



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 274 446 A1

4(51) C 12 N 5/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 318 477 1	(22)	29.07.88	(44)	20.12.89
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, Berlin, 1080, DD
(72)	Grunow, Roland, Dr. sc. med.; Jahn, Sigbert, Dr. med., DD

(54)	Verfahren zur Herstellung der Parentalzelllinie CB-Fu2
------	--

(55) Parentalzelllinie, Fusionszelllinie, Heterofusionszelllinie, humane B-Lymphozyten, Human-Maus-Heterofusionszelllinie, Maus-Myelomzelllinie, Antikörper, humane monoklonale Antikörper, Human Immunodeficiency Virus, HIV, Medizin, CB-Fu2(ZIM-0314)

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der Parentalzelllinie CB-Fu2 (ZIM 0314), einer Fusionszelllinie, die als Human-Maus-Heterofusionszelllinie aus humanen B-Lymphozyten und einer Maus-Myelomzelllinie gewonnen wird. Die Zelllinie CB-Fu2 eignet sich zur Herstellung von Hybridomzellen, die ihrerseits in der Lage sind, humane monoklonale Antikörper gegen das Human Immunodeficiency Virus (HIV) zu produzieren. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Medizin.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung einer Parentalzelllinie aus Human- und Mauszellen, **dadurch gekennzeichnet**, daß humane B-Lymphozyten mit einer Maus-Myelomzelllinie fusioniert, solche Hybridomzellen selektiert werden, die keine eigene Antikörperproduktion aufweisen und daraus Subklone gewonnen werden, deren vorteilhaftester die Heteromyelomzelllinie CB-Fu2 (ZIM-0314) darstellt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Maus-Myelomzelllinie P3 × 63 Ag8/653 Verwendung findet.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die selektierten Hybridomzellen mehrfach in 8-Azaguanin passagiert bzw. kloniert und daraus HAT-sensitive Subklone erhalten werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß periphere Blutlymphozyten eines an Rheumatoidarthritis erkrankten Menschen verwendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

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.

Charakteristik der bekannten Lösungen

Die effektive Gewinnung humaner monoklonaler Antikörper (hmAk) gegen die verschiedensten Antigenspezifitäten ist weltweit bisher durch 2 Hauptprobleme erschwert (Engleman, E. G., S. K. Founq, 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-Präcursorzellen 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 (Banapour, R., K. Rosenthal, L. Rabin, V. Sharma, L. Young, J. Fernandez, E. Engleman, G. Reyes u. J. Lifson: Characterization and epitope mapping of a human monoclonal antibody reactive with the envelop glycoprotein of human immunodeficiency virus. J. Immunol. **139** [1987], 4027-4033; McClure, J., EP 251 612).

Die bisherigen Ergebnisse bei der Fusionierung von menschlichen Lymphozyten mit Mäuse-Myeloma waren nicht zufriedenstellend. So heißt es in der Df-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“.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, der medizinischen Diagnostik eine Fusionszelllinie zur Verfügung zu stellen, die sich zur Immortalisierung antikörperproduzierbarer B-Lymphozyten eignet und die eine hohe Fusionsfrequenz aufweist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

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 × 63 Ag8/653 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-Azaguaninhaltigen Zellkulturmedium hinsichtlich eines Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase- (HGPRT-) Defektes selektiert. Von diesen Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin- (HAT-) sensitiven Zelllinien wurden die fusiogenen 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. Unter Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Zelllinie wurde eine Reihe von humanen monoklonalen Antikörpern (mAk) gewonnen. Dazu gehören mAk gegen Strukturproteine des Human-Immunodeficiency-Virus (HIV) und gegen bakterielle Antigene.

Die neue Heteromyelomzelllinie CB-Fu 2 zeichnet sich gegenüber bisher bekannten Fusionszelllinien (K. James, G. T. Bell, J. Immunol. Meth., 1987, 100, 5-40) durch

- eine hohe Fusionsfrequenz mit peripheren Blutlymphozyten
 - eine hohe Stabilität der Hybridzelllinien
 - eine hohe Antikörper-Produktionsrate der Hybridzelllinien
- aus. Sie ist in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstituts für Molekularbiologie (ZIM) der Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin-Buch, unter der Nummer ZIM-0314 registriert.

Ausführungsbeispiele

1. Herstellung der Parentalzelllinie CB-Fu 2:

Periphere Blutlymphozyten von einer Patientin mit Rheumatoidearthritis 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 5 96-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 etwa 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-Azaguaninhaltigen 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 etablierte Heteromyelomzelllinie CB-Fu2 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-Fu2 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-Fu2 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-Fu2 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-Fu2-Zellen, wie angegeben, fusioniert. Die B-Lymphozyten können vorher auch mit EBV, wie folgt, transformiert und angereichert werden. 5-10 $\times$ 10⁶ 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-Fu2-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-hp 25-1 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 Antikörper-produzierenden 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-hp 25-1 als ZIM-0315

H-CB-hp 25-2 als ZIM-0316

H-CB-hp 25-3 als ZIM-0317

H-CB-hgp41-1 als ZIM-0318

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