



(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 9048/81 US81/00778

(51) Int.Cl.⁵ : C12Q 1/18
C12Q 1/20

(22) Anmeldetag: 10. 6.1981

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 2.1990

(45) Ausgabetag: 27. 8.1990

(30) Priorität:

12. 6.1980 US 158685 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

US-A-4352880
'NATURE' 282, 1979, SEITEN 615 U. 616

(73) Patentinhaber:

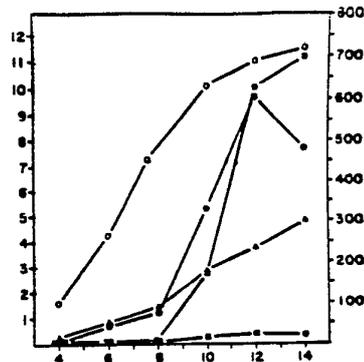
THE WISTAR INSTITUTE OF ANATOMY AND BIOLOGY
19104 PHILADELPHIA (US).

(72) Erfinder:

KNOWLES BARBARA B.
WEST CHESTER (US).
ADEN DAVID P.
PHILADELPHIA (US).

(54) VERFAHREN ZUM BESTIMMEN DER STOFFWECHSELUMWANDLUNG BESTIMMTER CHEMIKALIEN UND WIRKSTOFFE

(57) Es soll ein Verfahren zum Bestimmen der Stoffwechselumwandlung bestimmter Chemikalien und Wirkstoffe, insbesondere potentieller Karzinogene und Mutagene geschaffen werden, das dadurch gekennzeichnet ist, das eine Kultur einer Human-Leberzell-Linie in einem Nährmedium gehalten, die Zell-Linie der zu testenden Chemikalie oder dem Wirkstoff ausgesetzt und die Kultur auf die Gegenwart von Metaboliten der Chemikalie oder des Wirkstoffes analysiert wird.



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bestimmen der Stoffwechselumwandlung bestimmter Chemikalien und Wirkstoffe, insbesondere potentieller Karzinogene und Mutagene.

Es sind viele Versuche unternommen worden, Zellkultursysteme für Stoffwechselstudien von Chemikalien zu entwickeln, insbesondere für kurzfristige Proben auf mögliche Karzinogene und Mutagene. Die allgemein für solche Zwecke verwendeten Zellkulturen stammen von Nagern und obgleich sie Chemikalien, die allgemein als Karzinogen angesehen werden, aktiv im Stoffwechsel umsetzen, unterscheiden sich die Stoffwechselprodukte von solchen, die in normalen Primärkulturen menschlicher Herkunft entstehen. Human-Fibroblasten-Zellstämme sind auf ihre Fähigkeit getestet worden, potentielle Karzinogene und Mutagene in aktive Karzinogene umzuwandeln, ihre Fähigkeit zu solchen Stoffwechselumwandlungen ist aber gering.

Mit dem Kultivieren von Viren zur Produktion von Vakzinen ist eine Reihe von Problemen verbunden. Insbesondere anspruchsvolle Viren, wie Hepatitis B-Virus (HBV), sind in Zellkulturen nicht erfolgreich vermehrt worden. So müssen zu raschem Wachstum befähigte Zellkultursysteme, die die Produktion von viralen Komponenten unterstützen, gefunden werden, damit ein Vakzin von solchen anspruchsvollen, überempfindlichen Viren erzeugt werden kann.

Ein Hauptziel dieser Erfindung besteht darin, stabile Leberzell-Linien zu produzieren, die für Wirkstoff-Stoffwechselstudien und besonders zur Auslese potentieller Karzinogene und Mutagene brauchbar sind.

Erfindungsgemäß wird vorgeschlagen, daß

a) eine Kultur einer Human-Leberzell-Linie in einem Nährmedium gehalten,

b) die Zell-Linie der zu testenden Chemikalie oder dem Wirkstoff ausgesetzt und

c) die Kultur auf die Gegenwart von Metaboliten der Chemikalie oder des Wirkstoffes analysiert wird.

Es genügt so, Leberzell-Linien zu produzieren, die bei der Erzeugung von Hepatitis B-Viruskomponenten, woraus Vakzine hergestellt werden können, brauchbar sind.

Die Erfindung wird anhand der Zeichnungen beispielsweise näher beschrieben. Es zeigen Fig. 1 ein Diagramm der Zeit in Kultur (Tage) gegen die Anzahl der lebensfähiger Zellen $\times 10^{-6}$, und die Konzentration von Komponenten von Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen (HBsAg), Human-Albumin und Human- α -Fetoprotein (AFP) im Überstand der Kultur, und Fig. 2 ein Autoradiogramm, das HBsAg in einer Kontrollprobe und in der Zell-Linie Hep 3B gemäß der Erfindung und das Fehlen in Hep G2 der Erfindung zeigt, ist.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden neue stabile Zellen erzeugt, die sich zur Verwendung in Stoffwechselstudien, bei der Karzinogenese und/oder Mutagenese und bei der Herstellung von Vakzinen eignen. Die Zell-Linien werden durch Züchten menschlichen Hepatokarzinoms oder Hepatoblastoms auf letal bestrahlten Zellernährungsschichten in Gegenwart eines geeigneten Kulturmediums erhalten. Wenngleich die Erfindung auf die Erzeugung neuer Zell-Linien aus irgend einem Human-Hepatom anwendbar ist, wird sie hier nachfolgend ausführlicher insbesondere mit der Erzeugung zweier spezieller Zell-Linien, als Hep G2 und Hep 3B bezeichnet, beschrieben. Diese Zell-Linien sind beim Wistar Institute of Anatomy and Biology, 36th and Spruce Streets, Philadelphia, Pennsylvania, 19104, und bei der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, hinterlegt worden. Die Zell-Linien Hep G2 und Hep 3B haben die ATCC-Nummern HB 8065 bzw. HB 8064 erhalten.

Mit Hep G2 und Hep 3B bezeichnete Zell-Linien entstammten Biopsien während ausgedehnter Lobektomien eines 15 Jahre alten kaukasischen Mannes aus Argentinien (1975) bzw. eines 8 Jahre alten schwarzen Jungen aus den Vereinigten Staaten (1976). Die Zellen, aus denen die mit Hep 3B bezeichnete Zell-Linie abgeleitet wurde, enthielten Hepatitis B-Virus, wie durch die Bezugnahme auf die nachfolgend erörterten Figuren 1 und 2 zu sehen ist. Doch zieht diese Erfindung auch das Infizieren von Zellen mit HBV in Betracht, um HBsAg-Komponenten zur Vakzine-Verwendung zu produzieren.

Scheibchen der so erhaltenen bösartigen Tumore werden auf letal bestrahlten Mäusezellschichten, mit STO bezeichnet, in einem Zellkulturmedium gezüchtet, das aus Williams E-Medium (Gibco) (beschrieben in Experimental Cell Reseach 89 (1974) S. 135-142), ergänzt durch 10 % fetales Rinderserum (Reheis, Armour Pharmaceuticals), bestand. Mit dem Ausdruck "letal bestrahlt" ist gemeint, daß die Zellen bis zu einem solchen Grad bestrahlt worden sind, daß sie zur Reduplikation nicht mehr befähigt sind. Diese Arbeitsweise fördert das Wachstum differenzierter Zellen mit anspruchsvollen Wachstumsbedürfnissen, während ein übermäßiges Wachstum kontaminierender Fibroblastenzellen verhindert wird.

Die Anfangsperiode des Zellwachstums kann über einen Zeitraum von wenigstens etwa 3 Wochen stattfinden und kann, wenn gewünscht, viele Wochen fortgeführt werden. Gewöhnlich ist eine anfängliche Wachstumsperiode von etwa 4 Wochen ganz zufriedenstellend, worauf Zellkolonien getrennt und auf neue bestrahlte Mäusezellen (STO)-Ernährungsschichten überführt werden. Vor der Überführung können Zellen aus Kolben, die einzelne große Kolonien enthalten, durch Trypsinisieren auseinander gelöst werden (0,25 % Trypsin, 0,1 % Äthylendiamintetraessigsäure in Dulbecco's modifizierter Phosphat-gepufferter Salzlösung ohne Calcium- und Magnesiumsalze). Die Zellkolonien werden anschließend mindestens etwa 60 Reihenpassagen auf STO-Ernährungsschichten unterworfen, was zeigt, daß sie etablierte, routinemäßig wachsende Zell-Linien sind, wobei jede Passage eine Dauer von etwa 1 Woche hat.

Sublinien sowohl von Hep G2 als auch Hep 3B, die die Gegenwart der STO-Ernährungsschicht nicht mehr benötigen, wurden ausgewählt (vier Jahre und zwei Jahre nach Durchführung der Biopsien im Falle von Hep G2

bzw. Hep 3B). Solche Sublinien vermehren sich, wenn etwa 1×10^6 Zellen in 12 ml Zellkulturmedium gebracht werden, wie z. B. Eagle's essentielles Minimalmedium (beschrieben in Virdogg 8, S. 396 (1959) bzw. In Vitro Bd. 6, Nr. 2, S. 93), ergänzt durch 10 % fetales Rinderserum in einem Kolben, der etwa 75 cm^2 Wachstumsfläche für die Zellen nach dem Aufbringen auf das Substrat enthält. Wenngleich das oben beschriebene Kulturmedium bevorzugt wird, können andere Kulturmedien-Zusammenstellungen für die Unterstützung des Wachstums dieser Zell-Linien verwendet werden.

Diese zwei speziellen Zell-Linien wurden wie folgt charakterisiert:

1. Chromosomenzahl:

Hep G2 - die modale Zahl der Chromosomen ist 55 (Bereich 5056). Die Zell-Linie enthält ein Marker-Chromosom, das eine Umlagerung des Chromosoms 1 ist.

Hep 3B - die modale Zahl ist 60 mit einer subtetraploiden Erscheinungsform von 82. Diese Zell-Linie enthält ein Marker-Chromosom, das eine Umlagerung des menschlichen Chromosoms 1 ist.

2. Menschliche Plasmaproteine:

Die in der Zellkultur-Flüssigkeit einer jeden Zell-Linie (Hep G2 und Hep 3B) abgesonderten Produkte sind sowohl durch die Ouchterlony-Doppeldiffusions-Immunfällungsanalyse (unter Verwendung von im Handel erhältlichen Antikörpern zu Human-Plasmaproteinen) und durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert worden und sind die folgenden normalen Human-Plasmaproteine:

Tabelle I

	Humanprotein	Zell-Linie	
		Hep G2	Hep 3B
	α -Fetoprotein	+	+
	Albumin	+	+
	α -2-Makroglobulin	+	+
	α -1-Antitrypsin	+	+
	α -1-Antichymotrypsin	+	+
	Transferrin	+	+
	Haptoglobin	+	+
	Ceruloplasmin	+	+
	Plasminogen	+	+
	G _c Globulin	-	+
	Komplement (C'3)	+	+
	Komplement (C'4)	+	+
	C'3-Aktivator	+	-
	α -1-Säure-Glycoprotein	+	+
	Fibrinogen	+	+
	α -2-HS-Glycoprotein	+	+
	Retinsäure bindendes Protein	+	+
	β -Lipoprotein	+	+

3. Produktion von HBsAg:

Die Produktion von HBsAg wurde in der Hep 3B-Zell-Linie unter Verwendung des AUSRIA II (Abbott Labs)-Festphasen-Radioassay (RIA)-Satzes, siehe "Antibody To Hepatitis B Surface Antigen 125 (Human), Abbott Kabartoris Nov. 1981, der positive Werte mit einer Standardkurve unter Verwendung von gereinigtem HBsAg vergleicht, quantifiziert. Vgl. Fig. 1, in der die Kurve mit Punkten in Form ausgefüllter Quadrate ng HBsAg in dem Zellkultur-Überstand gegen die Zeit darstellt, die Kurve mit nicht-ausgefüllten Quadratpunkten ng HBsAg im Zell-Lysat darstellt und die Kurve mit ausgefüllten Dreieckspunkten μg Human-Albumin darstellt. Die übrigen Kurven mit Punkten in Form von ausgefüllten bzw. nicht-ausgefüllten Ovalen bedeuten μg alpha-Fetoprotein und die Zahl lebender Zellen, beginnend mit 10^6 Hep 3B-Zellen in 15 ml Eagle's essentiellm Minimalmedium, ergänzt durch 10 % fetales Rinderserum.

Die Komponenten des HBsAg, synthetisiert durch Hep 3B, wurden durch Pulsmarkieren der Zellen bestimmt, indem diese 5 Stunden 5 ml Eagle's essentiellm Minimalmedium frei von fetalem Rinderserum, aber 1 mCi ^{35}S -Methionin enthaltend ausgesetzt wurden und 1,5 ml ^{35}S -Methionin-markierter Zell-Überstand mit 10 μl Meerschweinchen-Anti-HBsAg und dann mit 20 λ Kaninchen-Antiserum zu Meerschweinchen-Immunglobulin G inkubiert wurden. Nach einer Inkubation über Nacht wurden Immunkomplexe durch Zentrifugieren erhalten,

gewaschen und erneut in einer Lösung suspendiert, die 1 m an Dithiothreitol, 2 %ig an Natriumdodecylsulfat war, und der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf einem 7,5-15 %igen Linear-Gradientengel unterworfen, getrocknet und einem Kodak NST2-Film ausgesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in dem Autoradiogramm der Fig. 2 veranschaulicht, aus der zu ersehen ist, daß die Komponenten p 23 und p 27 des HBsAg aus der Probe von Hep 3B erhalten werden (s. Gelbahn 2). Diese Komponenten sind auch in der Kontrollprobe vorhanden, die gereinigtes HBsAg enthält (Gelbahn 1), fehlen aber bei Hep G2, das nicht mit HBV infiziert war (Gelbahn 3).

Die Produktion von HBsAg-Komponenten durch die Zell-Linie Hep 3B, die das Hepatitis B-Virus-Genom enthält, zeigt, daß diese Komponenten zur Verwendung bei der Vakzine-Erzeugung gereinigt werden können, oder daß durch Infizieren von nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugten hepatischen Zell-Linien ähnliche Komponenten zur Verwendung bei der Bereitstellung einer HBV-Vakzine erhalten werden können.

Die folgenden nicht-beschränkenden Beispiele veranschaulichen verschiedene Ausführungsformen der Erfindung.

Beispiel I

Dieses Beispiel veranschaulicht die Verwendung der mit Hep G2 bezeichneten erfindungsgemäßen Zell-Linie für Stoffwechselstudien, insbesondere zur Auswahl möglicher Karzinogene und Mutagene.

Ineinanderlaufende Kulturen von Hep G2-Zellen wurden 24 h 4,0 nMol/ml ³H-Benzo(a)pyren (BP) in Medium ausgesetzt; das meiste der Radioaktivität wurde im Medium rückgewonnen. Ein beträchtlicher Teil des BP wurde zu wasserlöslichen Metaboliten im Stoffwechsel umgesetzt, die nach Behandlung mit β-Glucuronidase chloroformextrahierbare BP-Chinone und 3-OH-BP lieferten. Aus dem chloroformextrahierbaren Material in der Hep G2-Zellkultur entstanden die folgenden Metaboliten:

Tabelle II

<u>Metabolit</u>	<u>Prozent Metaboliten bezogen auf Gesamt-BP</u>
BP-9,10-diol	14
BP-7,8-diol	7
Chinone	6

So setzt die Hep G2-Zell-Linien BP im Stoffwechsel zu einer Reihe oxidierter Derivate um, darunter den unmittelbaren karzinogenen Metaboliten BP-7,8-diol.

Studien der in den Hep G2-Zellen gebildeten BP-DNA-Addukte lieferten die folgenden Ergebnisse: von 4,0 nMol ³H-BP/ml Medium waren nach 48 h über 97 % vom Stoffwechsel verarbeitet. Die aus diesen Kulturen isolierte DNA enthielt 28,2 pMol an gebundenem BP/mg DNA. Die BP-DNA-Addukte gleichen denen, die in Primärorgankulturen aus menschlichem Gewebe gebildet werden. Da allgemein angenommen ist, daß polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und viele andere Klassen von Karzinogenen eine Stoffwechsel-Aktivierung zur Hervorrufung ihrer biologischen Wirkungen erfordern und die Hep G2-Zellen diese Verbindungen in die aktivierte Form im Stoffwechsel umwandeln, können die Hep G2-Zellen als Aktivatoren von Karzinogenen in einem an Zellen gebundenen Mutationstest mit anderen Säugetierzellen verwendet werden.

Beispiel II

Hep 3B wurde 0,5 nMol ³H-BP/ml 24 h in Medium ausgesetzt, und 76 % des ³H-BP wurden in wasserlösliche Zwischenstufen im Stoffwechsel umgewandelt. Von dem mit Chloroform extrahierten Material waren 76 % unverändertes ³H-BP, aber kleine Mengen an BP-9,10-diol und dem BP-7,8-diol wurden nachgewiesen.

Wie zuvor angegeben, sollten die erfindungsgemäßen Zell-Linien beim Kultivieren von Viren, insbesondere anspruchsvollen Viren, wie HBV, brauchbar sein. Bei einer solchen Verwendung können Einschichtenkulturen der besonderen Zell-Linie, z. B. Hep G2, entweder Dane-Teilchen aus Seren infizierter Patienten oder HBV-DNA, aus einer solchen Quelle gereinigt, ausgesetzt werden. Nach etwa einstündiger Absorption an die einlagige Schicht in kleinen Mengen des Kulturmediums kann zusätzliches Zell-Linien-Kulturmedium zugesetzt und die die Zell-Linie enthaltenden Kolben mehrere Tage inkubiert werden. Die Überwachung der Kulturen nach Standard-Techniken zum Nachweis viraler Antigene, wie oben in Verbindung mit der Zell-Linie Hep 3B beschrieben, bestimmt die optimale Zeit für das Ernten der Zellkulturen und die Virusantigen-Reinigung. Die so erzeugten Antigene, z. B. HBsAg, können zur Produktion von Vakzinen verwendet werden.

Enthält das im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Ausgangs-Hepatokarzinom schon das HBV-Genom, wie es bei dem Quellmaterial der Fall ist, aus dem die Hep 3B-Zell-Linie erhalten wurde, kann das von der Zell-Linie synthetisierte HBsAg zur Erzeugung einer Vakzine verwendet werden.

Vorteilhafterweise liefert eine erfindungsgemäße, HBV enthaltende Zell-Linie, z. B. Hep 3B, eine alternierende Quelle für HBsAg, wodurch die Produktion und die Qualität des Antigens gesteuert werden kann. Experimente mit Hep 3B zeigen, daß nur ein Teil des viralen Genoms zugegen ist und daß infektiöse virale Teilchen von dieser Zell-Linie nicht produziert werden, wodurch die Gefahr der HBV-Infektion beseitigt ist. Die Reinigung des HBsAg aus dem Zellkulturmedium für die Vakzine-Produktion kann nach einer Reihe von auf dem Fachgebiet gut bekannten Methoden erfolgen.

Eine Alternativmethode zur Herstellung von HBsAg aus den erfindungsgemäßen Zell-Linien umfaßt die Verwendung von rekombinanter HBV-Plasmid-DNA in einem in vitro HBsAg synthetisierenden Bakterium. Zur Herstellung einer diese Technik anwendenden Vakzine wird die gesamte Zell-RNA, von der cDNA-Kopien gebildet werden, oder DNA aus der HBsAg-produzierenden Zell-Linie isoliert und mit Restriktionsenzymen verdaut, die nicht die HBV-DNA verdauen oder das HBsAg kodierendes Segment intakt lassen (z. B. Hind III), gefolgt von einer Anreicherung der HBV-DNA, entweder durch Hybridisieren an Filter, die fixierte Dane-Teilchen-DNA enthalten, und Elution von den Filtern, oder durch Elution von Elektrophorogrammen nach Lokalisation an einem Teil des Gels mit radioaktiv markierter, von Dane-Teilchen stammender DNA. Nach Reaktion mit dCMP-Resten unter Verwendung von Nucleotidyl-Terminal-Transferase kann die DNA zum Plasmid pBR322 hybridisiert, mit PST-1 gespalten und mit dGMP-Resten als Schwanz versehen werden, und E. coli kann mit Hybridplasmiden transformiert und auf HBsAg-produzierende Kolonien nach auf dem Fachgebiet gut bekannten Methoden geprüft werden. HBsAg-positive Klone können dann ausgewählt, vermehrt werden und die Vakzine-Produktion aus diesen Klonen würde weiter gehen (Wu, R., Herausgeber; Methods in Enzymology, Band 68, Academic Press, N.Y., zur rekombinanten DNA-Arbeitsweise insgesamt).

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Bestimmen der Stoffwechselumwandlung bestimmter Chemikalien und Wirkstoffe, insbesondere potentieller Karzinogene und Mutagene, **dadurch gekennzeichnet**, daß

- a) eine Kultur einer Human-Leberzell-Linie in einem Nährmedium gehalten,
- b) die Zell-Linie der zu testenden Chemikalie oder dem Wirkstoff ausgesetzt und
- c) die Kultur auf die Gegenwart von Metaboliten der Chemikalie oder des Wirkstoffes analysiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zellen und Metaboliten in Kulturen anderer Säugetierzellen zur Bestimmung ihrer Mutagenität eingeführt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Zell-Linie eingesetzt wird, welche durch Züchten einer Biopsie eines menschlichen Lebertumors auf letal bestrahlten Zellernährungsschichten in Gegenwart eines Kulturmediums erhalten wurde.

4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zell-Linie Hep G2 eingesetzt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zell-Linie Hep 3B eingesetzt wird.

Hiezu 1 Blatt Zeichnung

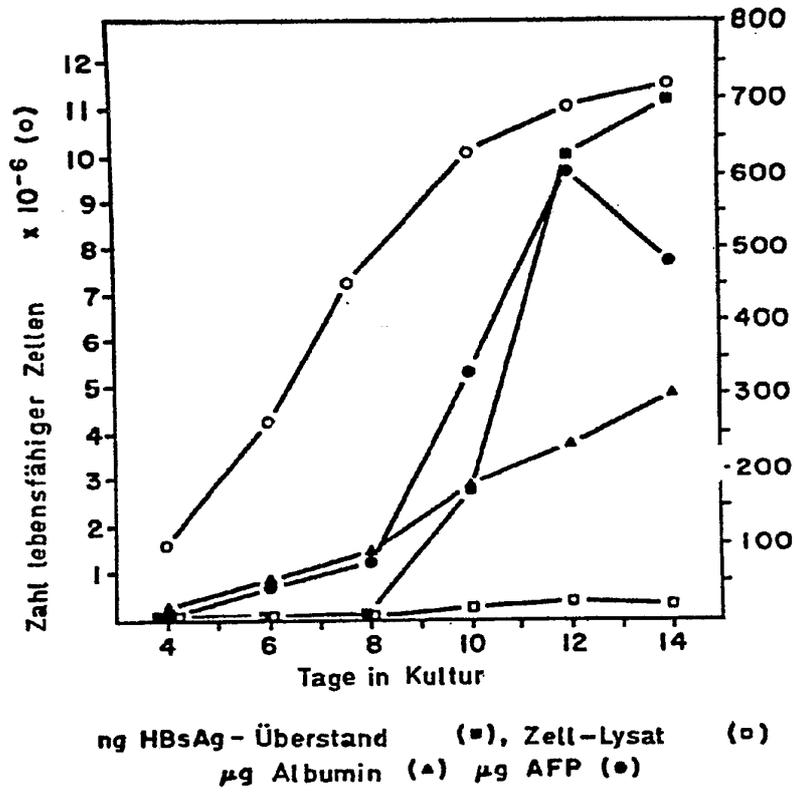


FIG. 1

Molekulargewicht x 10⁻³
200 96 68 45 29 17
| | | | | |

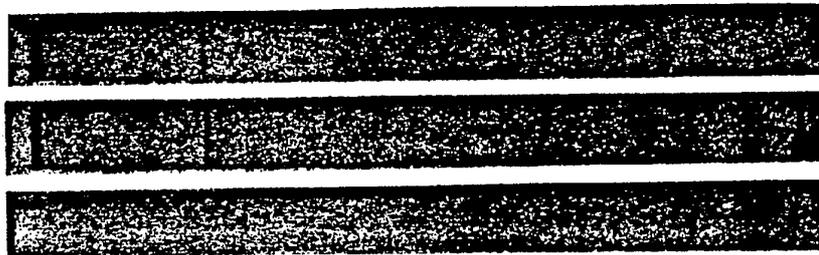


FIG. 2

