

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENȚII ȘI MARCI
București

ROMÂNIA



(11) **121563 B1**
(51) Int.Cl.
C12N 15/01 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2001 00648**

(22) Data de depozit: **08.12.1999**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.11.2007** BOPI nr. 11/2007

(30) Prioritate:
10.12.1998 US 09/209.920

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **US 99/29332 08.12.1999**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 00/34462 15.06.2000**

(73) Titular:
• **BAYER CORPORATION, 800 DWIGHT
WAY, P.O. BOX 1986, BERKELEY,
CALIFORNIA, US**

(72) Inventatori:

• **CHO MYUNG-SAM, 3259 RAMONA
STREET, PINOLE, CALIFORNIA, US**

(74) Mandatar:
**ROMINVENT S.A.,
STR. ERMIL PANGRATTI, NR. 35,
SECTOR 1, BUCUREȘTI**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**GB 2085887; Walls și colab., Amplification
of multicistronic plasmids in the human
293 cell line and secretion of correctly
processed recombinant human protein, C.
Gene, 1989, vol. 81, pag. 139...149**

(54) **CELULE GAZDĂ HIBRIDE, UMANE, PENTRU EXPRESIA
GENELOR DE MAMIFER**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o celulă hibridă, rezultată prin fuziunea unei celule de origine renală, embrionară, umană, (293S), cu o celulă cu origine în limfonul Burkitt 2B8, pentru obținerea unor celule gazdă, pentru expresia prin recombinare a unor gene de mamifer, la o linie celulară NKB11 și la un procedeu de obținere a

celulelor hibride, umane, utilizate pentru expresia unei proteine heteroloage.

Revendicări: 17
Figuri: 3

Examinator: biochimist EREMIA LAURA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 121563 B1

RO 121563 B1

1 Prezenta invenție se referă la o celulă hibridă, rezultată prin fuziunea unei celule de
origine renală, embrionară, umană, (293S), cu o celulă cu origine în limfomul Burkitt 2B8,
3 pentru obținerea unor celule gazdă, pentru expresia prin recombinare a unor gene de ma-
mifer, la o linie celulară NKB11 și la un procedeu de obținere a celulelor hibride, umane,
5 utilizate pentru expresia unei proteine heteroloage.

Este cunoscut, din cererea lui Cho și Chan, cu referința MSB-7254 (**US 09/209915**),
7 cu titlul: *Vectori cu secvență terminală repetitivă de la virusul Epstein-Barr* și cererea de
brevet aparținând lui Chan și colab., cu referința MSB-7255 (**US 09/209916**), cu titlul: *Sistem*
9 *de expresie pentru factorul VIII*, diverse obiecte înrudite cu cele revendicate în prezenta
cerere de invenție. Ambele cereri menționate au fost înregistrate la data de 10 decembrie
11 1998. Invenția se referă, în general, la linii celulare de mamifer, prelucrate prin tehnici de
inginerie genetică, astfel încât să producă proteine cu acțiune biologică. În particular, invenția
13 are ca obiect clone celulare, hibride, umane, obținute prin fuziunea celulelor renale,
embrionare, (293S), cu celule de limfom Burkitt. Aceste celule hibride, umane pot fi utilizate
15 pentru producerea de proteine heteroloage.

Până în prezent, cele mai multe proteine recombinante cu rol terapeutic au fost
17 produse de către celule de mamifer non-umane. Câteva exemple sunt reprezentate de cele
ce urmează.

19 S-au utilizat celule ovariene de hamster chinezesc (CHO) (dhfr-) la obținerea de pro-
teine recombinante cu rol terapeutic (Urlaub și colaboratorii, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci.*
21 *USA* 77, pag. 4216...4220), cu markerul amplificabil de selecție reprezentat de dihidrofolat
reductază (Kaufman și colab., 1982, *Mol. Biol.* 159, 601...621; Gasser și colab., 1982, *Proc.*
23 *Natl. Acad. Sci. USA* 79, pag. 6522...6526).

Se cunosc diverse proteine recombinante cu rol terapeutic, care sunt produse în
25 celule de mamifer, cum ar fi, de exemplu factorul VIII recombinant (rFVIII) (Kaufman și
colab., 1988, *J. Biol. Chem.* 263, 6352...6362), activatorul tisular al plasminogenului (tPA)
27 (**US 4766075**, Goeddel și colab., 1988), eritropoietina (EPO) (**US 4703008**, Lin, 1987) și
anticorpii monoclonali (mAbs) (**US 4816397**, Boss și colab. 1989).

29 S-au utilizat celule renale de la puiul de hamster (BHK21), pentru producerea de
rFVIII după selecție cu G418 și amplificare cu metotrexat (MTX) a celulelor rezistente la
31 G418 (**US 4965199**, Capon și colab., 1990).

S-au utilizat celule de mielom de la șoarece (NS0), pentru producerea de anticorpi
33 umani anti-TNF, obținuți prin tehnici de inginerie genetică (**US 4816397**, Boss și colaboratorii,
1989). Cu toate acestea, această linie celulară produce proteine care au căi de carbohidrați
35 specifice șoarecilor și nu sunt avantajoase pentru utilizare la om.

S-a utilizat o linie celulară, umană, Namalwa (având la origine celule de limfom
37 Burkitt), pentru producerea de interferon α , în laboratorul de cercetare Wellcome, și pentru
producerea de pro-urokinază (Satoh și colab., 1996, *Cytotechnology* 18, 167...185, 1996),
39 de activator tisular al plasminogenului (t-PA) (Khan și colab., 1995, *Biochem. Soc. Trans.* 23,
S99), de factor stimulator al coloniilor de macrofage granulocite (Okamoto și colab., 1991,
41 *Arch. Biochem. Biophys.* 286, pag. 562-568), de interferoni și limfotoxină (Hosoi și colab.,
1991, *Cytotechnology* 5, pag. 17...34) și de factor stimulator al coloniilor de granulocite
43 (Hosoi și colab., 1991, *Cytotechnology* 7, pag. 25...32) în laboratoarele de cercetare din
Tokio. Transfecția cu ADN a acestor celule a fost dificilă.

45 Walls și colaboratorii (1989, *Gene* 81, pag. 139...149) au prezentat strategia de co-
amplificare dhfr/MTX, utilizată pentru expresia proteinei C, funcțională în celulele renale,
47 embrionare, umane (293S). Este cunoscut faptul că celulele 293S (Stillman și colab., 1985,

RO 121563 B1

<i>Mol. Cell. Biol.</i> 5, pag. 2051...2060) formează agregate celulare mari în suspensie, în special la concentrație crescută de calciu ($>100\text{ }\mu\text{M}$), care determină o agregare și mai mare și scăderea viabilității celulare. (Peshwa și colab., 1993, <i>Biotech. and Bioeng.</i> 41, pag. 179...187). Toate trimiterile citate sunt incluse în prezenta descriere prin referință.	1 3
În prezent, au fost realizate clone de celule umane, hibridizate, care pot fi transfectate cu ușurință prin electroporație sau cu lipozomi cationici, și care sunt adaptate fără dificultate la creșterea în culturi în suspensie. Se pot exprima proteine heteroloage, utilizând niveluri scăzute (50...100 nM) de amplificare cu MTX, într-un mediu de celule umane. În plus, celulele se adaptează ușor la creșterea într-un mediu lipsit de ser.	5 7 9
Problema, pe care o rezolvă invenția, este de a obține o celulă hibridă, o linie celulară NKB11 și un procedeu de obținere a celulelor hibride, umane.	11
Celula conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că rezultă prin fuziunea unei celule 293 de origine renală, embrionară, umană, înregistrată cu numărul de colecție ATCC: CRL-12568, cu celula 2B8 cu origine în limfomul Burkitt și înregistrată cu numărul de colecție ATCC: CRL-12569.	13 15
Linia celulară, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că linia celulară HKB11, înregistrată cu numărul de colecție ATCC: CRL-12568, a fost modificată genetic, pentru a exprima o proteină heteroloagă.	17
Procedeul de obținere conform invenției înlătură dezavantajele, prin aceea că acesta cuprinde următoarele etape:	19
a) obținerea celulelor 293, de origine renală, embrionară, umană,	21
b) obținerea celulelor 2B8, cu origine în limfomul Burkitt și înregistrată cu numărul de colecție ATCC: CRL-12569,	23
c) punerea în contact a celulelor de la etapa a) cu celulele de la etapa b), în condiții care permit fuziunea celulară,	25
d) selecția celulelor de la etapa c), pentru selecția celulelor care secretă o proteină heteroloagă într-o cantitate superioară celei secretate de celulele ovariene de hamster chinezesc (CHO).	27
Prin aplicarea invenției, se obține avantajul obținerii unei celule hibride care să exprime niveluri crescute de diverse proteine dorite.	29
Aceste celule sunt produsul unei fuziuni între celule renale, embrionare, umane, (293S) și celule de limfom Burkitt, fuziune prezentată în fig. 1. Aceste clone hibride, denumite HKB, conțin un genom defectiv de EBV, ce provine de la linia celulară HH 514-16, linie celulară ce derivă din celulele de limfom Burkitt, P3HR1 (Hinuma și colab., 1967, <i>J. Virol.</i> 1, pag. 1045...1051). Celulele P3HR1 conțin un EBV (virus Epstein Barr) neperturbabil. HH 514-16 este o clonă a liniei celulare P3HR1 (Hinuma și colab., 1967, <i>J. Virol.</i> 1, pag. 1045...1051) care conține EBV neperturbabil. Linia celulară HH 514-16 a pierdut în cursul procesului de clonare o secvență ADN-het, și anume o secvență ADN care întrerupe latența (Rabson și colab., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 87, pag. 3660...3664). Prin urmare, virusul EBV din clonele HKB este un virus neperturbabil și se află în stare de latență.	31 33 35 37 39
Celulele HKB sunt celule gazdă, hibride, umane, adecvate pentru producția prin recombinare de proteine cu rol terapeutic. Aceste celule gazdă se obțin prin hibridizarea unor linii celulare parentale diferite, fiecare având diferite caracteristici avantajoase. Din celulele care rezultă în urma hibridizării, se obțin celule gazdă care au caracteristicile avantajoase ale fiecăreia dintre liniile parentale utilizate.	41 43 45

1 Celulele gazdă pot fi manipulate prin tehnici de inginerie genetică, astfel încât să
 2 exprime niveluri crescute de diverse proteine. Exemple de proteine ce se pot obține prin
 3 manipularea genetică a celulelor gazdă sunt reprezentate printre altele de ICAM-1 solubilă,
 4 interleukina 4 recombinantă (IL-4), t-PA, EPO, rFVIII, și BDD-FVIII (variante ale factorului VIII
 5 în care s-a efectuat deleția domeniului B) și derivați ai acestor proteine. Organizarea
 6 domeniilor în structura factorului VIII este de forma A1-A2-B-A3-C1-C2, factorul VIII fiind
 7 sintetizat sub forma unei polipeptide cu catenă unică de 2351 de aminoacizi, din care se
 8 scindează o peptidă semnal de 19 aminoacizi în cursul translocării în lumenul reticulului
 9 endoplasmic. Datorită faptului că factorul VIII este intens glicozilat, a fost dificilă atingerea
 10 unor niveluri crescute de expresie a acestuia (>0,2 pg/celulă/zi) (Lind și colaboratorii, 1995,
 11 *Eur. J. Biochem.* 232, pag. 19...27; Kaufman și colab., 1989, *Mol. Cell. Biol.* 9, pag.
 12 1233...1242). Expresia factorului VIII în celulele de mamifer este de obicei cu 2...3 grade de
 13 mărime mai slabă decât expresia observată în cazul altor gene, utilizând vectori și metode
 14 similare. Randamentul liniilor celulare în ceea ce privește producția de factor VIII a fost
 15 cuprins în intervalul 0,5...1 U/celulă/zi (0,1...0,2 pg/celulă/zi).

16 S-a demonstrat că domeniul B al factorului VIII nu este indispensabil pentru con-
 17 servarea activității procoagulante a acestuia. Utilizând variante scurtate de factor VIII, diverse
 18 grupe de cercetători au raportat ameliorarea nivelului de expresie a factorului VIII în celulele
 19 de mamifer (Lind și colab., 1995, *Eur. J. Biochem* 232, pag. 19...27; Tajima și colab., 1990,
 20 *Proc. 6th Int. Symp. H. T.*, pag. 51...63; **US 5661008**, Almstedt, 1997). Cu toate acestea,
 21 nivelul expresiei variantelor de factor VIII a rămas sub 1 pg/celulă/zi, pentru o clonă celulară
 22 stabilă. S-a observat, de asemenea, că deși imunoglobulina endogenă (Ig) nu a fost
 23 exprimată, expresia Ig recombinantă din celulele gazdă manipulate genetic a fost totuși
 24 crescută. Proteinele produse de celulele HKB11 au profilul de glicozilare specific uman. Prin
 25 urmare, aceste clone sunt celule gazdă optime, pentru producerea de Ig și de proteine prin
 26 tehnici de inginerie genetică.

27 Așa cum se utilizează în prezenta descriere, o celulă cu origine în limfomul Burkitt
 28 este o celulă de limfom Burkitt, derivată dintr-o celulă de limfom Burkitt, derivată dintr-o altă
 29 celulă cu origine în limfomul Burkitt, sau este o celulă rezultată prin diviziune mitotică din
 30 oricare dintre celulele de mai sus. Expresia "derivată din", în acest context, semnifică, printre
 31 altele, diviziunea celulară mitotică normală și procedee precum transfecții, fuziuni celulare
 32 sau alte tehnici de inginerie genetică sau de biologie celulară, utilizate pentru modificarea
 33 celulelor, în sensul obținerii unor celule cu proprietăți noi. În mod similar, o celulă cu origine
 34 în rinichiul embrionar uman este o celulă renală, embrionară, umană, derivată dintr-o celulă
 35 renală, embrionară, umană, derivată dintr-o altă celulă cu origine în rinichiul embrionar,
 36 uman, sau este o celulă rezultată prin diviziunea mitotică a oricăreia dintre celulele de mai
 37 sus. De asemenea, o celulă cu originea în linia celulară 293S este o celulă 293S, derivată
 38 dintr-o celulă 293S, derivată dintr-o altă celulă cu originea în linia celulară 293S, sau este o
 39 celulă rezultată prin diviziune mitotică din oricare dintre celulele de mai sus. O proteină
 40 heteroloagă este o proteină produsă de o celulă manipulată genetic.

41 Fig. 1 prezintă în rezumat modul de derivație a celulelor HKB.

42 Fig. 2 prezintă hărți fizice ale vectorilor menționați în text. Toate plasmidele sunt
 43 asamblate pornind de la un schelet al vectorului pBR 322 și conțin o unitate de expresie dhfr.
 44 Toate genele ce codifică proteine de interes sunt reglate de unitatea enhancer CM V/pro
 45 motor (CMVe/p); un intron 5' (MIS sau CIS) a fost poziționat la capătul 5' al genelor, cu
 46 excepția BZLF1. Regiunea semnal pentru poliadenilare a fost indicată ca pA. Ambele
 47 plasmide, pSH 157 și pCIS25DTR, conțin o secvență EBV-TR (402 perechi de baze).

Fig. 3 prezintă o comparație între liniile de celule gazdă din punct de vedere al expresiei genei, așa cum reiese din proba transfecției tranzitorii. Transfecțiile se efectuează în aceleași condiții: se realizează transfecția aceluiași număr de celule 293S, 2B8 și HKB11, cu aceeași cantitate de ADN plasmidic, utilizând același agent de transfecție. La 2 zile după transfecție, se recoltează probe de lichid din culturile tisulare. Se determină nivelurile producției de proteine prin test ELISA (IgG și ICAM-1; măsurate în ng de proteină/10⁶ celule/2 zile) și cu trusa de testare Coatest^(R) (rFVIII; măsurat în miliunități/10⁷ celule/2 zile).

Exemple

Materiale și metode

Celulele HH 514-16 au fost procurate prin bunăvoința doctorului George Miller (Universitatea Yale). Celulele 293S au fost obținute de la dr. Brad Zerler (Molecular Therapeutic Institute, West Heaven, CT). Celulele 293S sunt celule 293 (ATTC CRL-1573) care au fost adaptate să crească în culturi de celule în suspensie (Stillman și colaboratorii, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5, pag. 2051...2060).

Plasmide

Toți vectorii de expresie, utilizați în acest studiu, au fost de fapt plasmide derivate din plasmida pBR322, având segmentul de expresie a genei funcționale dhfr. Hărțile fizice ale vectorilor de expresie sunt descrise în fig. 2. Plasmidele pSH157 și pCIS25DTR conțin și secvența terminală repetitivă a virusului Epstein-Barr (EBV-TR). În legătură cu secvența EBV-TR, vezi cererea de brevet a lui Cho și Chan, cu referința MSB-7254, intitulată *Secvența terminală repetitivă a virusului Epstein-Barr crește coeficientul de selecție cu medicamente*. Vectorul pSH131, care a fost depus în Colecția americană de tipuri de culturi, cu referința ATCC 98879, poate fi utilizat la obținerea de vectori de expresie pentru o anumită proteină, conform descrierii lui Cho și Chan (MSB-7254, în lucrarea prezentată mai sus.)

ELISA

Pentru măsurarea secreției de tICAM-1, s-a realizat adsorbția pe plăci de microtitrare cu fund rotund, a unui anticorp monoclonal complementar cu ICAM-1, C92.5 (McClelland și colab., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, pag. 7993...7997). Plăcile au fost fixate prin tratare cu o soluție de ser fiziologic tamponată cu fosfat (PBS), conținând albumină serică bovină (BSA) 1%, după care au fost incubate cu probele ce conțin tICAM-1. Plăcile au fost apoi spălate cu soluție tampon de spălare (PBS plus Tween 20 în concentrație de 0,005%) și au fost incubate cu C78.5 biotinitat, un al doilea anticorp monoclonal, complementar, cu un epitop diferit al tICAM-1 (McClelland și colab., 1991, în lucrarea prezentată mai sus.). După spălare, plăcile au fost incubate cu HRP-streptavidină. Plăcile au fost apoi spălate cu soluție tampon de spălare, după care au reacționat cu tetrametil benzidină (TMB), reacția fiind apoi întreruptă cu soluție de acid clorhidric 1N. Concentrația de tICAM-1 a fost determinată prin citirea OD la 450/570 nm și compararea cu o curbă standard ce corespunde tICAM-1 purificate.

Pentru măsurarea secreției de imunoglobulină (Ig), s-au utilizat anticorpi anti-Ig, pentru acoperirea plăcii, și anticorpi anti-Ig biotinilați, pentru detecție. S-a utilizat ca standard o concentrație cunoscută a moleculei Ig. În rest, procedeul a fost același.

Pentru măsurarea secreției de interleukină-4 (IL-4), s-au utilizat anticorpi anti-IL-4, pentru acoperirea plăcii, și anticorpi anti-IL-4 biotinilați, pentru detecție. S-a utilizat ca standard o moleculă purificată de IL-4.

Test pentru măsurarea secreției de rFVIII

Molecula de rFVIII a fost cuantificată cu reactivi din trusa Coatest^(R) VIII: C/4 (Chromogenix, Molndal, Suedia). La măsurătorile efectuate pe plăci EIA/RIA A/2 (Corning, Corning, NZ), preîncălzite la temperatura de 37°C, pe dispozitiv Select Heat Blocks (VWR Scientific, San Francisco, CA), s-a utilizat ca standard U.S. un factor antihemofilic (factor VIII), cunoscut sub numele de MEGA 1 (Biroul de cercetare biologică, Bethesda, MD). S-au

RO 121563 B1

adăugat factor IXa, factor X, fosfolipidă și CaCl_2 , în fiecare probă și s-au incubat timp de 10 min, pentru activarea factorului X. S-a adăugat apoi un substrat cromogen (S2222) și acesta s-a incubat timp de 10 min, pentru eliberarea grupării cromogene pNA. Această reacție a fost întreruptă prin adăugare de soluție de acid acetic 50%. S-a măsurat apoi absorbția colorimetrică la 405/450 nm prin citirea microplăcii cu ajutorul unui spectrofotometru SPECTRA max^(R) 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), iar prelucrarea datelor s-a realizat cu ajutorul unui program SOFT max^(R) PRO, de asemenea furnizat de Molecular Devices.

Obținerea liniei celulelor de limfom Burkitt, rezistente la G418 și sensibile la HAT

Pentru obținerea de celule sensibile la HAT, au fost preparate linii celulare defective de hipoxantin-guanin fosforibozil transferază (HGPRT) (Szybalska și colaboratorii, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48, pag. 2026...2034, 1962; Littlefield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, pag. 568...576, 1963), conform protocolului standard descris de Siadak și colaboratorii (US 4834975, 1989).

Celulele HH 514-16 (obținute de la dr. G. Miller, Universitatea Yale), celule cărora le lipsește secvența ADN-het (Rabson și colab., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, pag. 3660...3664), au fost tratate cu 300 $\mu\text{g/ml}$ de ester etilic al acidului metansulfonic (MSE) (Sigma, St. Louis, MO) în mediu de suspensie RPMI-1640 (*Life Science*, Gaithersburg, MD), îmbogățit cu ser fetal bovin 15% (FBS) (Hyclone, Logan, UT), timp de 24 h. După spălarea celulelor cu mediu, acestea sunt transferate pe plăci, în mediu ce conține 6-tioguanină (6TG) (Sigma) (5 $\mu\text{g/ml}$), pentru selecția celulelor HGPRT-negative. În cursul perioadei de selecție de 6 luni, concentrația de 6TG a fost crescută de la 5 la 30 $\mu\text{g/ml}$. A fost apoi testată sensibilitatea celulelor la mediu cu HAT. S-au obținut clone celulare, individuale (SCC), prin clonare în diluție limitantă (o celulă pe cavitate, în plăci cu 96 de cavități) a populației A5 sensibile la HAT. Una dintre clonele celulare individuale a fost transfectată cu pSV2neo, care conține o genă nouă, reglată de promotorul SV40 în vectorul pBR, obținându-se celule rezistente la G418. S-a utilizat pentru fuziune una dintre clonele individuale de celule rezistente la G418 (1,5 $\mu\text{g/ml}$), denumită 2B8 (depusă în Colecția americană de tipuri de culturi, cu nr. CRL-12569).

Exemplul 1. Fuziunea celulară și obținerea de clone celulare, individuale

Fuziunea celulară s-a realizat, în principal, conform metodei de fuziune, cu polietilen glicol (PEG), descrisă de Kennett (1979, *Meth. Enzymol.* 58, pag. 5...359). Câte cinci milioane de celule de tip 293S și, respectiv, de tip 2B8, în creștere logaritmică, au fost spălate cu PBS fără Ca^{++} și Mg^{++} (*Life Technologies*, Rockville, MD) și au fost însămânțate într-o cavitate a unei plăci cu șase cavități, tratată în prealabil cu aglutinină de arahide (Sigma) (5 $\mu\text{g/ml}$). Plăcile cu șase cavități, însămânțate cu celule, au fost centrifugate la 400 g, timp de 6 min, într-o centrifugă Beckman J-6M/E (Beckman, Palo Alto, CA). După înlăturarea soluției PBS din cavitate, celulele au fost tratate cu 2 ml de PEG 40% (greutate/volum) (Sigma), timp de un minut. O cavitate a fost păstrată ca martor, nefiind tratată cu PEG. Celulele au fost spălate de trei ori cu 5 ml de PBS ce conține DMSO 5%, după care au fost spălate de trei ori cu PBS. Au fost apoi incubate celulele cu mediu proaspăt îmbogățit cu FBS 15%, timp de 25 min. Au fost însămânțate celulele pe plăci cu 96 de cavități (1,2 x 10⁶ celule pe placă), utilizându-se mediu proaspăt cu G418 (1 mg/ml) și HAT (*Life Technology*), îmbogățit cu FBS 15%. Celulele au fost hrănite de două ori pe săptămână cu mediul de selecție. În acest exemplu, la selecția inițială, celulele 293S aveau caracteristica dorită, și anume lipsa sensibilității în mediu ce conține HAT și, în mod similar, celulele 2B8 aveau caracteristica dorită, și anume rezistența la G418.

Celulele fuzionate au fost cultivate în condiții selective, în timp ce celulele amestecate nu au fost cultivate în aceleași condiții. La trei săptămâni de la selecție, populațiile inițiale au fost transferate în formate mai largi. Pentru obținerea de clone celulare, individuale, au fost amestecate cele douăzeci de populații celulare, inițiale, cu ritm stabil de creștere, și au fost supuse clonării în diluție limitantă (o celulă pe cavitate), utilizându-se mediu selectiv. Din 15 plăci cu 96 de cavități, au fost selecționate 19 clone celulare, individuale, după urmărirea atentă a clonelor individuale la microscop. Clonele celulare, individuale, obținute în experimentul de fuziune, au fost denumite celule HKB (celule hibride din celule B umane și celule renale, umane). Pentru studiul de transfecție, au fost alese șapte clone celulare, individuale. A fost în continuare analizată producția stabilă de diverse proteine, la aceste șapte clone celulare, individuale, alese. Una dintre aceste șapte clone, HKB11, a fost aleasă ca fiind linia celulară de mamifer, preferată ca gazdă, pentru producția de proteine heteroloage. Vezi rezumatul în fig. 1.

Exemplul 2. Caracterizarea clonelor HKB

Deși toate celulele hibride au fost selecționate în condiții selective, starea de hibrid a fost confirmată prin numărarea setului de cromozomi din celule. Într-adevăr, toate celulele HKB au prezentat un număr de cromozomi în intervalul 90...110. Aceste numere corespund cu suma numărului de cromozomi ai celulelor 293S, cu numărul de cromozomi ai celulelor 2B8 (64 și respectiv 47, conform datelor ATTC). Celulele 293S (Stillman și colab., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5, pag. 2051...2060) sunt celule 293 adaptate la creșterea în suspensie (ATCC CRL-1573).

S-a analizat expresia Ig endogene (lanțurile μ și κ) la toate clonele celulare, hibride, prin imunofluorescență directă, utilizându-se celule fixate cu metanol, pentru determinarea clonelor celulare care secretă Ig endogenă. În experimente repetate, în perioade mai lungi de timp, s-a observat că aceste celule sunt negative la analiza expresiei lanțurilor μ și κ , prin imunofluorescență (tabelul 1) și ELISA (datele nu sunt prezentate).

Tabelul 1

Detectarea expresiei genei pentru Ig

Celule	Expresia genei	
	Lanțul greu (μ)	Lanțul ușor (κ)
293S	negativă	negativă
2B8	pozitivă	pozitivă
HKB	negativă	negativă

Tabelul 1 prezintă rezultatele observate la analiza prin imunofluorescență a trei tipuri de celule. Celulele au fost suspendate din nou în PBS și aplicate sub forma unei pelicule pe o lamă de sticlă. După uscarea celulelor, lamele au fost fixate în soluție rece de metanol (-20°C), timp de 5 min. Celulele au fost colorate cu complexe FITC-anticorp antilant κ uman și antilant μ uman (diluție de 1:20) (Zymed Laboratories, Inc., So. San Francisco, CA) într-o cameră cu umiditate la 37°C , timp de 45 min. După clătirea lamelor cu PBS, timp de 10 min, peste acestea au fost suprapuse lamele de sticlă, utilizându-se amestec PBS/glicerol (1:1). Celulele au fost observate la un microscop cu lumină fluorescentă (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

RO 121563 B1

Modelul specific uman al legăturii acidului sialic, $\alpha(2-6)$ sialiltransferază, a fost confirmat prin analiza FACS a celulelor HKB cu lectină *Sambucus nigra* (SNA), conjugată cu FITC (Sigma, St. Louis, MO). La analiza profilului de glicozilare prin metoda amprentării oligozaharidelor, proteina secretată de celulele HKB a prezentat legături $\alpha(2-3)$ și $\alpha(2-6)$ ale acidului sialic (datele nu sunt prezentate). Din această observație reiese că celulele HKB obținute prin fuziunea celulelor 293S și 2B8 și-au păstrat enzimele de glicozilare specifice rasei umane.

Pentru a testa capacitatea acestor celule hibride de a exprima gene străine, se realizează transfecția acestora cu vectori de expresie, pentru ICAM-1 și IgG (anticorpi anti-TNF). Pentru a analiza secreția de IgG, au fost transfectate celule HKB (5×10^6 celule) prin electroporare, cu 10 μ g de ADN plasmidic, răspunzător de expresia funcțională a lanțurilor grele (*gamma*) și a lanțurilor ușoare (*kappa*). Pentru evaluarea nivelului secreției de ICAM-1 solubil, au fost transfectate celule HKB (5×10^6 celule) prin electroporare, cu 10 μ g de ADN plasmidic, răspunzător de expresia funcțională a ICAM-1 solubil. Nivelul secreției a fost determinat prin test ELISA, pentru IgG sau ICAM-1. Într-un test de transfecție tranzitorie, toate cele 19 clone celulare, individuale au secretat niveluri relativ crescute de ICAM-1 (100...500 ng/ml/2 zile) și IgG (30...200 ng/ml/2 zile) (tabelul 2). Aceste date arată că celulele hibride realizează expresia genelor Ig transfectate, deși expresia genei Ig endogene a fost suprimată.

Virusul Epstein-Barr (EBV) există în celulele 2B8, sub formă de epizomi. Toate clonele celulare, individuale au fost pozitive în ceea ce privește expresia EBNA-1 (datele nu sunt prezentate) ceea ce demonstrează că sunt pozitive pentru EBV. Cu toate acestea, nu se știe dacă a existat sau nu, în celulele hibride, un genom de EBV complet.

Tabelul 2

Experimente de transfecție tranzitorie, pentru evaluarea secreției de IgG și ICAM solubil de către clonele HKB obținute la scurt timp după procesul de clonare. Valorile reprezintă nivelul secreției de proteină (ng/ml/2 zile)

Clona HKB	IgG	ICAM-1 solubil
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 = nedeterminat

RO 121563 B1

De aceea, starea genomului EBV în celulele hibride a fost testată prin transfecția celulelor cu fragmentul BZLF1 al genomului EBV, care este o genă de transactivare ce întrerupe starea de latență. S-a realizat transfecția celulelor HKB (5×10^6 celule) cu 10 μ g de ADN plasmidic (pSH121) care permite expresia funcțională a BZLF1. S-a efectuat detectarea antigenului capsidei EBV (EBV-VCA) prin imunofluorescență indirectă, utilizând ser uman ce conține anticorpi anti-EBV-VCA și anticorpi anti-IgG umană, conjugați cu FITC. Detaliile tehnice ale testului de imunofluorescență sunt descrise mai sus. Conform datelor din tabelul 3, celulele transfectate au fost negative în ceea ce privește expresia antigenului capsidei EBV (EBV-VCA), ceea ce demonstrează că au fost negative și în ceea ce privește replicarea virală. Cu toate acestea, un mic procent de celule transfectate a prezentat expresia antigenului. Aceste date indică faptul că celulele hibride conțin genomul EBV în formă latentă.

Tabelul 3

Inducția replicării EBV prin transfecție cu BZLF1

Clona HKB	Expresia antigenului capsidei virale (%)	
	transfecție simulată	BZLF1
HKB1	negativă	0,20%
HKB5	negativă	1-2%
HKB7	negativă	0,20%
HKB11	negativă	0,20%
HKB13	negativă	0,50%
HKB17	negativă	0,20%
HKB19	negativă	1-2%

S-a realizat adaptarea celulelor hibride la cultivarea în mediu fără ser, prin înjumătățiri repetate ale concentrației de FBS în flacoanele agitate. După două săptămâni, celulele erau cultivate în mediu fără FBS. Celulele au crescut sub formă de mici agregate, în flacoanele agitate. Spre deosebire de celulele 293S, celulele hibride s-au adaptat ușor la creșterea în culturi în suspensie în mediu fără ser. Celulele hibride, cultivate în mediu fără ser și fără albumină, îmbogățit cu transferină și insulină, au putut fi păstrate în culturi în suspensie în flacoanele agitate, pentru mai mult de un an de zile.

Pentru a compara nivelurile de secreție a produșilor genelor transfectate, s-a realizat transfecția uneia dintre clonele HKB11 și a celulelor parentale 293S și 2B8, cu pSM98 (pentru ICAM solubil), cu pSH125 (pentru IgG anti-TNF) și cu pCISF8 (pentru rFVIII). După cum se poate observa în fig. 3, nivelul secreției de ICAM-1 și IgG a fost mult mai mare (aproximativ de 10 ori mai mare) la celulele HKB11 decât la celulele 293S. Nivelul secreției ambelor proteine la celulele 2B8 a fost nedetectabil. Nivelul secreției de rFVIII în celulele HKB11 a fost asemănător cu cel al celulelor 293S. Aceste date demonstrează că randamentul transfecției celulelor HKB este mult mai bun decât cel al transfecției celulelor parentale.

RO 121563 B1

Exemplul 3. Obținerea de clone HKB stabile, care secretă proteine heteroloage

S-a analizat stabilitatea expresiei de proteine la clone hibride, cu ajutorul unui sistem de amplificare genică (dhfr/MTX). S-a efectuat mai întâi transfecția celulelor cu un vector de expresie adecvat, iar apoi celulele transfectate (de obicei 10^6 celule pe placă cu 96 de cavități) au fost însămânțate și selectate/înmulțite în mediu de selecție fără hipoxantină și timidină, dar îmbogățit cu FBS și MTX (50 nM). După o primă evaluare a plăcilor, au fost alese celulele din cavitățile cu activitate secretorie crescută și au fost transferate pe plăci cu 6 cavități. Celulele din plăcile cu 6 cavități au fost în continuare înmulțite, utilizându-se concentrații crescătoare de MTX (100, 200 și 400 nM) în mediul de cultură. S-a realizat o nouă sortare a populațiilor inițiale din plăcile cu 6 cavități, pentru obținerea celei mai bune. În cele din urmă, aceste populații au fost utilizate la obținerea prin derivare a unor clone celulare, individuale. Conform datelor prezentate în tabelul 4, celulele HKB11 s-au dovedit a fi optime pentru producția unor niveluri crescute de proteine, umane, heteroloage. În ceea ce privește producția de ICAM-1, Ig și a unui derivat de IL-4, celulele HKB11 au fost la fel de eficiente ca și celulele CHO (datele nu sunt prezentate). Totuși clonele HKB au crescut mai repede decât clonele CHO și s-au adaptat mai ușor la creșterea în culturi în suspensie în mediu fără ser. În cazul producției de BDD-FVIII, productivitatea clonelor HKB11 a fost de aproximativ 10 ori mai mare decât cea a clonelor CHO. Rezultatele de mai sus arată că celulele HKB11 sunt celule gazdă umane, optime, utile pentru expresia proteinelor umane cu rol terapeutic.

Tabelul 4

Producția de proteine heteroloage la clone HKB

Proteină	Celulă gazdă	Amplificare cu MTX	Productivitate specifică
ICAM-1	HKB11	100 nM	10 pg/celulă/zi ¹⁾
Ig	HKB13	50 nM	12 pg/celulă/zi
BDD-FVIII	HKB11	400 nM	5...10 uU/celulă/zi ²⁾
IL-4SA	HKB11	100 nM	5 pg/celulă/zi ³⁾

1) nivelul producției de ICAM-1 la clonele HKB a fost similar cu cel al celulelor 293S. Clona HKB care secretă ICAM-1 a putut fi ușor adaptată la cultivarea în suspensie, în timp ce adaptarea clonelor 293S la culturile în suspensie a fost dificilă;

2) nivelul secreției de BDD-FVIII a fost de aproximativ 10 ori mai mare decât cel al secreției la clonele derivate din celule CHO transfectate cu același vector de expresie;

3) cuantificarea în grame, a producției de IL-4SA (T13D/R121E), a fost posibilă la 6 luni după transfecție, în cazul celulelor HKB11, în timp ce în cazul celulelor CHO, aceasta a fost posibilă cu câteva luni mai târziu, în experimente simultane, utilizând același vector de expresie și un procedeu similar.

Liniile celulare, derivate prin procedeul de mai sus, au fost reprezentate de (i) clone secretoare de ICAM-1 (10 pg/celulă/zi), derivate din celule HKB11, transfectate cu pSM98, după amplificare în MTX 100 nM, (ii) clone celulare, individuale, secretoare de anticorpi monoclonali (anti-TNF) (12 pg/celulă/zi), derivate din celulele HKB13, transfectate cu pSS125, după amplificare în MTX 50 nM și clonare în diluție limitantă fără MTX, (iii) clone celulare, individuale, secretoare de factor rFVIII scurtat (BDD-FVIII) (5...10 μ U/celulă/zi, în mediu fără ser), derivate din celulele HKB11 transfectate cu pCIS25DTR, după amplificare (MTX 400 nM) și clonare în diluție limitantă fără MTX și (iv) clone secretante de derivat de IL-4 (agonist selectiv IL-4, IL-4SA; mutație la nivelul resturilor de aminoacizi în două poziții,

RO 121563 B1

T13D și R121E) (5 pg/celulă/zi), derivate din celule HKB11 transfectate cu pSH15,7, după amplificare cu MTX. Clona HKB secretantă de IL-4SA, 1G2, a fost utilizată pentru producerea relativ rapidă de mici cantități de proteină (de ordinul gramelor). Harta fizică a vectorilor menționați mai sus este reprezentată în fig. 2.

Liniile celulare, umane, hibride, descrise în prezenta cerere de brevet, prezintă caracteristici dezirabile ale liniilor celulare parentale din care provin. Liniile celulare HKB care sunt obținute prin fuziunea celulelor renale, embrionare, umane (sau a unor celule derivate din celulele renale, embrionare, umane) cu celule de limfom Burkitt (sau cu celule provenite din celulele de limfom Burkitt, se utilizează la obținerea de linii celulare destinate expresiei proteinelor heteroloage.

Scopul inițial, pentru care s-a dorit crearea liniilor celulare, hibride, din 293S și 2B8, a fost rezolvarea problemei agregării celulelor 293S, care tind să se adune în grupuri atunci când sunt cultivate în suspensie (caracteristică nedorită). Celulele HKB obținute în urma procedurii de hibridizare, atunci când sunt cultivate în flacoane T, cresc în strat unic, însă, atunci când sunt cultivate în suspensie, aceste celule cresc sub formă de celule în suspensie (nu formează agregate celulare mari). Celulele HKB pot fi transfectate cu ușurință, iar randamentul transfecției este mult mai mare decât în cazul celulelor 293S.

Deși etapa de transformare sau hibridizare necesară în cele mai multe cazuri pentru obținerea unei linii celulare stabile poate determina alterarea profilului glicozilării (Yamashita, 1989, *J. Biol. Chem.* 264, pag. 2415...2423), s-a observat că HKB11, care este o linie celulară hibridă somatică, are enzime de glicozilare specific umane, de exemplu $\alpha(2-3)$ și $\alpha(2-6)$ sialiltransferaze. Mai mult, proteinele produse de celulele HKB transfectate prezintă modele de glicozilare tipic umane, cu legături $\alpha(2-3)$ și $\alpha(2-6)$ ale acidului sialic.

Pe scurt, celulele HKB sunt celule umane, hibride, cu proprietăți dezirabile de la fiecare linie celulară parentală din care provin; și anume pot fi cultivate cu ușurință în medii de cultură în suspensie, fără să apară fenomenul de agregare celulară (caracteristică a celulelor 2B8) și pot fi ușor transfectate, având proprietăți secretorii dezirabile (caracteristică a celulelor 293S). Linia celulară hibridă, umană, preferată, HKB11, este negativă în ceea ce privește expresia genei pentru imunoglobuline, ca și celulele 293S. Această trăsătură devine avantajoasă în cazul în care se dorește producerea prin recombinare a anticorpilor monoclonali de către celule umane. Descoperirea faptului că prin fuziunea unor celule umane s-au obținut celule cu caracteristici avantajoase încurajează continuarea cercetărilor cu celule 293S sau cu alte linii celulare care provin din celulele B, precum Namalwa și 6F11, pentru obținerea de noi combinații de trăsături în celulele hibride obținute prin fuziunea între diverse linii celulare parentale.

Exemplele de mai sus au scop explicativ, specialiștii în domeniu putând considera și alte variante de aplicare a invenției. Prin urmare, întinderea protecției acestei invenții este delimitată doar de revendicările de mai jos.

Revendicări

1. Celulă rezultată prin fuziunea unei celule 293, de origine renală, embrionară, umană, înregistrată cu numărul de colecție ATCC: CRL-12568, cu celula 2B8 cu origine în limfomul Burkitt și înregistrată cu numărul de colecție ATCC: CRL-12569.

2. Celulă în conformitate cu revendicarea 1, în care celula de origine renală, embrionară, umană este celula de origine 293S.

3. Celulă în conformitate cu revendicarea 1, ce exprimă o proteină heteroloagă.

RO 121563 B1

4. Celulă în conformitate cu revendicarea 3, în care proteina heteroloagă este selectată din grupul format din FVIII, BDD-FVIII, anticorp monoclonal, anticorp anti-TNF, rIL-4, tPA și EPO.

5. Linie celulară HKB11, înregistrată cu numărul de colecție ATCC: CRL-12568, care a fost modificată genetic, pentru a exprima o proteină heteroloagă.

6. Linie celulară în conformitate cu revendicarea 5, în care proteina este reprezentată de ICAM-1.

7. Linie celulară în conformitate cu revendicarea 5, în care proteina este reprezentată de BDD-FVIII.

8. Linie celulară în conformitate cu revendicarea 5, în care proteina este reprezentată de un anticorp monoclonal.

9. Linie celulară în conformitate cu revendicarea 8, în care anticorpul monoclonal este un anticorp monoclonal anti-TNF.

10. Linie celulară în conformitate cu revendicarea 5, în care proteina este reprezentată de rIL4.

11. Linie celulară în conformitate cu revendicarea 5, în care proteina este reprezentată de FVIII.

12. Linie celulară în conformitate cu revendicarea 5, în care proteina este reprezentată de tPA.

13. Linie celulară în conformitate cu revendicarea 5, în care proteina este reprezentată de EPO.

14. Linie celulară în conformitate cu revendicarea 5, în care proteina este reprezentată de IL-4SA (T13D/R121E).

15. Linie celulară în conformitate cu revendicarea 5, în care proteina este reprezentată de o proteină umană cu profil de glicozilare de tip uman.

16. Procedeu de obținere a celulelor hibride, umane, utilizate pentru expresia unei proteine heteroloage, **caracterizat prin aceea că** acesta cuprinde următoarele etape:

a) obținerea celulelor 293 de origine renală, embrionară, umană,

b) obținerea celulelor 2B8 cu origine în limfomul Burkitt și înregistrate cu numărul de colecție ATCC: CRL-12569,

c) punerea în contact a celulelor de la etapa a) cu celulele de la etapa b) în condiții care permit fuziunea celulară,

d) selecția celulelor din etapa c) pentru celule care secretă o proteină heteroloagă într-o cantitate superioară celei secretate de celulele ovariene de hamster chinezesc (CHO).

17. Procedeu în conformitate cu revendicarea 16, **caracterizat prin aceea că** celulele de origine renală, embrionară, umană sunt celule de origine 293S.

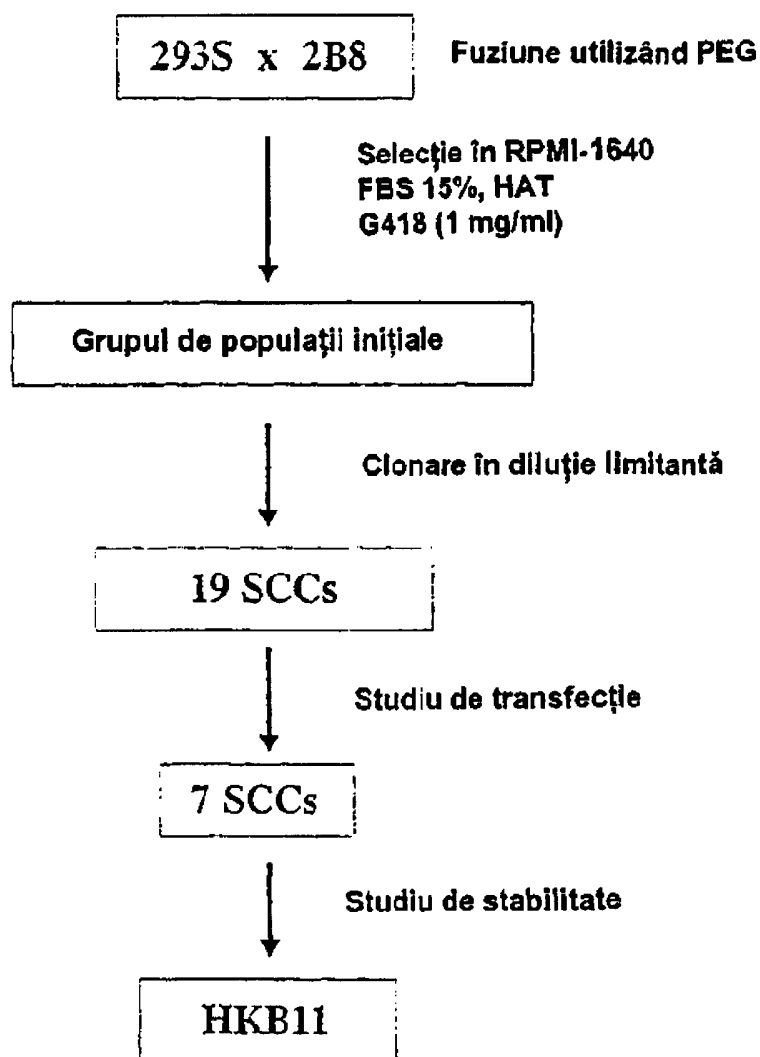


Fig. 1

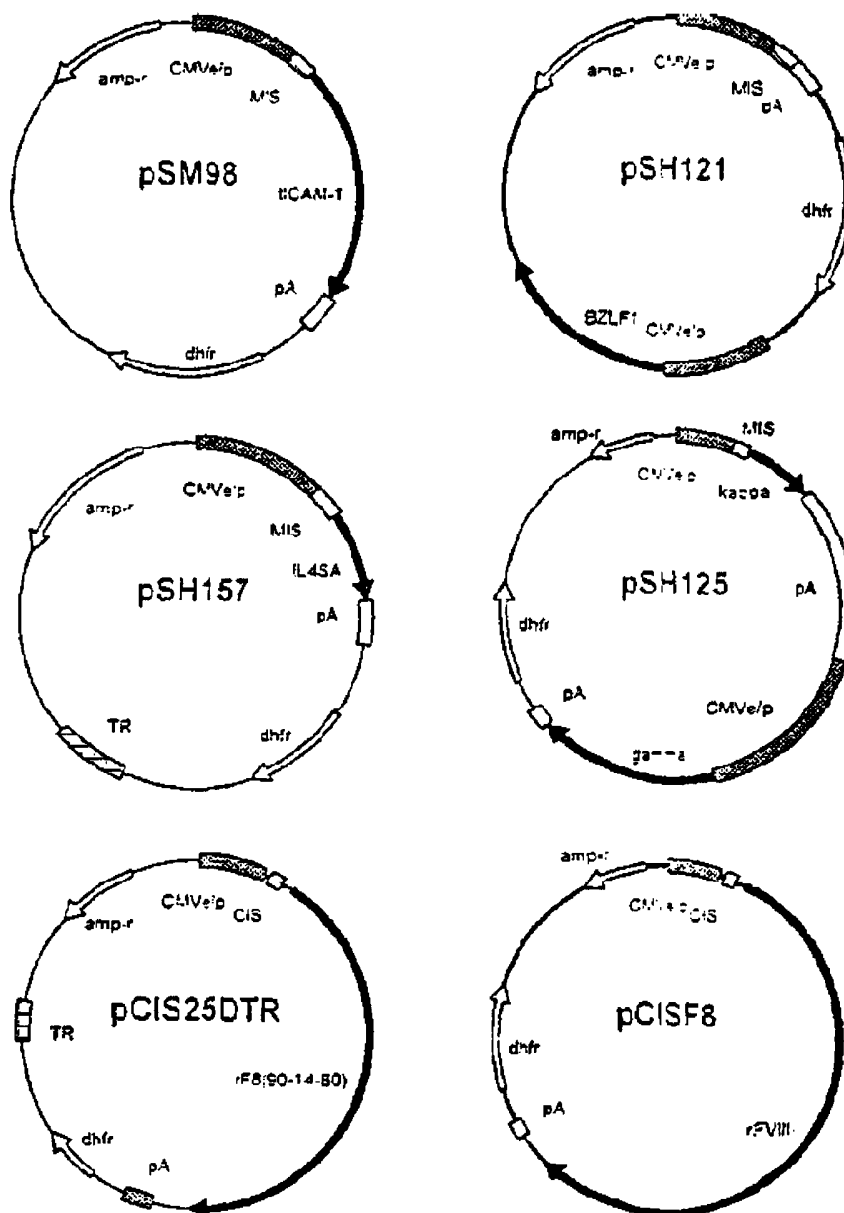


Fig. 2

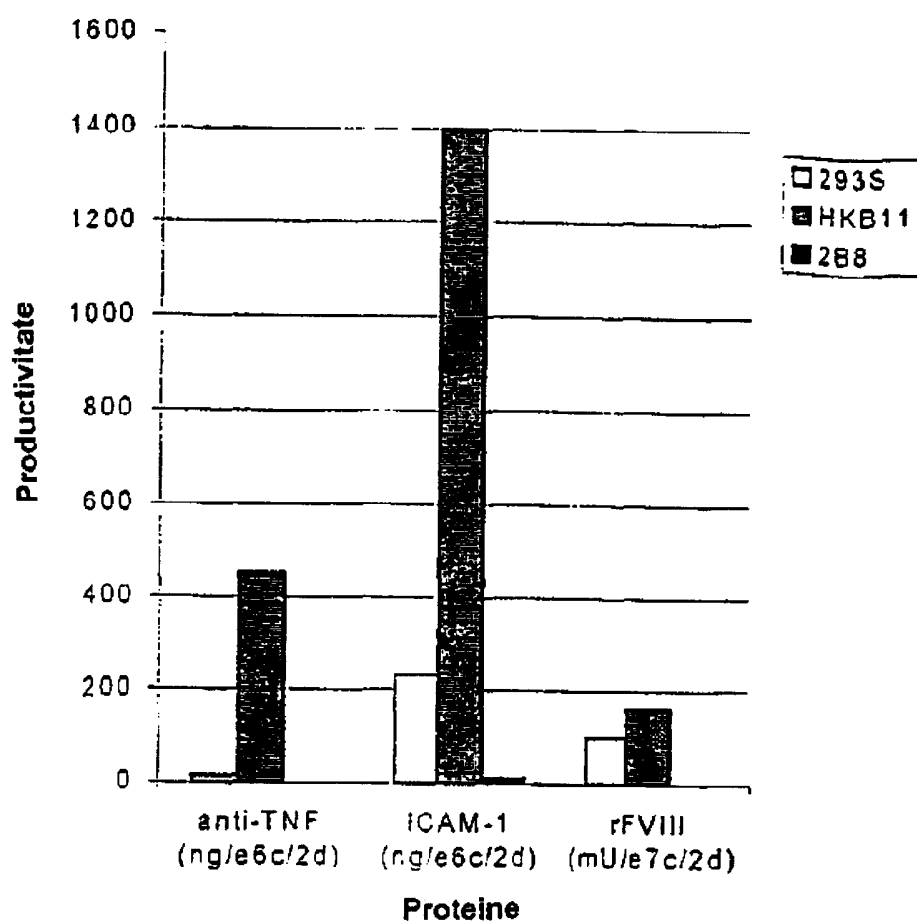


Fig. 3

