



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 299 317 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 5/20
C 07 K 15/28

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 344 303 4	(22)	28.09.90	(44)	09.04.92
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) siehe (73)
(72) Glaser, Ralf, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., DE
(73) Charité der Humboldt-Universität, Direktorat Forschung, Schumannstraße 20/21, O - 1040 Berlin, DE

(54) **Verfahren und Kit zur Klonierung von Zellen**

(55) Biotechnologie; Zellen; Klonierung; Hybridomzellen; monoklonale Antikörper; mAk; Latex;
Antikörper-beschichteter Latex; Antigen-beschichteter Latex; produzierende Zellen; Zellgemisch; Anfärbung;
Fluoreszenzmarkierung; Methylzellulose; Kit

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und einen Kit zur Klonierung von Zellen, insbesondere von Hybridomzellen. Die Aufgabe, aus einem Zellgemisch die produzierenden Zellen zu erkennen und zu isolieren, wurde dadurch gelöst, daß in einem halbfesten Zellkulturmedium (Methylzellulose; Softagar) die Zellen gemeinsam kultiviert wurden mit Latexpartikeln, an die das gesuchte Zellprodukt bindet, und es dort durch eine spezifische Anfärbung (fluoreszenzgekoppelter Antikörper oder Antigen) sichtbar gemacht wird. An der Hülle aus fluoreszierenden Latexpartikeln wird der produzierende Zellklon erkannt und kann isoliert werden. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Biotechnologie.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Klonierung von Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß Zellen einer Ausgangszelllinie zusammen mit Latexpartikeln kultiviert werden, wobei die Latexpartikel derart beschichtet sind, daß ein spezifisches Produkt X, das von einigen Zellen erzeugt wird, an den Latex bindet, dort durch Anfärbung sichtbar gemacht wird und die produzierenden Zellen erkannt, isoliert und weiter kultiviert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen der Ausgangszelllinie in einem halbfesten Kulturmedium, wie in einem Medium mit Methylzellulose, vorzugsweise 1 bis 3 Vol.-%, kultiviert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Hybridome aus Myelomzellen und B-Lymphozyten sind und zu gewinnende Subklone Antigen-spezifische Antikörper produzieren.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Latexpartikel mit Antikörpern (Ak) gegen die schwere Kette des gesuchten Ak beschichtet sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Latexpartikel antigenbeschichtet sind.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Anfärbung mit Hilfe von Farbstoffkonjugaten geschieht, die den Stoff X spezifisch binden, auch wenn dieser an die Latexpartikel gebunden ist, jedoch nicht zu einer Vernetzung des Stoffes X führen.
7. Verfahren nach Anspruch 1 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Farbstoffkonjugate fluoreszenzmarkierte Fab-Teile von Ak gegen die schwere Kette des gesuchten Ak sind.
8. Verfahren nach Anspruch 1, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Farbstoffkonjugat fluoreszenzmarkiertes monovalentes Antigen ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Latexpartikel mit Ak gegen den Stoff X beschichtet sind und die Farbstoffkonjugate fluoreszenzmarkierte Fab-Teile von Ak gegen den Stoff X sind, die nicht mit den für die Beschichtung des Latex verwendeten kompetitiv sind.
10. Kit zur Klonierung von Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß er aus
 - a) hochviskösem Zellkultur-Medium
 - b) einer Suspension von Latexpartikeln, die einen Stoff X, der von einigen Zellen erzeugt wird, spezifisch binden
 - c) Farbstoffkonjugaten, die den Stoff X spezifisch binden, auch wenn dieser an die Latexpartikel gebunden ist, jedoch nicht zu einer Vernetzung des Stoffes X führen, besteht.
11. Kit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in einem halbfesten Kulturmedium, wie in einem Medium mit Methylzellulose, vorzugsweise 1 bis 3 Vol.-%, kultiviert werden.
12. Kit nach Anspruch 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Hybridome aus Myelomzellen und B-Lymphozyten sind und zu gewinnende Subklone Antigen-spezifische Antikörper produzieren.
13. Kit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Latexpartikel mit Antikörpern (Ak) gegen die schwere Kette des gesuchten Ak beschichtet sind.
14. Kit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Latexpartikel antigenbeschichtet sind.
15. Kit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Farbstoffkonjugate fluoreszenzmarkierte Fab-Teile von Ak gegen die schwere Kette des gesuchten Ak sind.
16. Kit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Farbstoffkonjugat fluoreszenzmarkiertes monovalentes Antigen ist.
17. Kit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Latexpartikel mit Ak gegen den Stoff X beschichtet sind und die Farbstoffkonjugate fluoreszenzmarkierte Fab-Teile von Ak gegen den Stoff X sind, die nicht mit den für die Beschichtung des Latex verwendeten kompetitiv sind.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Kit zur Klonierung von Zellen durch Isolierung lebensfähiger Zellen aus Zellgemischen, wobei nur solche Zellen oder Zellklone gewonnen werden, die ein spezifisches Produkt ausscheiden. Desgleichen kann mit dem Verfahren der Anteil solcher Zellen in Zellgemischen bestimmt werden. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie sowie die biologische und medizinische Diagnostik.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Ein wichtiger Arbeitsschritt bei der Selektion neuer Zelllinien und Mikroorganismen besteht darin, aus einem Gemisch von Zellen einige wenige Zellen zu isolieren, die ein bestimmtes Produkt exprimieren und aus diesen wiederum Zellklone heranzuziehen. Der Anteil der produzierenden Zellen im Gemisch ist dabei häufig sehr gering.

Eine wichtige Anwendung für solche Selektionsschritte ist die Hybridomtechnik, wo B-Lymphozyten mit einer Myelomzelllinie fusioniert werden und aus dem entstehenden Gemisch von Fusionaten diejenigen selektiert werden, die einen bestimmten Antikörper produzieren (Köhler & Milstein, Nature 256 [1975] 495-497). Diese Primärzelllinien müssen noch ein- oder mehrmals kloniert werden, um stabile Linien zu erhalten, wobei jeweils wieder eine Selektion erforderlich ist. Besonders problematisch ist dieser Schritt bei humanen Hybridomen, die im Vergleich zu Hybridomen der Maus eine geringere Stabilität aufweisen, so daß zur Erzeugung stabiler Sublinien in der Regel drei oder mehr Klonierungsschritte erforderlich sind. Dabei dienen als Ausgangsmaterial oft Linien, die nur einen geringen Anteil produzierender Zellen aufweisen.

Dabei ist das gebräuchlichste Verfahren die Klonierung durch limiting dilution, bei dem in einer 96-well-Platte Subkulturen angelegt werden, so, daß möglichst nur eine Zelle pro Well zu einer neuen Kultur auswächst. Überstände oder Zellproben aus den einzelnen Wells werden dann auf das Vorhandensein des Produktes getestet.

Eine alternative Methode dazu stellt die Klonierung in halbfesten Medien dar, wobei eine große Zahl von Zellen in einem Well oder Kulturgefäß ausgesät wird, die sich jeweils zu einem eigenen Subklon entwickeln (Davis, M., Methods in Enzymology 121 [1986] 307-322; Civil, C.I., Banquerigo, M.L., ebenda 322-331). Durch das halbfeste Medium – meist Softagar oder Methylzellulose – wird gewährleistet, daß es nicht zu einer Vermischung unterschiedlicher Subklone kommt und mittels einer Pipette oder eines Mikromanipulators Zellen isoliert werden können, die von nur einer ausgesäten Zelle abstammen.

Dieses Verfahren ist sehr arbeitsaufwendig, da bisher keine Möglichkeit gefunden wurde, selektiv Subklone zu isolieren, die die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Es ist üblich, zufällig ausgewählte Subklone wieder in Flüssigkeitskulturen zu überführen und dann zu selektionieren. Der hohe Arbeitsaufwand hat dazu geführt, daß dieses Verfahren, obwohl es einige Vorteile gegenüber der limiting dilution Klonierung aufweist, weitgehend verdrängt wurde und heute nur in wenigen Zellkulturlabors zur Anwendung kommt (Kuo, C.Y., Chen, K.W., Fu, J., Lam, K.W., Lee, C.Y., Biotechnol. Appl. Biochem. 11 [1989] 89-95).

Des weiteren gibt es eine Reihe von Methoden, bei denen vor der eigentlichen Klonierung eine Anreicherung bestimmter Zellen vorgenommen wird, zum Beispiel die Klonierung mit Hilfe eines Fluoreszenz-Zellsorters, durch Panning oder Sortierung mittels Magnetbeads. Diese Methoden setzen jedoch stets voraus, daß die gesuchten Zellen das gewünschte Produkt als Oberflächenantigen tragen.

Die bisher gebräuchlichen Methoden zur Selektion der Zelllinien bzw. Klone nach einer Fusion oder Klonierung beruhen darauf, daß Überstand der Zelllinie oder ein Teil der Zellen des Wells entnommen und auf die Anwesenheit des gesuchten Produktes untersucht werden (Enzymimmunoassay, Radioimmunoassay, direkter oder indirekter Fluoreszenznachweis). Es ist sehr aufwendig, mit diesen Verfahren zu arbeiten, wenn nur wenige Zelllinien das gewünschte Produkt aufweisen.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, der Biotechnologie eine verbesserte Klonierungsmethode und einen für die Zellklonierung einsetzbaren Kit zur Verfügung zu stellen, womit auch bei einem geringen Anteil an Zellen, die den gewünschten Stoff produzieren, in der Ausgangskultur und bei ungünstigen Wachstumseigenschaften dieser Zellen eine effektive Isolierung produzierender Sublinien möglich ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und einen Kit zur Klonierung von Zellen zu entwickeln, mit dem bei möglichst geringem Aufwand eine größere Zahl an insbesondere Hybridomzelllinien, die einen bestimmten monoklonalen Antikörper (mAk) produzieren, erzeugt werden kann.

Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe dadurch gelöst, daß Zellen der Ausgangszellsuspension in einer Kulturplatte mit einem Methylzellulose-haltigen Medium vermischt werden, das Latexpartikel enthält, die mit Antigen bzw. Antikörper beschichtet sind. Überraschenderweise erfolgt eine spezifische Bindung entsprechender Zellprodukte an den Latex nur in unmittelbarer Umgebung der Zelle, wo sie durch Anfärbung sichtbar gemacht werden können. Damit lassen sich letztlich diejenigen Zellen und Zellklone erkennen, die ein spezifisches Produkt sekretieren. Diese können aus dem Methylzellulosemedium monoklonal isoliert und weiter kultiviert werden.

Im Gegensatz zur Zugabe gelöster Antikörper, die mit den Produkten der gesuchten Zellen Komplexe bilden und damit in vielen Fällen das Wachstum dieser Zellen hemmen, hat die Zugabe beschichteter Latexpartikel, wie experimentell beobachtet wurde, keinen negativen Einfluß auf das Zellwachstum. Auch kommt es nicht zu einer Hemmung des Wachstums der produzierenden Zellen, wenn zum Nachweis der Bindung des von den Zellen produzierten Stoffes an die Latexpartikel mit einem nicht toxischen Farbstoff markiertes Antigen oder Antikörper zugesetzt werden, sofern diese nur mit einer Bindungsstelle an das von den Zellen sekretierte Produkt binden und nicht zu dessen Vernetzung führen.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Latexpartikel werden durch Beschichten von Polystyren- oder einem anderen Latex mit einem Protein oder einer anderen Substanz hergestellt, die mit dem nachzuweisenden Stoff eine spezifische Bindung hoher Affinität eingeht.

Der zuzugebende Farbstoff wird an ein Protein oder einen anderen Stoff gekoppelt, der folgende Bedingungen erfüllt:

- er muß mit dem nachzuweisenden Stoff eine spezifische Bindung hoher Affinität eingehen
- diese Bindung darf nicht durch die Bindung des nachzuweisenden Stoffes mit dem beschichteten Latex blockiert werden
- es dürfen nicht mehrere Moleküle des nachzuweisenden Stoffes untereinander vernetzt werden.

Der erfindungsgemäße Kit zur Klonierung von Zellen, die einen Stoff X sekretieren, besteht somit aus

- a) einem hochviskösen, zum Beispiel Methylzellulose enthaltenden Zellkulturmedium
- b) einer Latexsuspension, deren Partikel den Stoff X spezifisch binden
- c) einer Farbstofflösung, mit der der Stoff X spezifisch angefärbt werden kann, wenn er an die Latexpartikel gebunden ist, die jedoch nicht zu einer Vernetzung von Molekülen des Stoffes X führt.

Für die Klonierung von Hybridoma zur Produktion monoklonaler Antikörper kann z.B. a) ISCOVE Medium mit 2% Methylzellulose, b) Polystyrenlatex, beschichtet mit affinitätsgereinigten Antikörpern der Ziege gegen die schwere Kette des Immunglobulins und c) FITC-konjugiertes Antigen verwendet werden.

In dem hochviskösen Zellkulturmedium werden die Zellsuspension und die Latexsuspension gleichmäßig verteilt. Die Farbstofflösung kann sofort oder später zugegeben werden. Nach 4–14 Tagen (je nach Teilungsrate der Zellen) ist es im Umkehrmikroskop unter abwechselnder Verwendung von Durchlicht und Fluoreszenz möglich, diejenigen Klone zu erkennen, die sich durch eine symmetrische Hülle aus fluoreszierenden Latexpartikeln auszeichnen und in deren unmittelbarer Umgebung sich keine anderen Zellen befinden. Nur diese Klone werden mit Hilfe einer spitzen Pipette oder eines Mikromanipulators „gepickt“ und in Flüssigkultur überführt. Das erfinderische Verfahren stellt eine Möglichkeit dar, im Vergleich zur herkömmlichen Klonierung in halbfesten Medien den überwiegenden Teil des Aufwandes für die Isolierung der Zellen und deren Anzucht einzusparen, da nur Zellklone isoliert werden müssen, die den gewünschten Stoff tatsächlich produzieren. Damit ist es möglich, einen gewünschten Zellklon selbst dann noch mit vertretbarem Aufwand zu isolieren, wenn der Anteil dieser Zellen im Ausgangsmaterial weniger als 0,1% beträgt. Die herkömmlichen Verfahren sind bei einem Anteil der gewünschten Zellen am Gemisch von weniger als 1% praktisch nicht mehr effektiv einsetzbar.

Ausführungsbeispiel

Fusionate zwischen humanen Lymphozyten eines mit Tetanustoxoid immunisierten Sponsors und CB-Fu2-Zellen (DD-WP 274446; ZIM-0314; Hinterlegungsstelle des Zentralinstitutes für Molekularbiologie der AdW der DDR, Berlin-Buch) wurden durch Elektrofusion gewonnen (Glaser, R. W., Jahn, S., Grunow, R., Allerg. Immunol. 35 [1989] 123–132) und auf eine 96-well-Platte (NUNC) ausgesät. In 6 Wells wurden 21 Tage nach der Fusion humane IgG-Antikörper gegen Tetanustoxoid gefunden. Die Antikörperkonzentrationen waren jedoch sehr gering.

In eine 24-well-Platte wurde je Well 0,8 ml Iscove-Medium (IMEM) mit 2% Methylzellulose eingefüllt und darauf je 0,25 ml einer Lösung folgender Zusammensetzung:

- 75% FKS
- 5% Glutamin-Stammlösung (100x)
- 10% HT-Stammlösung (50x)
- 10% Polystyrenlatex 61 nm, Feststoffgehalt 0,2%, vorinkubiert mit 0,4 mg/ml anti-human-Gamma Antikörper

Der Inhalt der 6 schwach positiven Primärwells wurde am 22. Tag nach Fusion in ca. 100 µl Zellkulturmedium suspendiert und auf je 4 Wells der 24-Well-Platte verteilt, wobei die zugegebene Menge pro Well etwa zwischen 5 und 50 µl variiert wurde. Nach 5 Tagen wurden pro Well 20 µl einer Lösung zugesetzt, die 100 mM Glutamin und 100 µg/ml FITC-gekoppeltes Tetanustoxoid enthielt.

8 Tage nach Ansetzen der Kulturplatte waren in mehreren Wells Klone von mehr als 4 Zellen mit einer fluoreszierenden „Hülle“ zu finden. Diese Wells waren aus drei Wells der primären Fusionsplatte hervorgegangen. In einigen Wells, die aus zwei weiteren Primärwells hervorgegangen waren, wurden Stellen gefunden, die eine Häufung der Fluoreszenz aufwiesen, denen jedoch keine normal aussehenden Zellklone zugeordnet werden konnten. Von den Klonen mit Fluoreszenzhülle, die jeweils zu einem der drei Primärwells gehörten, wurden 5, 8 und 8 in eine 96-well-Platte überführt, davon setzten 2, 7 bzw. 8 ihr Wachstum fort. In allen Wells, die Wachstum zeigten, wurde auch humanes IgG gegen Tetanustoxin im Enzymimmunoassay nachgewiesen. Von den fluoreszierenden Stellen, die nicht eindeutig Klonen zugeordnet werden konnten, wurden 4 isoliert, es kam jedoch in keinem Fall zum Auswachsen von Zellen aus diesen Strukturen.