



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 292 020 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 5/24

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 337 934 7	(22)	16.02.90	(44)	18.07.91
(71)	Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, O · 1080 Berlin, DE				
(72)	Glaser, Ralf, Dr. rer. nat. Dipl.-Biologe, DE				
(73)	Humboldt-Universität, Bereich Medizin (Charité), O · 1040 Berlin, DE				
(54)	Verfahren zur Klonierung von Zellen				

(55) Biotechnologie; Zellen; Klonierung; Hybridomzellen; Zellgemisch; produzierende Zellen; Erkennung; monoklonale Antikörper; mAK; Anfärbung; Fluoreszenzmarkierung; Softagar; Methylzellulose

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Klonierung von Zellen, insbesondere von Hybridomzellen. Die Aufgabe, aus einem Zellgemisch die produzierenden Zellen zu erkennen, wurde dadurch gelöst, daß sie anhand ihres erzeugten Produktes – insbesondere monoklonalen Antikörpern (mAk) – durch Anfärbung (Fluoreszenzmarkierung) in einem halbfesten Zellkulturmedium sichtbar gemacht, isoliert und kultiviert werden. Die Erfindung bezieht sich des weiteren auf die Bestimmung des Anteils produzierender Zellen in einem Zellgemisch. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Biotechnologie.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Klonierung von Zellen, **dadurch gekennzeichnet**, daß in Zellgemischen aus toten und lebensfähigen Zellen produzierende Zellen anhand ihres erzeugten Produktes – das durch eine Anfärbung sichtbar gemacht wird – erkannt, isoliert und kultiviert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Zellgemisch suspendiert und in einem halbfesten Trägermaterial kultiviert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zellen insbesondere Hybridzellen sind.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Anfärbung mittels Antikörpern gegen das gesuchte Produkt erfolgt, an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein ausgeschiedenes Produkt in der Umgebung der ausscheidenden Zelle bzw. des Zellklones durch Immunkomplexe fixiert wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das nachzuweisende Produkt ein Oberflächenantigen ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oberflächenantigen sich nur auf Vesikeln nachweisen läßt, die in die Umgebung der Zelle abgegeben werden.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Produkt sich nur in toten Zellen nachweisen läßt, daß jedoch lebende Zellen des gleichen klonalen Ursprungs isoliert werden können.
9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß der halbfeste Träger ein Nährmedium mit Methylzellulose (1 bis 3 Vol.-%) ist.
10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß der halbfeste Träger ein Softagar-Nährmedium ist.
11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zellen Hybridome aus Myelomzellen und B-Lymphozyten sind und das nachzuweisende Produkt ein Antikörper ist, der mittels eines zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörpers oder mittels fluoreszenzmarkierten Antigens nachgewiesen wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

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

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die schnelle Entwicklung der Biotechnologie hat dazu geführt, daß immer mehr neue Zelllinien und Mikroorganismen selektiert werden, die bestimmte Stoffe produzieren. In der Regel ist ein wichtiger Arbeitsschritt dabei, aus einem Gemisch von Zellen einige wenige Zellen zu isolieren, die das gewünschte Produkt aufweisen 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.

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; Civin, 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 (1988) 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 neue Klonierungsmethode zur Verfügung zu stellen, die bei einer Reihe von Problemen anwendbar ist, die sich mit den bisher bekannten Verfahren nicht mit vertretbarem Aufwand lösen lassen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren 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. Das Verfahren soll vor allem dann anwendbar sein, wenn nur ein sehr geringer Anteil der Zellen den gewünschten Antikörpern produziert, wie das insbesondere nach der Fusion humaner Zellen der Fall ist. Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe dadurch gelöst, daß in Zellgemischen die produzierenden Zellen anhand ihres erzeugten Produktes – das durch eine Anfärbung sichtbar gemacht wird – erkannt werden. Bei einer Reihe von Versuchen zur Kombination verschiedener Klonierungsmethoden mit Methoden zum Nachweis der gewünschten Antikörper hat sich überraschenderweise gezeigt, daß es unter bestimmten, im folgenden dargelegten Bedingungen möglich ist, in halbfesten Zellkulturmedien wachsende Zellklone direkt in diesen Medien mittels einer Antigen-Antikörperreaktion mit einem fluoreszenzgekoppelten Reaktionspartner zu markieren, ohne daß diese ihre Lebensfähigkeit einbüßen. Das ermöglicht es, unter dem Fluoreszenzmikroskop diejenigen Klone zu erkennen und zu isolieren, die ein bestimmtes Produkt ausscheiden, unabhängig davon, ob sie dieses Produkt als Oberflächenantigen exprimieren oder nicht.

Im Falle des Nachweises von Hybridomen, die humanes IgG erzeugen, durch Anfärben mit Fluoresceinisothiocyanat-gekoppeltem Immunglobulin der Ziege gegen humanes Fc-Gamma (ZAHr-FITC), läßt sich das folgendermaßen erreichen: In ein geeignetes Kulturgefäß werden $\frac{1}{6}$ des Volumens Zellkulturmedium mit Methylzellulose gefüllt. Das Ausgangszellgemisch wird einmal in Kulturmedium gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Sediment wird in fetalem Kälberserum (FKS) mit 10 mM Glutamin und 2–20 µg/ml ZAHr-FITC suspendiert und als restliches $\frac{1}{6}$ des Kulturvolumens zugegeben. Die Suspension wird gründlich mit dem halbfesten Medium vermischt.

Bereits nach 2–4 Stunden zeigt sich im Fluoreszenzmikroskop eine Anfärbung der Umgebung bestimmter Zellen. 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 Fluoreszenzhülle 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. Es lassen sich drei Möglichkeiten unterscheiden, wo die Fluoreszenz lokalisiert ist: Auf der Zelloberfläche (diffus, in Patches oder Caps), an von der Zelle in die Umgebung abgegebenen Vesikeln oder diffus in der Umgebung der Zelle als Immunpräzipitate. Es zeigt sich, daß bei den beiden letzteren Möglichkeiten nach Überführung der Klone in Flüssigkultur Antikörper im Überstand nachweisbar sind.

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 relativ geringem 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 % nur noch mit größtem Aufwand erfolgreich. Die allgemein übliche „limiting dilution“-Klonierung versagt völlig, wenn der Anteil der gewünschten Zellen gering ist und diese außerdem langsamer als die unerwünschten wachsen oder eine geringere Klonierungseffizienz aufweisen, was häufig der Fall ist. Verfahren wie die Anreicherung über Fluoreszenzaktivierten Zellsorter (FACS) oder vorherige Sortierung über Magnetbeads versagen, wenn das gewünschte Produkt nicht gleichzeitig als Oberflächenantigen in genügend hoher Dichte vorliegt.

Das erfinderische Verfahren ist für diese Probleme optimal anwendbar.

Das erfinderische Verfahren der direkten Anfärbung lebender Zellen oder ihrer Umgebung in halbfesten Medien hat sich bei einer Reihe weiterer Probleme bewährt. Es kann damit der Anteil der Zellen in einem Gemisch bestimmt werden, die einen bestimmten Stoff produzieren und in ihre Umgebung abgeben. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen gründlich gewaschen und in halbfestem Medium kultiviert, wobei eine Menge an Antikörpern gegen den gesuchten Stoff zugegeben wird, die etwa einer 1:1-Bindung an die insgesamt während der Inkubation zu erwartende Menge des produzierten Stoffes entspricht. Eine Doppelfärbung gegen zwei verschiedene Stoffe oder Komponenten eines Stoffes ist möglich.

Zellklone, die ein bestimmtes Produkt enthalten, aber nicht auf der Oberfläche präsentieren oder ausschleusen, können dann erkannt werden, wenn einige Zellen der Klons absterben und der zur Markierung benutzte Antikörper in die Zelle eindringt. In der Regel enthält der Klon dann noch genügend lebende Zellen des gleichen Ursprungs, die nach Überführung in Flüssigkultur anwachsen.

Ausführungsbefehl

Primärklonierung

Fusionate zwischen humanen Lymphozyten 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 zwei 96-well-Platten (NUNC) ausgesät. Es sollte monoklonales IgM von möglichst vielen verschiedenen Primärzelllinien gewonnen werden. 176 der 192 Wells enthielten wachsende Hybridome, davon produzierten 103 mehr als 100 ng/ml IgM. Aus statistischen Gründen ist anzunehmen, daß die meisten dieser Wells mehr als eine IgM-produzierende Primärlinie enthalten.

In zwei 24-well-Platten wurde je Well 0,8 ml Iscove-Medium (IMEM) mit 2% Methylzellulose eingefüllt und darauf je 0,2 ml FKS mit 10 mM Glutamin und 10 µg/ml FITC-gekoppeltes Ig gegen humane µ-Kette gegeben. In den Fusionsplatten wurde das Medium zu 90% gewechselt und die Zellen wurden in 250 µl suspendiert. Von den 48 Wells mit der stärksten IgM-Produktion wurden je 5 µl in eines der vorbereiteten Wells der 24-Well-Platte gegeben und mit der Pipettenspitze gleichmäßig verrührt.

Nach 9 Tagen waren in 46 der Wells Klone mit fluoreszierender „Hülle“ zu finden. Davon wurden jeweils 4 in einzelne Wells von zwei 96-well-Platten überführt (das ist der arbeitsaufwendigste Schritt). Nach 4 bzw. 8 Tagen (Geschwindigkeit des Anwachsens sehr unterschiedlich) waren bei 31 der Primärwells mindestens einer der isolierten Klone angewachsen, und es ließen sich 28 Zelllinien gewinnen, die über 100 ng/ml IgM produzierten und mit hoher Wahrscheinlichkeit monoklonal waren. Nach herkömmlicher limiting dilution Klonierung hätten dazu mindestens 40 96-Well-Platten angelegt und getestet werden müssen.

Sekundärklonierung nach erfolgloser Primärklonierung

Nach einer Fusion zwischen humanen Lymphozyten und CB-Fu2-Zellen wurde aus einem Primärwell, das signifikante Mengen humanes IgG gegen Tetanustoxin enthielt, eine limiting dilution Klonierung angelegt. Sämtliche Wells, die mit 1, 2 und 10 Zellen/Well ausgesät waren, waren im Test auf Immunglobulin G gegen Tetanus Toxin (aTET-IgG) negativ. Von den 48 Wells, in die 50 Zellen/Well ausgesät waren, zeigten alle 48 ein starkes Zellwachstum, aber nur 3 davon enthielten nachweisbare Mengen aTET-IgG, alle in geringerer Konzentration als das Primärwell. Eine weitere limiting dilution Klonierung ist unter diesen Bedingungen erfahrungsgemäß völlig aussichtslos. Es wurden 12 Wells einer 24-Well-Platte wie oben beschrieben vorbereitet, außer daß anstelle des anti-µ-FITC 2 µg/ml anti-τ-FITC (entsprechend 0,4 µg/ml in der Gesamtmenge) zugegeben wurden. Von den zwei am stärksten positiven Wells der 96-Well-Klonierungsplatte wurden in je zwei der vorbereiteten Wells ca. 100, 1000 und 10000 Zellen gegeben und vermischt. Nach 8 Tagen ergaben sich folgendes Bild: In den 4 Wells mit einer Einsaat von 100 Zellen waren keine fluoreszenzmarkierten Zellklone zu finden. In den Wells mit 10000 Zellen war es nicht möglich, die einzelnen Klone sicher zu unterscheiden oder gar einzeln zu isolieren. In den Wells mit einer Einsaat von 1000 Zellen fanden sich insgesamt neben mehreren 100 gut wachsenden, nicht fluoreszenzmarkierten Zellklonen einige Einzelzellen mit stark fluoreszierender Umgebung und 7 Zellklone mit deutlicher Fluoreszenzmarkierung. Diese und einige der Einzelzellen wurden in eine 96-Well-Platte auf eine Feederschicht aus Maus-Peritonealmakrophagen überführt.

Von den Einzelteilen wuchs keine an. Zwei der Zellklone wuchsen in Flüssigkultur an und produzierten beide aTET-IgG.

Untersuchung einer Zelllinie auf Monoklonalität

Eine humane Heterohybridomzelllinie (CB-STL-1) produziert humanes IgG mit Lambda-Ketten, der größte Teil der Zellen läßt sich jedoch zytoplasmatisch weder mit anti-Gamma, noch mit anti-Lambda-Antikörpern anfärben. Um den Anteil der produzierenden Zellen zu bestimmen, wurden CB-STL-1 Zellen gewaschen, in einer Konzentration von 2000 Zellen/ml in FKS mit entweder 5 µg/ml anti-human-Gamma-FITC oder 5 µg/ml anti-human-Lambda-FITC suspendiert und in Wells einer vorbereiteten 24-Well-Platte mit 0,8 ml IMEM mit 2% Methylzellulose verteilt. Nach 4 Tagen waren im Umkehrmikroskop deutlich Klone von 2 bis 8 Zellen zu erkennen, wobei eindeutig zwischen solchen mit und ohne Fluoreszenzmarkierung unterschieden werden konnte. Bei 160facher Vergrößerung wurden mehrere Gesichtsfelder ausgezählt. Es ergab sich ein Anteil von Klonen, die τ-Ketten produzieren, von 92%.