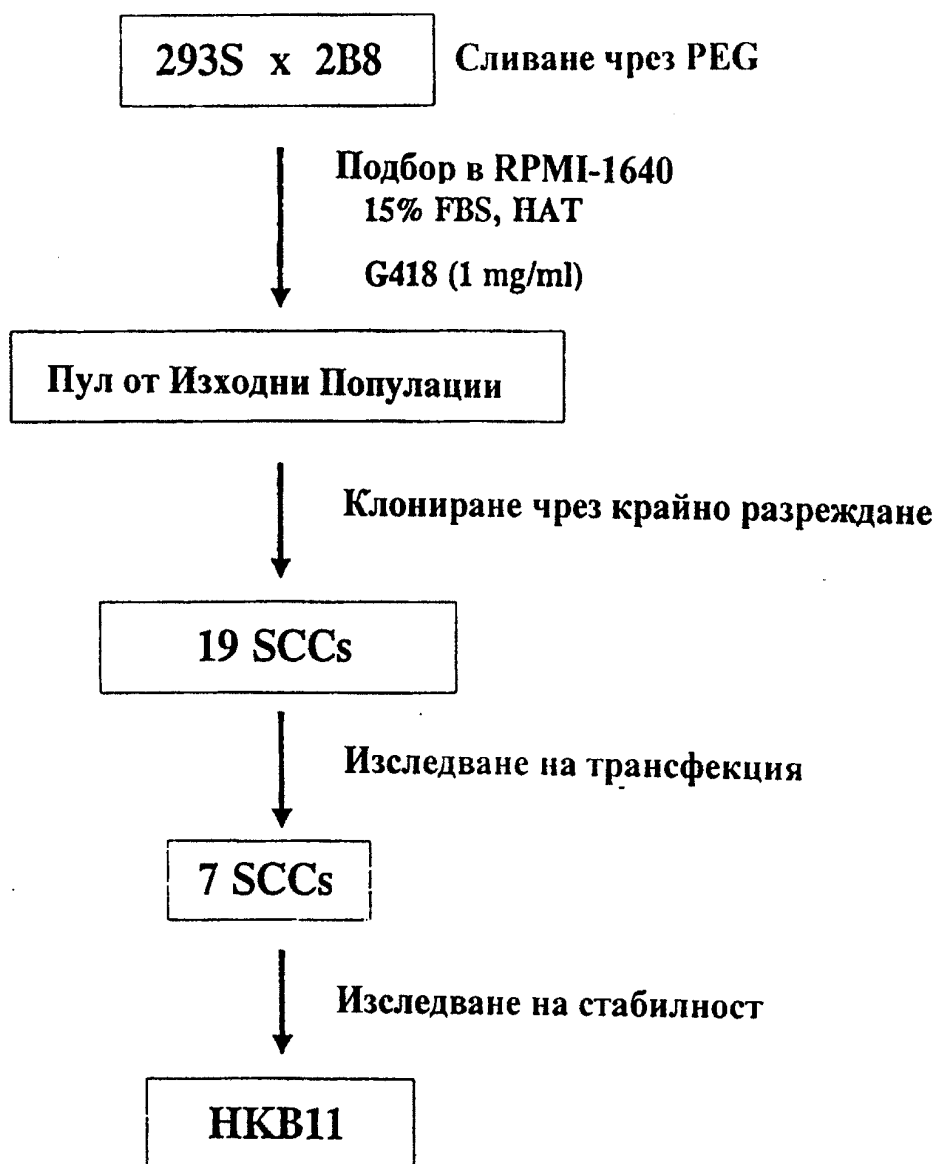
г) скриниране на клетките, получени от  
етап в) за откриване на клетки, които проявяват  
поне една желана характеристика на всяка от  
клетките от етапи а) и б).

20. Методът съгласно претенция 19, ха-  
рактеризиращ се с това, че клетките водещи на-  
чалото си от бъбрек на човешки ембрион са  
клетки, с произход от 293.

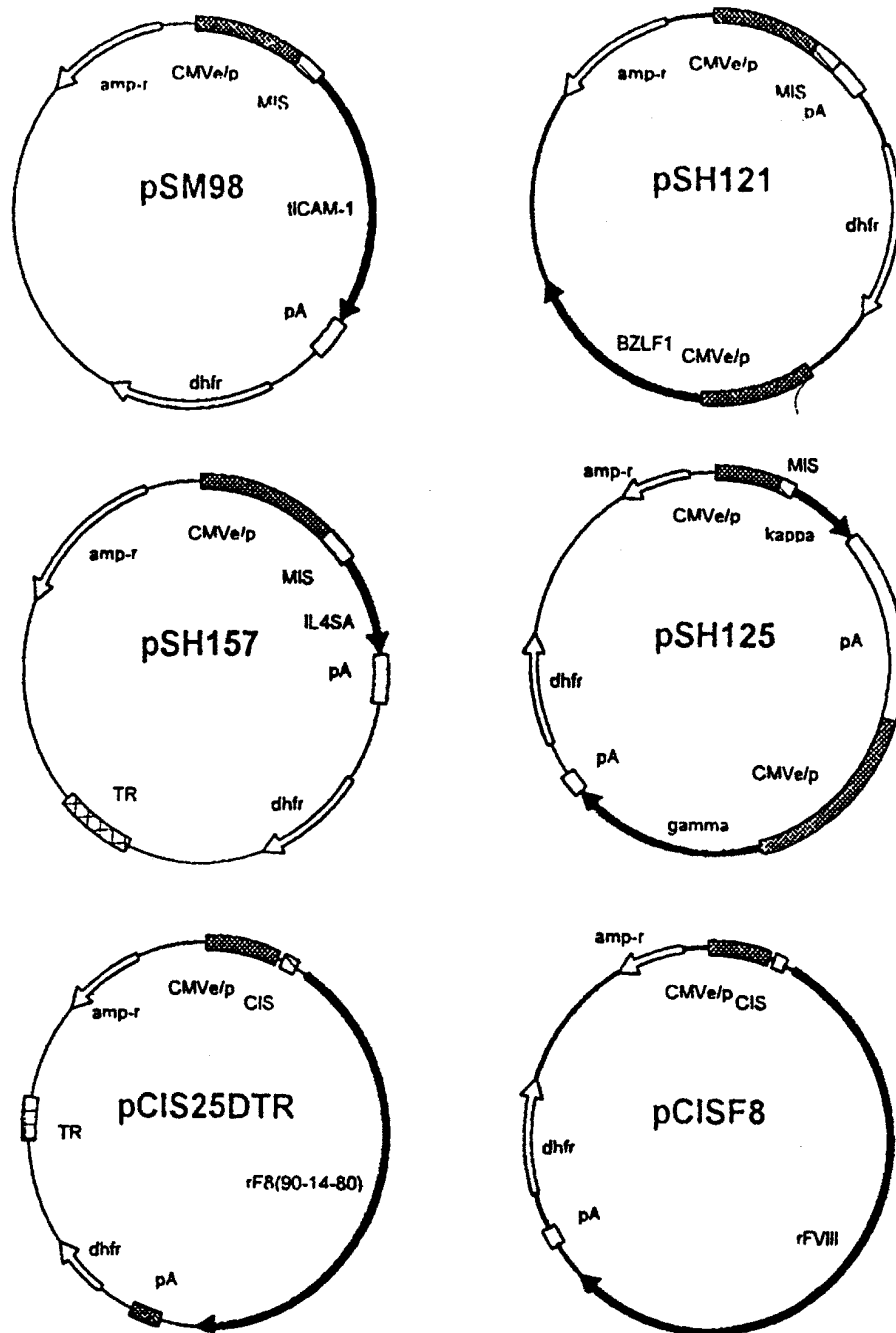
21. Методът съгласно претенция 20, ха-  
рактеризиращ се с това, че клетките водещи на-  
чалото си от бъбрек на човешки ембрион са  
клетки, с произход от 293S.

22. Клетка съгласно претенция 21, харак-  
теризираща се с това, че клетката водеща нача-  
лото си от Бъркитова лимфома е 2B8 клетка  
(АТСС депозирана под номер: CRL-12569).

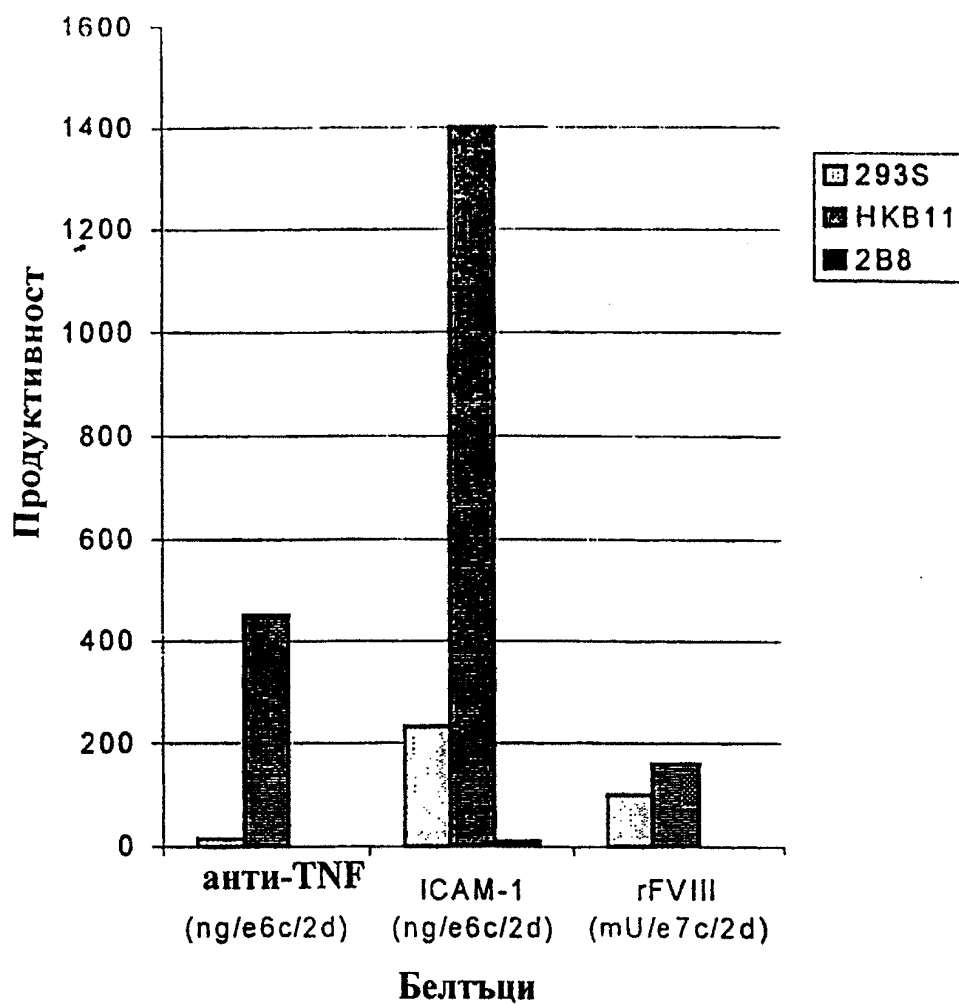
### Приложение: 3 фигури



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

Издание на Патентното ведомство на Република България  
1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д.Кацарова

Редактор: Р.Георгиева

Пор. № 63761

Тираж: 40 СР