



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU UTLAGGNINGSSKRIFT

85282

C (45) Patentti- ja rekisterihallitus
Patentti- ja rekisterihallitus
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12N 5/00, 15/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	831509
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	03.05.83
(24) Alkuperä - Löpdag	03.05.83
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	05.11.83
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	13.12.91
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
04.05.82 DE 3216650 P	09.12.82 DE 3245665 P

(71) Hakija - Sökande

1. Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 112-132, Mannheim-Waldhof, BRD, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Jungfer, Herbert, Beringerweg 10, Tutzing, BRD, (DE)
2. Barchet, Heinrich, Bräuhäusstrasse 3, Tutzing, BRD, (DE)
3. Albert, Winfried, Moosstrasse 10, Pähl, BRD, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä jatkuvien eläin- ja humaanisolulinjojen valmistamiseksi ja niiden käyttäminen
Förfarande för framställning av permanenta djur- och humancellinjer

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää jatkuvien eläin- ja humaanisolulinjojen valmistamiseksi fuusioimalla normaaleja eläin- ja humaanisoluja biologisten komponenttien kanssa, jotka aikaansaavat viljeltävyyssyvyn in vitro. Normaaleja eläin- tai humaanisoluja fuusioidaan muunnettujen solujen solufragmenttien kanssa, jotka eivät yksinään ole lisääntymiskykyisiä, ja viljellään elatusaineessa ilman valinta-aineita. Näin saadut jatkuvasti viljeltävät solulinjat soveltuvat ennen kaikkea solutuotteiden valmistamiseen ja tehoaineiden kokeiluun.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av permanenta djur- och humancellinjer genom fusionering av normala djur- och humanceller med biologiska komponenter, som åstadkommer odlingsbarhet in vitro. Man fusionerar normala djur- eller humanceller med ensamt för sig icke förökningsdugliga cellfragment av transformerade celler och odlar dem i ett kulturmedium utan selektionssubstanser. Så erhållna permanent odlingsbara cellinjer ägnar sig framför allt för utvinning av cellprodukter och prövning av verk samma substanser.

Menetelmä jatkuvien eläin- ja humaanisolulinjojen valmistamiseksi ja niiden käyttäminen

Keksintö koskee menetelmää, jonka avulla voidaan valmistaa jatkuvasti viljeltäviä eläin- tai humaanisolulinjoja ja käyttää näin saatuja solulinjoja solun aineiden valmistukseen. Jo kauan on yritetty sekä tieteellisistä että käytännöllisistä syistä viljellä pysyvästi ihmis- ja eläinsoluja normaalista eläin- tai ihmiskudoksesta riippumattomina. Tämä ei ole tähän asti onnistunut tyydyttävästi ja ainoastaan harvoissa erikoistapauksissa on saatu aikaan joillakin verisoluilla pysyvä viljely.

On tunnettua käyttää monoklonaalisten vasta-aineiden valmistukseen, joilla on määrätty antigeenin sitomisspesifisyys, ns. hybridomatekniikkaa. Tämän Köhler'in ja Milstein'in kehittämän menetelmän mukaisesti [Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256, 495-497 (1975)] voidaan yksittäinen vasta-ainetta (AK) muodostava solu tehdä potentiaalisesti "kuolemattomaksi" ja lisäännyttää sitä mielin määrin. Fuusioimalla AK-muodostavia soluja (B-lymfosyytti) maligniksi muuttuneen solun (myeloman) kanssa voidaan luoda soluhybridieja, joissa yhdistyvät molempien emosolujen ominaisuudet: kyky valmistaa vasta-ainetta ja kyky kasvaa jatkuvasti. Uusi sana "hybridoma" on muodostettu hybridi-solun ja myeloman yhdistämisestä.

Tämän tekniikan erikoisuuksien helpommin ymmärtämiseksi esitetään vasta-aineiden (immunoglobuliini, Ig) rakenteen ja synteesin eräitä perusteita. Ig-molekyyli muodostuu kahdesta identtisestä kevyt-(L)- ja kahdesta identtisestä raskas(H)-ketjusta. Kukin H- ja L-ketju on jakautunut geneettisesti ja funktionaalisesti erilaisiin osiin. Vasta-aineen antigeenin sitoutumispaikat (englanniksi: combining sites) ovat muodostuneet ns. muuttuviin alueisiin, joissa on korkea-asteinen sekvenssiheterogeenisyys. Useat aminohappovaihdokset synnyttävät suuren valikoiman kolmi-

ulotteisia rakenteita, jotka ovat antigeenien suuren joukon kanssa komplementtisiä muodoltaan. Arvioidaan, että imettävällä on 10^6 - 10^7 erilaista antigeenin sitoutumispaikkaa.

Vasta-aineet ovat B-lymfosyyttien synteesituotetta. B-solun onkogeenisen kehityksen aikana kantasolusta kombinoituu yksi useista käytettävissä olevista muuttuvan alueen geeneistä suhteellisesti harvojen, pysyvien-alueiden-geenien kanssa, sekä L- että H-ketjussa. Niin pian kuin geeni-assosioituminen on tapahtunut, on kyseessä oleva B-solu jo määräytynyt siten, että se muodostaa vain yhden ainoan vasta-ainemolekyylylityypin, ja tämä määräytymisen periytyy sen tytärsoluihin. Ilman antigeenin stimulointia B-solu pysyy lepotilassa eikä proliferoitu. Se tuottaa ja erittää vain vähän immunoglobuliinia, mutta se kantaa solumembraaniinsa lujasti kiinnittyneenä vasta-aineita, joilla on tarkasti sama antigeenin sitoutumispaikka kuin eristetyillä vasta-aineilla. Kun jokin antigeeni tunkeutuu organismiin, se esitellään B-soluille lukuisten monimutkaisten solujen vuorovaikutusten yhteydessä.

B-solun, jonka membraanin immunoglobuliini reagoi antigeeniin spesifisesti, on pakko jakautua ja muodostaa kloonit tytärsoluista, jotka erilaistuvat vasta-aineita tuottaviksi soluiksi (plasmasoluiksi). Koska B-soluklooni muodostaa vasta-aineita, joilla on identtinen rakenne ja identtiset antigeenin sitoutumispaikat, nimitetään tällaisen kloonin tuotetta "monoklonaaliseksi vasta-aineeksi". Kompleksisen rakenteen omaavat antigeenit kuten proteiinit, mikro-organismit tai solut sisältävät useita erilaisia antigeeni-vaikutuskohtia (determinantit, epitoopit) ja sen johdosta stimuloituvat useat eri B-solut jakautumaan ja muodostamaan klooneja. Tämän vuoksi muodostuu suuri joukko vasta-aineita, jotka eroavat toisistaan suuruutensa, varauksensa, spesifisyytensä ja affiniteettinsä suhteen ja esiintyvät immuniseerumissa yhdessä. Mutta myös yhtä ainoata determinanttia vastaan suunnattu immunivaste on tavallisesti polyklonaalinen. On tunnettua, että hiiret voivat muodostaa jopa 10^3 erilaista vasta-ainetta yhtä yksinkertaista hapteenia vastaan, so. yhtä eristettyä determinanttia vastaan. Nämä tosiseikat

valaisevat, että on erittäin vaikeata, ellei mahdotonta tuottaa uudelleen jäljennettävästi antiseerumia jotakin antigeeniä vastaan. Sen vuoksi on useita vuosia etsitty menetelmää, jonka avulla voitaisiin yksittäisiä B-soluja laajentaa klonaalisesti, jotta päästäisiin tällä tavoin homogeenisiin monoklonaalisiin vasta-aineisiin. Luonnollisia esikuvia ovat olleet myelomat tai plasmasytomit, joita on tunnettu jo kauan maligneina sairauksina hiirillä, rotilla ja ihmisillä. Myeloma syntyy, jos B-solu muuttuu maligniksi ja proliferoituu hillittömästi, jolloin kloonit muodostaa tytärsoluista suuria määriä homogeenisiä vasta-aineita. Myelomia voidaan indusoida joihinkin umpisii-toshiirilaatuihin kemiallisen manipuloinnin avulla. Kaikki yritykset päästä kombinoimalla hyperimmunisointi ja myeloma-indusointi monoklonaalisiin vasta-aineisiin, joilla on tunnettu antigeenin sitoutumisspesifisyys, ovat kuitenkin jääneet tuloksettomiksi. Nämä ponnistelut ovat kuitenkin johtaneet myelomasolulinjoihin, joita voitiin viljellä in vitro ja jotka ovat tulleet hybridoma-teknologian perusteeksi. Milstein'in ja Köhler'in perusidea oli kehittää hybridisolu fuusioimalla immunisoiduista eläimistä saatuihin normaaleihin B-soluihin viljeltävä ja jatkuvasti kasvava myelomasolu.

Ensimmäisissä kokeissaan he yhdistivät myelomasoluja hiiren pernasta oleviin lymfosyytteihin, jotka oli immunisoitu lampaan erytrosyyttien kanssa. He saivat 10 elinkykyistä hybridiä, joista kaksi muodosti vasta-aineita spesifisesti lampaan erytrosyyttejä vastaan. Vasta-aineita tuottavat hybridit olivat niin paljon myelomasolujen kaltaisia, että ne kasvoivat jatkuvasti viljelyssä ja muodostivat tuumoreita, kun ne istutettiin syngeneisiin hiiriin. Suuri käytännön hyöty oli myös siitä, että hybridisoluja samoin kuin myelomasoluja voitiin varastoida nestemäisessä typessä ja säilyttää ne elinkykyisinä pitkiä aikoja.

Hybridoman valmistuksen tekniikka

Hiiret immunisoidaan kuten konventionaalisessa antiseerumin valmistuksessa antigeenilla, ja tavallisesti tämä toistetaan

useiden viikkojen välein. Välittömästi ennen fuusioimista hiiri tapetaan ja sen perna leikataan pois aseptisissa olosuhteissa. Pernapussi avataan ja pernapulpa työnnetään varovaisesti ulos. Pernalymfosyytit (noin 10^8 solua) suspendoidaan soluviljelyn elatusaineeseen ja sekoitetaan myelomasolujen kanssa suhteessa 1:1-10:1. Soluseos sentrifugoidaan ja painetaan tiiviisti putken pohjalle ja kun yläpuolella oleva neste on poistettu, sitä käsitellään fuusioväliaineen kanssa (30-50-prosenttinen polyetyleni-glykoliliuos tai suspendoituja inaktivoituja Sendai-viruksia). Kun fuusioväliaine on pesty pois, siirretään soluseos, jonka solutiheys on noin 10^6 solua/ml steriileihin viljelyastioihin (täplälevyt) ja niitä viljellään inkubaattorissa, johon johdetaan CO_2 -kaasua. 2-4 viikon kuluttua fuusiosta tulee hybridoma-kloonin kasvu näkyviin mikroskoopissa. Tästä ajankohdasta lähtien voidaan viljelyn yläpuolella olevasta nesteestä tutkia vasta-aineiden olemassaoloa, jotka ovat halutun spesifisyyden omaavia. Tähän tarvitaan analyysimenetelmiä, joiden avulla saadaan selville alle mikrogramman suuruusluokkaa olevat vasta-aineet (RIA, ELISA, immunofluoresenssi). Positiivisten osaviljelyjen solut sen jälkeen kloonataan, so. perustetaan yksittäissoluviljelyjä. Eristetyt kloonit, jotka muodostavat "oikeata" vasta-ainetta, laajennetaan ja ne ruiskutetaan tuumorin indusointia varten Pristanilla esikäsiteltyjen syngeneisten hiirien vatsaonteloon (tavallisesti Balb/c umpisiitettyjä hiiriä). 6-20 päivän kuluttua ympäyksen jälkeen voidaan saada tuumorin alettua kasvaa verestä tai etupäässä vatsaontelosta (aszites) homogeenisiä vasta-aineita (tuotos on 30-150 mg monoklonaalisia vasta-aineita hiirtä kohti).

Fuusion jälkeen on olemassa hyvin heterogeeninen seos hybridejä ja ei-fuusioituneita soluja. Sellaisesta erästä, joka sisältää 10^8 hiiren pernasolua, voidaan laskea saatavan maksimaalisesti 10^3 elinkykyistä hybridomasolua. Koska hybridisolut tarvitsevat määrätyn käynnistysajan ennen kuin ne voivat alkaa proliferoitumisen, mutta ei-fuusioituneet myelomasolut sen sijaan jatkavat heti kasvuaan, on varmistettava valintamenetelmällä vähien hybridomien eloonjääminen. Standardivalintamenettely hybridoma-

tekniikassa perustuu ns. HAT-valintaelatusaineeseen [Littlefield, J.W.: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 145, 709-710 (1964)7]. A tarkoittaa aminopteriinia, foolihappo-antagonistia, joka salpaa DNA-synteesin päätien. Normaalit solut voivat väistää aminopteriinisalpauksen tymidiini-kinaasin (TK) ja hypoksantiini-guaaniini-fosforibosyyli-transferaasin (HGPRT) avulla, mikäli niille annetaan viljelyelatusaineeseen tymidiiniä (T) ja hypoksantiinia (H). Jos solulta puuttuu toinen näistä kahdesta entsyymistä, silloin se ei ole HAT-väliaineessa elinkelpoinen. Hybridoma-kehittämisessä käytetään sen vuoksi myelomasolujen mutantteja, joilta puuttuu TK tai HGPRT. Nämä solut ovat HAT-väliaineessa vain silloin elinkelpoisia, kun ne ovat fuusioituneita normaalin solun kanssa, joka tuo geenipoolinsa kanssa puuttuvan entsyymin hybridisoluun. Ei-fuusioituneilla pernan lymfosyyteillä on viljelyssä luonnollisesti rajoittunut elinikä, eivätkä ne sen vuoksi merkitse mitään uhkaa hybridomalle.

Hybridoman valmistuksessa esiintyy nyt seuraavia ongelmia:

1. Selektio HAT-väliaineen avulla

Ei-fuusioituneiden myelomasolujen kasvun selektiivinen tukahduttaminen on, kuten edellä on esitetty, hybridoma-kloonien tuottamisen olennainen edellytys. Mutta HAT-selektio on myös normaaleille, ei-vajaille soluille erittäin epäfysiologinen menetelmä, joka vaikuttaa solujen jakaantumis- ja elinkelpoisuuskykyyn. Erikoisesti ihmisen lymfosyyttien tapauksessa on äärettömän vaikeata sovittaa HAT-väliaineen komponentteja konsentraation puolesta siten, että HGPRT-negatiiviset solut kuolevat varmasti ja HGPRT-positiiviset solut sen sijaan voivat jäädä eloon.

Epäsuhdetta yhtäältä käytettyjen lymfosyyttien ja myelomasolujen lukumäärän ja toisaalta lisääntymiskykyisten hybridien tuotoksen välillä valaisevat seuraavat luvut: kun lisätään 10^8 hiiri-lymfosyyttiä tyyppilliseen fuusioliuokseen, pidetään 500 hybridomakloonia yleensä oikein hyvänä tuloksena. Koska yhden hiiren pernassa - vaikka se on usein (hyper)-immunisoitu - ainoastaan yksi 10^4 - 10^3 solusta muodostaa vasta-ainetta immunogeeniä

vastaan (kuten on osoitettu Jerne'n levytekniikassa, N.V. Jerne ja A.A. Nordin: Science 140, 405 (1963)), täytyisi puhtaasti sattumanvaraisessa hybridoman muodostamisessa kasvattaa 10^3 - 10^4 kloonia, jotta voisi odottaa yhtäkään kloonia, jolla on haluttu vasta-ainespesifisyys. Ihmishybridoman valmistuksessa on epäsuhte vieläkin karkeampi: pidetään hyvänä tuloksena, jos fuusioita kohti saadaan 4-10 hybridi-kloonia.

2. Kromosomimenetykset

Onnistuneen fuusion jälkeen täytyy vastasyntyneen hybridisolun tulla toimeen noin kaksinkertaisen kromosomimäärän kanssa kuin mitä luonto on alunperin aikonut. Kuten käytännön kokemus on osoittanut, on hybridisoluilla taipumuksena "kadottaa" kromosomeja. Jokaisessa solun jakautumisessa on olemassa vaara, koska kromosomeja on epäfysiologinen ylimäärä, että nämä eivät jakaudu tasan molempiin tytärsoluihin. Sillä tytärsolulla, joka saa vähemmän tästä ylimäärästä ja jota ei sen vuoksi enää pidetä luksustuotannossa mukana, on muihin nähden valintaetu ja siitä tulee dominoiva solu viljelyssä. Mutta immunoglobuliinin synteesi ei ole hybridisolun elinkelpoisuudelle tärkeätä, vaan se merkitsee "luksus" synteesisuoritusta. Tuottamattomien varianttien ilmestyminen hybridoma-kloonissa on sen vuoksi tavallinen tapahtuma ja vaatii hankalia uudelleenklonaustoimenpiteitä kloonin tuotantokyvyn varmistamiseksi. Taipumus menettää kromosomeja on erikoisen voimakkaasti esillä lajien välisten hybridien kohdalla.

3. Hybridi-immunoglobuliini

Myelomasolut ovat maligneja B-soluja ja muodostavat itse immunoglobuliinia (antigeenien sitoutumisspesifisyys on tuntematon). Tämän kyvyn tuo myelomasolu kuten normaali B-solu mukanaan hybridomaan. Koska Ig-molekyylin eri ketjut syntetisoidaan erillään ja vasta jälkeenpäin kootaan täydellisiksi vasta-aineiksi, syntyy yhdessä hybridomasolussa, johon on syntetisoitu kaksi erilaista L- ja H-ketjua, sattumasta riippuen 10 erilaista kombinaatiota, joista etsitty "oikea" vasta-aine on ainostaan

1/16 koko Ig-määrästä. Sen vuoksi on jo kehitetty suurin kuluksin hiiri-myeloma-solu-mutantteja, jotka itse eivät muodosta mitään H- tai L-ketjuja. Ihmislymfosyyttien fuusiota varten ei kuitenkaan vielä tähän mennessä ole käytettävissä yhtä pitkäle kehitettyä myelomalinjaa.

Vielä vakavampia ongelmia on olemassa hybridomatekniikan vaihtoehtoissa:

1. B-lymfosyyttien tekeminen kuolemattomiksi virusten avulla Normaalilta luovuttajalta saatuja ihmisen B-lymfosyyttejä voidaan muuttaa maligneiksi infektoimalla Epstein-Barr-viruksen (EBV) avulla. EBV-ympättyjä, lymfoblastoideja soluja voidaan viljellä in vitro jatkuvasti ja kloonata. Verrattuna hybridomaan tuottavat EBV-lymfoblastoidilinjat kuitenkin vain 1/10 tai vähemmän immunoglobuliineja ja tuottamisstabiilisuus on epätyydyttävä. Oletetaan, että B-solut jossakin aikaisemmassa erilaistumisvaiheessa määräytyvät EBV:n vaikutuksesta ja sen vuoksi saadaan suhteettoman usein klooneja, jotka tuottavat IgM:ää hyvin pienessä määrin.

Analogisella tavalla voidaan hiiren B-lymfosyyttejä muuntaa Abelsonin hiirileukemiaviruksen (MuLV) avulla. Myös tässä tapauksessa määräytyvät lymfosyytit epäedullisesti varhaisessa erilaistumisvaiheessa ja ovat huonoja vasta-aineen tuottajia.

2. Ei-muunnettujen B-lymfosyyttien pitkäaikaisviljelyt Uusimmat julkaisut [B. Spredni et al. Long-term culture and cloning of nontransformed human B-lymphocytes. J. Exp. Med. 154, 1500-1516 (1981), M. Howard et al. Long-term culture of normal mouse B-lymphocytes. Proc.Natl.Acad.Sci. USA lehdistöissä] tekevät selkoa mahdollisuudesta viljellä ja kloonata B-lymfosyyttejä jatkuvasti ilman muuntamista erikoisissa viljelyolosuhteissa (jatkuva mitogeeninen stimulointi; lymfokiini-konditoidut elatusaineet jne.). Monoklonaalisten vasta-aineiden rutiininomaiseen valmistukseen eivät nämä menetelmät kuitenkaan varmasti vielä sovellu.

Tekniikan taso voidaan sen vuoksi esittää yhteenvetona seuraavasti:

Normaaleilta luovuttajilta saatuja B-lymfosyyttejä voidaan tehdä keinotekoisesti "kuolemattomiksi". Hybridomatekniikka käyttää eläviä, viljelyssä rajattomasti lisääntymiskykyisiä myelomasoluja, jotka fuusioidaan antigeenillä stimuloitujen B-lymfosyyttien kanssa. Solu-solu-fuusion kautta aikaansaadut hybridisolut eristetään HAT-valinnan avulla ja kloonataan perustamalla yksittäissoluviljelyjä. Hybridomakloonit, jotka muodostavat vasta-aineita, joilla on haluttu spesifisyys, pannaan lisääntymään monoklonaalisten vasta-aineiden massatuotantoa varten. Huomattavia haittoja esiintyy kuitenkin HAT-valinnan yhteydessä kromosomien häviön ja hybridin immunoglobuliinin vuoksi.

Eräässä toisessa menetelmässä muunnetaan B-lymfosyyttejä maligneiksi infektoimalla spesifisten virusten avulla ja muutetaan ne jatkuvasti kasvaviksi soluiksi säilyttämällä vasta-ainesynteesi. Ne ovat kuitenkin tunnetusti heikkoja vasta-aineen tuottajia.

Mitä tulee monoklonaalisten vasta-aineiden massatuotantoon, joilla on määrätty antigeenin sitoutumisspesifiteetti, on hybridomatekniikka selvästi parempi kuin vaihtoehtoinen tekniikka.

Mutta myös hybridomatekniikassa on painavia varjopuolia. Tärkein varjopuoli on siinä, että menetelmä rajoittuu yhtäältä HAT-herkkiin fuusion osapuoliin, toisaalta harvoihin solulajeihin, nimittäin lymfositteihin ja hermosoluihin. Keksinnön tehtäväksi on asetettu poistaa nämä varjopuolet ja luoda uusi edullinen menetelmä, jolla voidaan jatkuvasti viljellä eläin- ja humaanisolulinjoja.

Tämä tehtävä ratkaistaan keksinnön mukaisesti menetelmän avulla, jolla saadaan jatkuvasti viljeltäviä eläin- ja humaanisolulinjoja fuusioimalla normaaleja eläin- ja humaanisoluja biologisten komponenttien kanssa, jotka aiheuttavat in vitro viljeltävyyskyvyn, ja menetelmä on tunnettu siitä, että normaaleja eläin-

ja humaanisoluja fuusioidaan muunnettujen solujen solufragmenttien kanssa, jotka eivät yksinään ole lisääntymiskykyisiä, ja viljellään näitä viljelyn elatusaineessa ilman valinta-aineita.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä on oleellista, että fuusiossa käytetyt fragmentit ovat täysin vapaita soluista, jotka ovat vielä lisääntymiskykyisiä, eivätkä ne yksinään voi myöskään enää lisääntyä.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä partnerin, joka ei ole suvustaan huonontunut, siis normaalin solun, sytoplasmaosan liikapaino ei yllättäen johda suvustaan huonontuneiden solujen malignien ominaisuuksien loppumiseen ja siten jatkuvan kasvukyvyn ehkäisyyn, vaikka on tunnettua, että muunnettujen solujen ja normaaliin, ei-malignien solujen sytoplasman fuusion kautta malignisuus häviää [W.J. Shay et al.: Suppression of tumorigenicity in Hybrids J. Supramol.St.Cell.Biochem. 16, 75-62 (1981)]. Samoin ei voitu etukäteen tietää yhtyvätkö solutumat malignien solujen eristettyjen tumien kanssa, esimerkiksi myelomatumien kanssa yhdeksi yhteiseksi genomiksi, jos myeloman sytoplasmaa ei tuoda mukana hybridiin.

Fuusioituminen tapahtuu tunnettujen menetelmien mukaan tarkoituksenmukaisesti fuusiogeenisten aineiden, etupäässä polyetyleeniglykolin tai Sendai-virusten läsnäollessa, koska tämän kautta, analogisesti hybridomatekniikan kanssa, aikaansaadaan fuusioitumistuloksen paraneminen. Ammattimies tuntee muitakin fuusiogeenisia aineita ja niitä voidaan myös käyttää.

Muunnettujen solujen esimerkiksi myelomasolujen fragmentteja voidaan saada tunnetuilla menetelmillä. Solun seinämä etupäässä joko liuotetaan tai särjetään mekaanisesti. Tarvittaessa voidaan sentrifugoimalla erottaa tumafraktiot sytoplasmafraktioista ja käyttää fraktioita yksinään. Parhaana pidetään liuottamista siten, että annetaan solujen paisua glyseriinissä ja siirretään ne sitten glyseriinivapaaseen puskuriliuokseen. Tämä aiheuttaa solun membraanien puhkeamisen. Eräässä toisessa

suositussa menetelmässä valmistetaan karyoplasteja ja sytoplasteja käsittelemällä soluja Cytochalasin B:n avulla, joka on kaupasta saatavaa antibioottia. Tämä menetelmä on tunnettu Biochem. Biophys. Res. Comm. 63:sta, 669-674 (1975). Tässä menetelmässä esiintyy eräänlainen "solunjakaminen" yhtäältä ainoastaan solun membraanin ympäröimään solutumaan, karyoplastiin ja toisaalta samoin membraanin ympäröimään, tumattomaan sytoplasmaan niin sanottuun sytoplastiin. Molemmat ovat osoittautuneet keksinnön piirissä samalla tavoin fuusioon sopiviksi kuin joko liuottaen tai mekaanisesti saadut solufragmentit tai tumat tai sytoplasmafraktiot, joita ei enää ympäröi solumembraani. Mekaaninen aukaisu voi tapahtua ammattimiehen hyvin tuntemien menetelmien avulla, joita ei tässä ole tarpeen selostaa.

Solufragmentit voidaan käyttää tuoreina välittömästi valmistuksensa jälkeen tai vasta myöhemmin fuusioimisessa, jolloin jälkimmäisessä tapauksessa on osoittautunut säilytyksessä lyofilisoitu tila edulliseksi.

Muunnetuilla soluilla tarkoitetaan sellaisia, jotka in vitro ja in vivo eivät enää tottele normaaleja kasvusääntömekanismeja. Esimerkkejä tästä ovat maligneiksi muuttuneet solut kuten syöpäsolut, virusinfektion muuttamat solut (esimerkiksi Eppstein-Barr-virus) ja karsinogeenisten aineiden muuttamat solut.

Jos keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään solufraktioita, ei näiden tarvitse olla täysin puhtaita, mutta ne eivät kuitenkaan saa sisältää mitään kokonaisia lisääntymiskykyisiä soluja.

Keksinnön olennainen tuntomerkki on se, että saatuja hybridejä ei panna kilpailemaan lajistaan huonontuneiden, ei-hybridien in vitro kasvatettavien solujen kanssa ja sen vuoksi niiden kasvua ei myöskään saa estää HAT-valinta-aineilla. Tällä tavoin poistetaan HAT-valinta-aineen hyvin epäedullinen vaikutus

hybrideihin ja saavutetaan ratkaiseva parannus tuotoksessa ja jatkuvasti viljeltävien solujen elinkyvyssä.

Lisäksi ei keksinnön mukaan ole enää edellytyksenä hybridin muodostukselle käyttää lajistaan huonontuneena soluna HAT-herkkää solua. On useita jatkuvasti kasvavia solulinjoja, joilla ei ole lainkaan HAT-herkkyyttä ja jotka eivät ole olleet konventionaaliselle hybridoma-tekniikalle käyttökelpoisia, mutta joita voidaan käyttää keksinnön piirissä fragmenttien valmistukseen fuusiota varten.

Solut pakotetaan cytochalasin B:n avulla (sienimetaboliitti) hyvin voimakkaasti pullistuen "pursottamaan" tumansa. Painovoimien vaikutuksesta (esimerkiksi sentrifugoiminen) repeää ohut sidos helposti poikki. Tällöin syntyy tumaton soluruumis (sytoplasti) ja tuma, jota ympäröi solun membraani ja kapea sytoplasmareuna (karyoplasti tai minisoluu). Karyoplasti ja sytoplasti eivät ole kumpikaan lisääntymiskykyisiä, mutta ne säilyttävät spesiaalifunktionsa joistakin tunneista muutamia päiviin. Tuman pursottaminen ulos vaatii suhteellisen korkean cytochalasin B:n konsentraation ja on niin kauan kuin yhteys ei katkea, täysin reversiibeli. Pienemmät cytochalasin B:n konsentraatiot estävät solun jakautumisen mitooseen jälkeen ilman tuman pursottamista. Standardimenetelmän sytoplastin ja karyoplastin valmistamiseksi ei-adherenteille soluille ovat selostaneet M.H. Wigler ja I.B. Weinstein: Preparative method for obtaining enucleated mammalian cells, Biochem.Biophys. Res.Comm. 63, 669-674 (1975).

On käynyt vielä selville, etteivät ainoastaan edellä mainitut B-lymfosyytit vaan myös kaikki muut tähän asti tutkitut eläin- ja ihmissolut voidaan tehdä "kuolemattomiksi" keksinnön mukaisesti (kts. esimerkit 6-8). Niin erilaisia solutyyppejä kuin T-lymfosyyttejä (solujen välittämän immunitetin kantajat ja immunisysteemin säätäjäsolut), endoteelisoluja (ihmisen napanuoralaskimoiden seinämsolut) ja melanomasoluja (eristetty alhaisessa lämpötilassa säilytetystä tuumorimetastaasimateriaalista) voitiin keksinnön mukaisen menetelmän avulla saada

jatkuvasti kasvamaan (kuolemattomiksi).

Täten on keksinnön mukaisen menetelmän avulla mahdollista ottaa viljelyyn mitä tahansa eläin- ja ihmissoluja ja ratkaista tällä tavoin probleema kuinka voidaan valmistaa solun tuotteita kuten esimerkiksi vasta-aineita, hyytymistekijöitä, entsyymejä ja muita solun syntetisoimia aineita in vitro. Keksinnön mukaiset viljelyt mahdollistavat myös sen, että kemiallisten aineiden tutkimuksissa käytetyt koe-eläimet tulevat suuressa määrin tarpeettomiksi.

Keksinnön kohteena on vielä keksinnön mukaisen menetelmän avulla valmistetun, jatkuvasti kasvatettavan solulinjan käyttäminen solun tuotteiden kuten monoklonaalisten vasta-aineiden, hyytymistekijöiden, lymfokininien, entsyymien ja muiden proteiineihin tai toisiin aineryhmiin kuuluvien solutuotteiden saamiseksi.

Keksinnön tämän toteutusmuodon mukaisesti voidaan erikoisesti, kun käytetään jatkuvasti kasvatettavia B-lymfosyyttejä, valmistaa monoklonaalisia vasta-aineita, kun käytetään jatkuvasti kasvatettavia endoteelisoluja, melanomasoluja, hepatosyyttejä, munuaissoluja ja muita niiden kaltaisia, saada hyytymistekijöitä, kun käytetään jatkuvasti kasvatettavia T-lymfosyyttejä + B-lymfosyyttejä tai/ja makrofageja saada lymfokiinejä, kun käytetään jatkuvasti kasvatettavia rauhassoluja saada rauhasten erittämiä tuotteita kuten hormoneja ja senkaltaisia. Huomataan siis, että aina keksinnön mukaisesti kuolemattomaksi tehtävien käytettyjen eläinsolujen laadun mukaan voidaan saada kaikkia hyödyllisiä solutuotteita, joten ei ole tarpeen tehdä niistä selkoa yksityiskohtaisesti.

Solutuotteiden saaminen ei ole kuitenkaan rajoittunut lähtösolujen tuotteisiin, siis homologisiin solutuotteisiin. Keksinnön mukaisesti saatuja jatkuvasti kasvatettavia solulinjoja voidaan käyttää myös sellaisten solutuotteiden ottamiseen solusta, joita lähtösolut eivät ole muodostaneet, siis jotka ovat heterologisia ja joiden geneettinen informaatio tuodaan vasta

geenien uudelleenkombinaation menetelmien mukaan jo pysyväiseen hybridisoluuun, jotka siis ovat heterologisia. Heterologisten solutuotteiden valmistaminen pysyväisen hybridisolun avulla voidaan saada aikaan esimerkiksi muuntamisen avulla. Kokeet ovat osoittaneet, että keksinnön mukaiseen pysyväiseen soluun voidaan tuoda vektorin avulla DNA:ta ja käyttää siten soluun tuodun DNA:n koodilla varustettujen tuotteiden ottamiseen solusta.

Keksinnön mukaisia jatkuvasti kasvatettavia soluja voidaan käyttää vielä, kuten mainittu, myös vaikutusaineiden kokeilun kohteina. Sen lisäksi voidaan keksinnön mukaan saatuja kuolematomia hybridisoluja käyttää myös geneettisen informaation lähteenä, joka koodaa halutut solutuotteet siten, että saadaan geneettisen informaation sisältävä hybridisolun osa siis sen genomi, genomien osia tai RNA:ta ja geenien uudelleenkombinoimismenetelmien mukaan muunnetaan sopivaksi mikro-organismiksi ja saadaan tästä jälkimmäisestä haluttua solutuotetta.

Keksinnön erään muunnelman mukaan voi solutuotteiden valmistaminen kuten monoklonaalisten vasta-aineiden ja muiden soluaineiden valmistaminen tapahtua myös niin, että muodostettuja hybridisoluja ei kasvateta suoraan solun tuotteiden valmistamiseksi varten tai aineiden synteesiä varten, vaan muutetaan niiden genomi tai genomien osia tai RNA:ta geenien uudelleenkombinoimismenetelmien mukaisesti sopivaksi mikro-organismiksi ja tätä jälkimmäistä kasvatetaan monoklonaalisten vasta-aineiden tai soluaineiden saamiseksi. Tässä keksinnön toteutusmuodossa eristetään hybridisolujen genomi ammattimiehen tuntemien menetelmien mukaisesti ja muutetaan se sopivan vektorin avulla, johon käytetään kaupasta saatuja vektoreja, tähän tarkoitukseen kehitettyjen standardimenetelmien mukaan sopivaksi mikro-organismiksi.

Muunnettua mikro-organismia viljellään sitten tavalliseen tapaan ja saadaan siitä haluttua solutuotetta. Mikro-organismina käytetään etupäässä erästä geenien uudelleenkombinoimisessa hyväksi osoittautunutta E.coli-kantaa.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä lisää. Niissä käytetään seuraavia lyhennyksiä ja tavaramerkkejä:

AK	Vasta-aine
Ig	Immunoglobuliini
H- tai L-ketju	"Raskas" tai "kevyt" Ig-molekyylien proteiiniketju
Pristan	2,6,10,14-tetrametyyli-pentadekaani
HAT-valintaelatus- aine	Elatusaine, joka sisältää hypoksantiinia, aminopteriiniä, tymidiiniä
TK	Tymidiini-kinaasi
HGPRT	Hypoksantiini-guaniini-fosforibosyyli-transferaasi
EBV	Epstein-Barr-virus
MuLV	Abelson-hiirileukemia-virus
CB	Cytochalasin B-antibiootti (Aldrich Biochemicals, Milwaukee, USA)
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DMEM	Dulbecco'n minimal essential medium
FKS	Vasikan sikiön seerumi
Ficoll	Polymeerinen raakasokeri (Pharmacia)
PEG	Polyetyleeniglykoli
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
POD	Peroksidaasi
ABTS	2,2'-atsino-di-(3-etyylibentsotiatsoliini-6-sulfonihapon ammoniumsuola)
EBSS	Earle'n tasapainoitettu suolaliuos
RPMI 1640	Rosewell Park Memory Institut (Medium) RPMI-(elatusaine)
Tris	Tris-(hydroksimetyyli)-aminometaani
PBL	Perifeeriset veri-imusolut
MNC	Mononukleaariset solut (lymfosyytit, monosyytit)
hTSH	Humaani tyreoidea stimuloiva hormoni
β -hTSH	...n β -ketju
FA	Freund'in apuaine
CFA	Täydellinen Freund'in apuaine
IFA	Epätäydellinen Freund'in apuaine
Methocel 1500	Metyylliselluloosa (FLUKA)

CMV	Sytoplasma-membraani-vesikkeli
FITC-Covaspheres	Fluoresein-isotiosyanaatti kuulien muodossa (Covalent Technicals Ann Arbor, Mich., USA)
EAZ	Ehrlich'in aszites-solut (ATCC; CCL 77)

Esimerkki 1

A. Linjan P 3X63 Ag 8.653 ATCC NO-CRL-1580 hiiren myelomasolujen karyoplastien ja sytoplastien valmistaminen analogisesti menetelmän kanssa, jonka ovat selostaneet M.H. Wigler ja I.B. Weinstein: A preparative method for obtaining enucleated mammalian cells. Biochem.Biophys.Res.Comm. 63, 669-674 (1975).

A.1 Ainekset. Cytochalasin B (CB, Aldrich Biochemicals, Milwaukee, USA) liuotettiin dimetyylisulfoksidiin (DMSO, Merck) (2 mg/ml) ja varastoitiin perusliuoksena 4°C:ssa.

Ficoll-400 (Pharmacia; polymeerinen ruokosokeri) liuotettiin uudelleentislattuun veteen (1 g/ml), pidettiin autoklaavissa ja varastoitiin 50-prosenttisena perusliuoksena -20°C:ssa.

Kertaalleen ja kahteen kertaan konsentroitunut Dulbecco'n minimum essential medium (DMEM), vasikansikiön seerumi (FKS), L-glutamiini (200 mmol/l), streptomysiini-penisilliini, valmistaja Boehringer Mannheim.

Selluloosanitraatti-putket steriloidtiin UV-säteilyllä.

Myelomasolulinja Ag 8.653 ATCC CRL-1580: Linja on selostettu julkaisussa J.F. Kearney et al.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibodysecreting hybrid cell lines. J.Immunol. 123, 1548-1550 (1979). Se on atsaguaniiniresistentti, HAT-herkkä ja se ei syntetisoi H- eikä L-Ig-ketjuja. Sitä pidetään elatusaineessa DMEM + 15 % FKS + glutamiini + penisilliini-streptomysiini + pyruvaatti (= DMEM-täyselatusaine) 37°C:ssa 7-prosenttisessä CO₂-atmosfäärissä.

A.2 Menetelmät. Nukleonin poisto: 8×10^7 Ag 8.653-solua sentrifugoitiin 5 min 10^3 UpM ja uudelleen suspendoitiin 12 ml:aan 12,5-prosenttista Ficoll-DMEM-CB-DMSO-liuosta niin kauan, kunnes oli saatu solukimpaleista vapaa suspensio. Aina 3 ml solususpensiota pantiin neljä, 12 h aikaisemmin esikäsiteltyjen Ficoll-gradienttien päälle ja päällystettiin 2 ml:lla Ficoll-vapaata DMEM-CB-DMSO-liuosta. Putket gradienttien kanssa sentrifugoitiin ultrasentrifugissa 60 min ajan 25 000 UpM (31°C).

Kun sentrifugoiminen oli päättynyt, makroskooppisesti näkyvät fraktiot ("juovat") koottiin erikseen käyttäen apuna injektioruiskua, jossa on pitkä kanyyli, ylhäältäpäin, ja kuhunkin pantiin laimennukseksi 20 ml elatusainetta (DMEM ilman lisäaineita), sedimentoitiin sentrifugoimalla ja suspendoitiin uudelleen tuoreeseen DMEM:ään.

Saatiin seuraavat 4 fraktiota:

- a) solujätettä (0 ja 12,5 % Ficoll-määrän rajalla),
- b) tumattomia sytoplasteja alueella, jossa 15-16 % Ficoll'ia,
- c) tumia ilman havaittavissa olevaa plasmareunaa ja noin 2 % tumattomia "soluja" 17 ja 25 % Ficoll-määrän rajalla,
- d) tuman sisältäviä, morfologisten kriteerioiden mukaan kokonaisuuksia soluja, joissa on hyvin tunnistettavissa oleva plasmareuna ja joitakin tumia ilman plasmareunaa sedimenttinä putken pohjalla.

Solujen laskennasta kävi selville, että 8×10^7 Ag 8.653-solusta on b) kohdassa $1,25 \times 10^6$ sytoplastia, c) kohdassa 4×10^6 karyoplastia ja d) kohdassa $1,1 \times 10^7$ todennäköisesti kokonaista solua.

B. Hiiren pernasolujen fuusioiminen eristettyjen, kokeesta A saatujen myeloma-karyoplastien, -sytoplastien ja -sedimenttisolujen kanssa.

B.1 Ainekset

Fuusiointiaine: 20 g polyetyleeniglykolia (PEG-4000) sulatettiin

autoklaavissa, jäähdytettiin 56°C:een ja sekoitettiin tässä lämpötilassa 20 ml:n kanssa DMEM:ää.

HAT-valinta-aine: DMEM-täyselatusaineeseen pantiin aminopteriiniä (4×10^{-7} M), tymidiiniä (1×10^{-4} M) ja hypoksantiinia ($3,1 \times 10^{-5}$ M).

Viljelysastiat: Costar-firman, Cambridge, Mass. USA valmistamaa harsokankaista viljelyalustaa Tissue Culture Cluster-24 ja Cluster-96.

B.2 Menetelmät

Fuusioiminen: Kokeessa A preparoidut fraktiot b), c) ja d) sekoitettiin erillisissä astioissa, joissa oli pernasoluja, suhteessa 10:1 ja sedimentoitiin sentrifugoimalla. Yläpuolella oleva neste otettiin varovasti pois. Sedimenttiin lisättiin 0,8 ml 50-prosenttista PEG-liuosta (37°C:ssa, tasaisesti 1 min aikana ja koko ajan kevyesti ravistelemalla) ja sitten 5 ml DMEM:ää (huoneen lämmössä, tasaisesti 5 min aikana). Kun oli vielä lisätty 20 ml DMEM:ää, solut sedimentoitiin, suspendoitiin uudelleen tuotteeseen DMEM-täyselatusaineeseen (5 ml) ja jaettiin 10:een, "feeder-soluilla" päällystettyyn Costar-24 täpläkudosisviljely-astiaan. Yksittäisviljelyjä "ruokittiin" DMEM-täyselatusaineella päivinä 1, 2, 3, 5, 7, 10 ja 13.

Feeder-solut (vatsaontelon makrofagit): Fuusion edellisenä päivänä tapettiin iskemällä umpisiitettyjä (Balb/c)-hiiriä. Stereileissä olosuhteissa ruiskutettiin 4-5 ml PBS:ää vatsaonteloon ja 1 min kuluttua imettiin se takaisin. Solut huuhdottiin, pestiin DMEM:ssä, suspendoitiin täyselatusaineeseen tiheydellä 2×10^5 solua/ml ja jaettiin 0,5 ml:n annoksina Costar-24 täpläastioihin.

Pernasolut: Balb/c-hiireltä otettiin välittömästi ennen fuusioimista aseptisissä olosuhteissa perna ja sen solut suspendoitiin DMEM:ään. Soluaggregaatit ja kudospalaset suodatettiin harsokankaan läpi.

ELISA-hiiri-immunoglobuliini: Mikrotiitterilevyjen päälle pantiin lampaasta saatuja hiiri-Ig-vasta-aineita (IgG-fraktio; 10 μ g/ml 0,9-prosenttinen NaCl-liuos; 150 μ l vasta-aineliuosta täpläastiaa kohti). 100 μ l viljelyn päällä olevaa nestettä pipetoitiin kaikkiin päällystettyihin täpläastioihin ja inkuboitiin tunnin ajan huoneen lämmössä. Imettiin pois yläpuolella oleva neste ja pestiin kaksi kertaa täpläastiat, pantiin niiden päälle 100 μ l anti-hiiri-Ig-POD-konjugaattiliuosta (samaa vasta-ainetta kuin edellä; kovalenttisesti sidotuna piparjuuri-peroksidaasiin) ja inkuboitiin yksi tunti huoneen lämmössä. Pestiin kolme kertaa ja pipetoitiin täpläastiaa kohti 100 μ l substraattiliuosta (ABTS) ja määrättiin värinmuutos fotometrisesti.

B.3 Tulokset

A kohdan mukaisesti preparoidut sytoplasti-, karyoplasti- ja sedimenttifraktiot fuusioitiin paralleelisesti Balb/c-hiiren pernasolujen kanssa ja jaettiin 10:een 1 ml:n viljelyyn. Osa-viljelyistä 5 ravittiin ilman (levy I), ja 5 HAT-lisän kanssa (levy II).

21:seen päivään saakka fuusiosta (n.F.) ei voitu missään täpläastiassa nähdä lymfoidisolujen kasvua makroskooppisesti eikä mikroskooppisesti, paitsi täplissä 4A, 4B, 4C, 3C ja 3D levyllä I, jotka sisälsivät sedimenttifraktion fusionaattia ilman HAT-elatusainetta. Näissä täplissä voitiin havaita jo 5 päivää fuusion jälkeen (n.F.) pesäkkeitä, jotka suurenivat nopeasti. Päivänä 8 n.F. annettiin näihin täpliin HAT-elatusainetta: 4 päivän kuluessa olivat kaikki näkyvät pesäkkeet kuolleet.

Päivänä 27 n.F. tuli ensiksi yksitellen, sitten lähes kaikissa täplissä pesäkkeitä näkyviin, ja ne muodostuivat suurista kuulumaisista läpinäkyvistä ei-adherenteistä kasvavista soluista. Päivänä 65 n.F. olivat kaikki täplät paitsi I-3B, II-1A, II-4A täynnä multippeleita lymfoidisolujen pesäkkeitä. Kun tutkittiin viljelyjen yläpuolella olevan nesteen hiiri-Ig-pitoisuutta sinä päivänä, huomattiin, kuten yhteenveto taulukossa 1 osoittaa, positiivia - voimakkaan positiivisia ELISA-arvoja kaikissa

osaviljelyissä paitsi edellä mainituissa pesäkkeettömissä täpläastioissa:

Taulukko 1

ELISA-hiiri-immunoglobuliinin osoittamista varten kokeen B viljelyjen yläpuolella olevissa nesteissä (päivä 65 fuusioimisen jälkeen)

Täplä-viljelylevy I: ilman HAT'ia

(Poikkeukset: 4A, 4B, 4C, 3C, 3D: + HAT, päivä 8 - päivä 15)

	1	2	3	4	5	6
A	664	601	706	632		
B	526	766	011	633		
C	576	769	855	623		
D	794	1500	791			

↑
1
↑
2
↑
3

- 1 = Sytoplasti-fusionaatti
- 2 = Karyoplasti-fusionaatti
- 3 = Sedimenttisolu-fusionaatti

Täplä-viljelylevy II:

HAT'in kanssa (päivä 1 - päivä 14)

	1	2	3	4	5	6
A	008	568	580	000		
B	267	538	539	547		
C	656	530	729	822		
D	848	570	605			

↑
1
 ↑
2
 ↑
3

Negatiivinen kontrolli 1 (DMEM-täyselatusaine): . 010

Negatiivinen kontrolli 2 (DMEM, ilman FKS:ää): . 040

Positiivinen kontrolli 1 (Hiiriseerumi 1×10^{-3}): . 723Positiivinen kontrolli 2 (Hiiriseerumi 1×10^{-2}): >1500

a) Karyoplastien fuusioiminen hiiren pernasolujen kanssa johti in vitro lisääntyviin, immunoglobuliinia erittäviin soluihin. Vaikka ainoastaan pieni osa sytoplasmaa malignista partnerista tuotiin hybridiin, ei se aiheuttanut "jatkuvan kasvamisen" ominaisuuden häviämistä.

b) Karyoplastien kanssa synnytetyt hybridisolut syntetisoivat ja erittivät hiiri-immunoglobuliinia "hybridoman" määriä. Ag 8.653:n sytoplasmaosan puuttuminen ei sen mukaan haitannut karyoplasti-pernasolu-hybridin tuottamis- ja erittämiskykyä.

c) Sytoplastien ja pernasolujen fuusiosta syntyi myös soluklooneja, jotka proliferoituivat ja erittivät vasta-aineita in vitro. Tyydyttävää selitystä tälle erikoisen yllättävälle ilmiölle ei tällä hetkellä voida antaa.

Esimerkki 2

Solun fragmentoiminen glyseriinillä liuottamalla ja fuusioiminen humaaniveren lymfosyyttien kanssa.

Ainekset

Earle'n Balanced Salt Solution (EBSS), elatusaine APMI 1640, vasikan sikiön seerumi (FKS), valmistaja Boehringer Mannheim. 8-Azaguanin (8-Ag), valm. Serva (Heidelberg), Agar (Bacto-Agar 1614) valmistaja Difco (Fa. Hedingen KG, Stuttgart). Humaaniplasmasytoma-linja HS Sultan ATCC CRL-1484 sulatettiin kylmävarastoidusta solumateriaalista ATCC-ohjeiden mukaan ja otettiin viljelyyn.

Menetelmän mukaan, joka on selostettu Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71, 2679-2683 (1974) viljeltiin 8×10^7 HS Sultan-solua 100 ml:ssa RPMI 1640-täyselatusainetta, joka sisälsi $20 \mu\text{M}$ 8-Ag, 48 h ajan. Eloojäävät solut otettiin 10 ml:aan RPMI 1640-täyselatusainetta, joka on ilman 8-Ag:tä, ja annettiin lisääntyä 10 vrk. Sitten solut istutettiin pehmeä-agarlevyille (P.COFFINO et al.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 68, 219-223 (1971), jotka oli valmistettu käyttäen RPMI 1640-täyselatusainetta + $20 \mu\text{M}$ 8-Ag (noin 500 solua Petrimaljaa kohti) ja pidettiin CO_2 -inkubaattorissa. 9 päivän kuluttua otettiin erillään kasvavat koloniat steriilisti agarin yläpinnalta ja pantiin lisääntymään RPMI 1640-täyselatusaine + 8-Ag:ssä. Yhtä kloonia (sitä merkittiin HS-SULTAN-8 Ag-R1), joka kasvoi siten, että se kaksinkertaistui noin 20 h:ssa, käytettiin seuraavaan kokeeseen. HS-R1-solut olivat HAT-herkkiä: solut, joita viljeltiin tiheydellä $1-5 \times 10^5$ /ml HAT-elatusainetta (RPMI 1640-täyselatusaine ja 0,1 mM hypoksantiinia, 400 nM aminopteriinia, $31 \mu\text{M}$ tymidiiniä) eivät lisääntyneet ja kuolivat kaikki 7 päivän sisällä.

Humaanilymfosyytit (perifeerisestä verestä: PBL): 300 ml laskimoverta koottiin steriilisti hepariiniliuokseen (2 U/ml verta) ja eristettiin mononukleaaristen solujen fraktio (MNC: lymfosyytit, monosyytit) standardimenetelmillä. 3×10^8 MNC suspendoitiin 100 ml:aan RPMI 1640 + 10 % FKS, ja inkuboitiin monosyyttien erottamiseksi 24 h viljelyastioissa 37°C :ssa

5-prosenttisessa CO₂-atmosfäärissä.

Menetelmät

HS-Rl:n fragmentoiminen: M.Jett et al.: Isolation and characterization of plasma membranes and intact nuclei from lymphoid cells, J.Biol.Chem. 252, 2134-2142 (1977) selostuksen mukaisesti soluihin pantiin runsaasti glyseriiniä ja ne hajotettiin inkuboimalla 10 mM tris-HCl-puskurissa. Tumat erotettiin sentrifugoimalla, 200 g (10 min, 4°C) membraanivesikkeleistä, jotka puolestaan sedimentoitiin sentrifugin avulla, 5000 g (4 min, 4°C).

Fuusioiminen: Noin 1×10^8 729 HS-Rl-tumia suspendoitiin humaanilymfosyyttien kanssa RPMI 1640:ssä suhteessa 1:1, ja kuten esimerkissä 1, B.2 on selostettu fuusioitiin PEG:n kanssa.

Membraanivesikkeliön sedimentti noin 1×10^8 HS-Rl-solusta päällystettiin 1×10^7 humaanilymfosyytistä saadulla suspensiolla ja fuusioitiin PEG:n kanssa.

Kontrolliastiaan otettiin noin 2×10^7 HS-Rl-tumaa RPMI 1640-täyselatusaineeseen (ilman HAT'ia) ja viljeltiin neljässä Costar-24-täpläastiassa CO₂-inkubaattorissa.

Kaikkia fusionaatteja ja kontrolliviljelyjä viljeltiin hiiren vatsaontelomakrofagien päällä kuten esimerkissä 1 on selostettu feeder-soluina.

Humaani-Ig:n osoittaminen viljelyn päällä olevasta nesteestä: Mikroitiitteri-ELISA kuten esimerkissä 1, B.2 on selostettu. Päällykseksi käytettiin immuniadsorptiivisesti puhdistettua anti-humaani-Ig:tä lampaasta. Samaa AK-preparaattia käytettiin anti-humaani-Ig-POD-konjugaatin valmistukseen. Lammas-AK reagoi kaikkien humaanii-Ig-luokkien kanssa eikä osoittanut mitään ristireaktiivisuutta naudan tai hiiren Ig:n suhteen.

Tulokset:

Fragmentoiminen glyseriini-tris-HCl-liuotuksen avulla: Käsittely rikkoi HS-R1-solut tumia sisältäväksi fraktioksi, joka sedimentoitui 200 g, ja tumattomaksi sytoplasma-membraani-vesikkeli-fraktioksi, joka sedimentoitui 5000 g:llä. Mikroskoopissa ei voitu havaita kummassakaan fraktiossa kokonaisia HS-R1-soluja. Tumia ympäröi enemmän tai vähemmän säännötömästi rajoittuneita sytoplasmariekaleita. Laskemalla saatiin tumasaaliiksi 85 %. Vesikkelifraktio sisälsi vähäisten solujen jäännösten lisäksi massaltaan 0,5-2 μ m suuruisia vesikkeleitä ilman tunnettavia tuman osasia.

Viljely, jossa oli 2×10^7 tumaa RPMI-täyselatusaineessa (ilman HAT'ia) ei johtanut 12 viikon tarkkailuaikana HS-R1-solujen kasvuun.

Fusionaattien viljely: Tuma-lymfosyytti- ja sytoplasma-vesikkeli-lymfosyytti-fusionaattit jaettiin 96 tai 10 Costar-24-täpläastiaan ja viljeltiin puoliksi HAT-lisän kanssa ja puoliksi ilman sitä RPMI-täyselatusaineessa hiiri-makrofagien päällä. Toisesta viikosta lähtien fuusion jälkeen tulivat lymfoidi-solujen pesäkkeet näkyviin ja ne kasvoivat jatkuvasti suuremmiksi.

Humaani-immunoglobuliinin tuottaminen: Päivänä 21 fuusion jälkeen tutkittiin viljelyjen päällä olevat nesteet (päivänä 19 oli suoritettu täydellinen elatusaineen vaihto) humaanimmunoglobuliinin suhteen. Tulokset ovat taulukoissa 2a ja 2b.

Taulukko 2a

ELISA-koe humaan-*i*-immunoglobuliinin osoittamiseksi viljelyn päällä olevasta nesteestä (karyoplasti-fuusio, 21 päivää fuusioimisen jälkeen).

I + HAT

	1	2	3	4	5	6
A	029	147	286	147	228	270
B	171	086	050	144	846	121
C	118	156	250	082	179	059
D	120	1148	024	096	023	151

I - HAT

	1	2	3	4	5	6
A	660	233	175	270	410	322
B	103	264	229	253	271	260
C	045	343	370	128	150	126
D	171	173	141	116	218	699

II + HAT

	1	2	3	4	5	6
A	135	290	107	279	530	674
B	116	500	469	315	315	627
C	120	050	068	159	226	145
D	191	078	686	110	242	561

II - HAT

	1	2	3	4	5	6
A	381	235	489	514	608	217
B	348	239	214	158	367	163
C	185	275	235	234	322	316
D	219	202	292	283	220	052

Taulukko 2b

Sytoplasti-fuusio, 21 päivää fuusioimisen jälkeen

	1	2	3	4	5	6
A	052	627	917			
B	041	326	715			
C	071	400	826	0889		
D	079	917	494	1016		
	↑	↑	↑			
	1	2	3			

1 = tuma-kontrolliviljely

2 = HAT'in kanssa

3 = ilman HAT'ia

Jos arvioidaan ekstinktioarvot 0-99 negatiivisesta epäilyttäviin, arvot 100-200 positiivisiksi, arvot yli 200 voimakkaan positiivisiksi, saadaan tumafuusion avulla saaduista viljelystä seuraava jaottelu:

Tuma-lymfosyytit-hybridit, jotka viljeltiin	Humaani-immunoglobuliinin ELISA-koe		
		negatiivinen	positiivinen
	n	11	18
HAT'in kanssa			19
(n = 48)	(%)	(23)	(37)
	n	2	12
Ilman HAT'ia			34
(n = 48)	(%)	(4)	(25)
			71

Tuloksista käy seuraavaa ilmi:

Fusionaatit, jotka valmistettiin käyttäen liuottamalla hajotettuja fraktiota, voidaan viljellä ilman HAT-valintaa. Menetelmä on paljon vähemmän työtä vaativa kuin Cytochalasin E-pursotus ja tuottaa fuusiokykyistä materiaalia hyvän tuotoksen. Selvää erottelua "tuma"- ja "sytoplasma-membraani"-fraktioihin ei synny kummassakaan menetelmässä. Sekä pääasiassa tuma-materiaalia sisältävä että pääasiassa sytoplasma-membraanivesikkeliä sisältävä fraktio tuottaa fuusioituneena verestä saatujen humaani-lymfosyyttien kanssa in vitro lisääntymiskykyisiä, AK-tuottavia soluklooneja.

Rinnakkaiskoe tuma-lymfosyytti-hybridit HAT-lisän kanssa ja ilman sitä todistaa valinta-aineen negatiivisia vaikutuksia: HAT:in kanssa on 23 % primääriviljelyistä Ig-negatiivisia ja vain 40 % voimakkaasti positiivisia, ilman HAT:ia on yli 70 % voimakkaasti positiivisia ja vain 4 % Ig-negatiivisia.

Esimerkki 3

Immunisoidun hiiren pernasolujen fuusioiminen natiivisten ja fragmentoitujen myelomasolujen Ag 8.653 kanssa.

Ainekset

Tyreoidea stimuloiva humaanihormoni (hTSH) ja sen eristetty β -ketju (β -hTSH) olivat peräisin Boehring'iltä Mannheimista. Täydellinen ja epätäydellinen Freund'in apuaine (CFA, IFA) oli Difco'sta, Methocel 1500 oli Fluka'sta ja FITC-Covaspheres oli Covalent Tech. Co:sta, Ann Arbor, Michigan, USA.

Menetelmät

Immunisointi: Balb/c-hiiret immunisoitiin primäärisesti β -hTSH:lla (40 μ g CFA:ssa, intraperitoneaalisesti) (päivä 1) ja ne "tehostettiin" päivänä 196 hTSH:lla (50 μ g IFA:ssa, i.p.), päivänä 266 hTSH:lla ilman apuainetta i.p. samoin kuin päivänä 294 hTSH:lla intravenöösisti.

Pernasoluja (noin 1×10^8) saatiin yhdeltä immunisoidulta hiireltä 3 päivää viimeisen tehostusimmunisoimisen jälkeen kuten

esimerkissä 1, B.2 on selostettu ja ne käytettiin puoliksi kahteen fuusioon.

Fuusio 1: 5×10^7 pernasolua ja 1×10^7 Ag 8.653-solua sekoitettiin keskenään kuten esimerkissä 1, B.2 on selostettu ja viljeltiin niitä 48:ssa täplä-24-astiassa hiiren makrofagisolujen kanssa HAT-pitoisessa DMEM-täyselatusaineessa.

Fuusio 2: 1×10^7 Ag 8.653-solua hajotettiin liuottamalla kuten esimerkissä 2 on selostettu käsittelemällä vaiheittain glyseriinillä ja 10 mM tris-HCl-puskurilla. Sytoplasma-membraani-vesikkeli-(CMV)-fraktio pellettoitiin (5000 g, 40 min, 4°C). Tumafraktio sekoitettiin 7×10^7 pernasolun kanssa, sentrifugoimalla kerrostettiin CMV-sedimentin päälle ja PEG:n kanssa, kuten esimerkissä 1 on selostettu B.2 kohdassa, fuusioitiin standardimenetelmän mukaan. Fusionaatti jaettiin DMEM-täyselatusaineessa 24:ään Costar-24-täpläastiaan makrofagien kanssa ja viljeltiin ilman HAT-lisää.

Hybridisolujen antigeenispesifinen merkitseminen ja kloonaus: (FITC)-Covaspheres-pallosia päällystettiin valmistajan yleisen ohjeen mukaisesti hTSH:lla kovalentisti (TSH-CS) ja varastoitettiin 5 o/oo-natriumatsidiliuoksessa. D.R. Parks et al.: Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 1982-1966 (1979) selostetun menetelmän mukaan merkittiin solut päällystetyillä Covaspheres-pallosilla ja käyttäen apuna sytofluorigraafia pantiin suuria, fluoriloiste-positiivisia soluja yksitellen täpläastioihin ja Costar-96-levyille. Täpläastiat oli 24 h aikaisemmin päällystetty hiiri-makrofageilla DMEM-täyselatusaineessa.

ELISA-koe TSH-spesifisille vasta-aineille: Viljelyjen yläpuolella olevan osan päällystys, inkubointi, substraattireaktio ja arvostelu kuten esimerkissä 1, B.2 on selostettu. Anti-hiiri-Ig-POD:n asemesta käytettiin TSH-POD-konjugaattia. Positiivisena kokeena laimennettiin erään hTSH-hyperimmunisoidun hiiren seerumi 10^{-3} :een ja pantiin mukaan; negatiivisena kontrollina käytettiin kloonaa, joka muodosti vasta-aineita erisukuis-ta antigeeniä vastaan (hiiri-anti-digoksiini).

Tulokset

Sekä fuusiosta 1 tehdyissä viljelyissä (kokonaisia Ag-8.653-soluja) että myös fuusiosta 2 (Ag-8.653-liuotusfragmentteja) tehdyissä oli päivänä 14 kaikissa täpläastioissa nähtävissä suuria lymfoidi-solujen kolonioita. Viljelyjen yläpuolella olevasta osasta päivältä 14 suoritettussa ELISA-kokeessa TSH-spesifisten vasta-aineiden osoittamiseksi saatiin taulukkoon 3 kootut arvot: Kaikissa osaviljelyissä voitiin osoittaa anti-TSH:ta.

Taulukko 3

a)

	1	2	3	4	5	6
A	235	236	212	149	119	212
B	109	221	119	104	176	068
C	116	108	135	139	093	135
D	171	128	120	228	137	145

b)

	1	2	3	4	5	6
A	271	268	267	286	194	291
B	288	278	362	317	280	305
C	207	292	252	226	292	271
D	295	376	370	338	310	333

Negatiivinen-kontrolli (DMEM-täyselatusaine) : 000

Positiivinen-kontrolli (anti-TSH-hiiriseerumi) : 362

ELISA-koe anti-TSH:n osoittamiseksi, viljelyjen yläpuolella olevasta osasta päivänä 14 fuusioimisen jälkeen, a) fuusio 1 (kokonaisia Ag 8.653-soluja), b) fuusio 2 (Ag 8-653-fragmentteja).

Päivänä 15 huuhdottiin ei-adherentit solut yksittäistäplä-astioista, jotka olivat peräisin fuusiosta 1 ja 2, merkittiin ne erillisissä astioissa TSH-antigeeni-spesifisesti (peruste: hybridomissa on tavallisesti kuten B-lymfosyyteissä osa syntetisoimastaan vasta-ainemolekyylistä kiinnittynään solun

membraaniin "ulospäin" suunnattuine antigeeni-sitoutumispaikkoineen) ja kloonattiin käyttäen apuna solujen valikointilaitetta.

Esimerkki 4

Humaani-PBL:n fuusioiminen kokonaisten ja fragmentoitujen Ag 8.653-solujen kanssa.

Ainekset

Inaktivoitua hepatiitti-B-pinta-antigeeniä (HB_{si}; Biotesti) puhdistettiin immunoabsorption avulla seerumiproteiineista. ELISA-koe humaanin-HB_s-vasta-aineiden osoittamiseksi: mikrotiitterilevyt päällystettiin puhdistetulla HB_{si}:llä (20 µg/ml 0,9-prosenttinen NaCl-liuos). Viljelyn yläpuolella olevan nesteen inkuboiminen, konjugaatti- ja substraatti-reaktiot sekä arviointi kuten on selostettu esimerkissä 1 B.2. Anti-hiiri-Ig-POD:n asemesta käytettiin (lammas)-anti-humaani-Ig-POD:tä.

Suoritus

HPBL:ää eräältä luovuttajalta, jolla oli korkea anti-HBs-tiiteri, eristettiin 200 ml:sta laskimoverta Ficoll-gradientti-sentrifugoimalla. B-lymfosyyttien rikastamiseksi T-soluja kerättiin rosettimuotoon lammaserotroosyyttien kanssa (standardimenetelmä) ja toisen Ficoll-gradientti-sentrifugoinnin avulla erotettiin ne. Ei-roseteiksi kerättyjen solujen (HPBL(B)) fraktiota tiheydellä 5×10^7 solua RPMI 1640:ssä + 10 % autologem. plasmaa (joka oli inaktivoitu 30 min/56°C kuumassa), viljeltiin noin 10 µg:n kanssa HB_{si}:tä CO₂-inkubaattorissa (elatusaineen vaihto aina 12 h kuluttua).

Fuusio 1: 1×10^7 esikäsiteltyä HPBL(B):tä sekoitettiin 1×10^7 Ag 8.653-solun kanssa ja kuten esimerkissä 1, B.2 on selostettu, fuusioitiin PEG:n kanssa. Fusionaattia viljeltiin RPMI 1640:ssä + 10 % ihmisen plasmaa + HAT neljässä Costar-24-täpläastiassa.

Fuusio 2: $1,1 \times 10^8$ Ag 8.653-solua fragmentoitiin glyseriini-liuotuksen avulla. 1×10^7 Ag 8.653-tumaa sekoitettiin 1×10^7 HPBL(B):n kanssa ja kerrostettiin membraani-sytoplasma-vesikkeliin sedimentin (1×10^8 Ag 8.653-solusta) päälle. Fuusion jälkeen PEG:n kanssa viljeltiin fusionaattia neljässä Costar-24-täpläastiassa RPMI 1640:ssä + 10 % ihmisplasmaa (ilman HAT-lisää).

Tulokset

Kaikissa fuusion 1 ja 2 täpläastioissa esiintyi päivä 3:sta lähtien suurten adherenttien solujen kasvua. Päivänä 5 suspendoitiin ei-adherenttien solujen päämassa varovasti ja jaettiin kahteen uuteen Costar-24-täpläastiaan (esimerkiksi A1, B1 ja C1). Päivänä 28 fuusiossa 1: pieniä kolonioita A2:ssa ja A3:ssa, muissa täplissä vain adherentteja soluja; fuusio 2: multippelien kolonioiden massiivista kasvua kaikissa täplissä paitsi C 3:ssa. Viljelyjen päällysnesteen kanssa päivänä 35 suoritettu ELISA-koe ihmisen immunoglobuliinien suhteen, joilla on spesifisyys hepatiitti-B-antigeeniä vastaan, antoi taulukossa 4 kootun tuloksen: fuusiosta 1 ei saatu mitään positiivista viljelyä (kokonaisia Ag 8.653-soluja, viljely HAT-elatusaineen kanssa); sitä vastoin olivat fuusion 2 viljelyistä 5-12 (Ag 8.653-fragmentteja, viljely normaalissa elatusaineessa) selvästi anti-HB_s-positiivisia.

Taulukko 4

a)					b)				
	1	2	3	4		1	2	3	4
A	000	000	000	000	A	010	000	189	553
B	000	001	011	000	B	000	003	198	032
C	005	000	000	004	C	000	173	000	107

Negatiivinen-kontrolli (anti-HB_s-neg. ihmisseerumi): 000
Positiivinen-kontrolli (anti-HB_s-pos. ihmisseerumi): 185

ELISA-koe ihmis-anti-HB_s:n osoittamiseksi viljelysten päällysnesteestä päivänä 35 fuusion jälkeen. a) fuusio 1 (kokonaisia Ag 8.653-soluja), b) fuusio 2 (Ag 8.653-fragmentteja).

Esimerkki 5

HPBL:n fuusio fragmenttien kanssa humaani-plasmasytomi-linjalta HS Sultan.

Ainekset

HS Sultan tilattiin American Type Culture Collection, (ATCC):stä koodilla CRL-1484 pakastevarastoituna solumateriaalina ja sulatettiin ATCC-ohjeiden mukaisesti ja pantiin viljelyyn.

Suoritus

HPBL valmisteltiin kuten esimerkissä 4 on selostettu samalta luovuttajalta ja in vitro "tehostettiin" HBsi:n kanssa.

Fuusio: 4×10^7 HS Sultan-solua fragmentoitiin glyseriini-liuotuksen avulla. Membraani-sytoplasma-vesikkeli-fraktio sedimentoitiin 5500 g (40 min) ja päällystettiin seoksella noin 4×10^7 HS Sultan-tumia ja 4×10^7 HPBL(B):tä. PEG-fuusio tapahtui esimerkki 4:n mukaisesti. Fusionaatti kylvetään 12:een Costar-24-täpläastiaan, joissa on RPMI 1640 + 20 % KKS + pyruvaatti + insuliini (Novo 2 U/ml) + 1 % ei-välttämätöntä aminohappoa (BM) + 1 % Methocel 1500 ilman Hat-lisää.

Tulokset

Päivä 14 fuusion jälkeen: suurten, ei-adherenttien lymfoidisolukolonioiden kasvua.

Esimerkki 6

Ihmisen T-lymfosyyttien tekeminen kuolemattomiksi

6.1. Ainekset ja menetelmät

T-lymfosyyttejä eristettiin standardimenetelmien mukaisesti (rosettien muodostus lammasytrosyyttien kanssa, Ficoll-

gradienttisentrifugoiminen) lymfosyyttien kokonaisfraktiosta ja niitä käsiteltiin joko heti tai 3-päiväisen viljelyn jälkeen. Ehrlich-Aszites-soluja (ATCC; CCL 77) viljeltiin DMEM:ssä 10 % kanssa hevosseerumia ja niitä käytettiin muuntelevien fragmenttien luovuttajina. EAZ:n fragmentoiminen suoritettiin Jett et al. (J.Biol.Chem. 252, 2134-2142 (1977) mukaisesti glyseriini-liuotuksen avulla. Etupäässä tumamateriaalia sisältävä fraktio erotettiin sentrifugoimalla ja heitettiin pois. Mitokondrioita sisältävä sytoplasman membraani-vesikkelifraktio (CBV) käytettiin muuntamiseen. 5×10^7 T-lymfosyyttiin lisättiin ylimäärä PHA-lektiiniä (Difco), sekoitettiin EAZ:stä saadun CMV-fraktion kanssa ja inkuboitiin 20 min ajan huoneen lämmössä. Seos sedimentoitiin sentrifugin kanssa, nestemäinen päällyskerros poistettiin täysin ja korvattiin 1 ml:lla 50-prosenttista PEG-liuosta. Annettiin vaikuttaa 1 min ajan, jonka jälkeen PEG-liuokseen lisättiin RPMI-1640-elatusainetta laimennusta varten ja sentrifugoitiin solujen erottamiseksi. Solut otettiin RPMI-elatusaineeseen 20-prosenttisen vasikan sikiöseerumin kanssa (FKS, BM), jaettiin 12:en 1-ml-viljelytäplään ja viljeltiin 37°C:ssa 5-prosenttisessä CO₂-atmosfäärissä. Solujen tunnistaminen pintatunnusmerkkien perusteella tapahtui standardimenetelmien mukaisesti lammaserytrosyyttien E-rosettien avulla (M.E. Kaplan et al: J.Immunol.Methods 5, 131 (1974) ja immunofluoresenssin avulla ja käyttämällä molempia T-solu-spesifisiä vasta-aineita. OKT-3 /Ortho; E.L. Reinherz et al.: J.Immunol. 123, 1312 (1979) tai MAK 4-11 (P.Rieber et al.: Hybridoma 1, 59 (1981)7 ja fluoriloisteella merkittyä anti-humaani-immunoglobuliinia (Ig; firma Dako) B-solutyypin membraani-Ig:n osoittamiseksi.

6.2. Tulokset

Ensimmäisten 14 päivän aikana kuoli suurin osa soluista viljelyksissä. Päivästä 21 lukien tuli solujätteissa näkyviin pienten ja keskisuurten solujen pesäkkeitä, jotka lisääntyivät jatkuvasti. Pesäkkeiden kasvua havaittiin kaikissa 12:ssa täplässä ja jopa 50 pesäkettä täpläastiaa kohti. Päivänä 30

siirrettiin koloniat suurempiin viljelyastioihin ja annettiin lisääntyä jatkuvasti. Solut analysoitiin pintamerkkiensä perusteella ja saatiin seuraavat tulokset:

a) E-rosetti-positiiviset	> 95 %
b) OKT-3-positiiviset	> 90 %
c) 4-11-positiiviset	> 90 %
d) Ig _s -positiiviset	< 5 %

6.3. Arvostelu

Fragmentit, jotka voidaan saada EAZ:sta (jatkuva hiirisolulinja) glyseriiniliuotuksen avulla, tuottavat PEG-fuusion jälkeen eristettyjen T-lymfosyyttien kanssa jatkuvasti viljelyssä kasvavia soluja, jotka voidaan pintamerkkiensä ansioista kiistattomasti identifioida T-lymfosyyteiksi.

Esimerkki 7

Ihmisen endoteelisolujen tekeminen kuolemattomiksi

7.1. Ainekset ja menetelmät

Kaikki viljelyastiat päällystettiin ennen solujen levittämistä gelatiinilla. Elatusaine muodostui 1:1 seoksesta RPMI-1640 ja elatusaine 199 (BM) ja 20 % FKS. Ihmisen endoteelisoluja saatiin Jaffe et al. mukaan [*J.Clin.Invest.* 52, 2745-2756 (1973)] kollagenaasiliuoksen avulla (Gibco) tuoreista napanuoran laskimoista ja ennen muuntamista ne pantiin primääriviljelyyn noin 14 vrk ajaksi lisääntymään. Muuntamista varten adherentisti kasvavat endoteelisolut liuotettiin erilleen trypsiini-EDTA-liuoksen avulla (BM) ja fuusioitiin ne EAZ:sta saadun CMV-fraction kanssa suspensiossa kuten esimerkissä 6.1 on selostettu. Näin käsiteltyjä soluja levitettiin solutiheyden ollessa $5 \times 10^5/75 \text{ cm}^3$ -viljelyastiaa kohti ja viljeltiin CO₂-inkubaattorissa. Kontrollia varten käsiteltiin kulloinkin määräosa endoteelisoluja primääriviljelyistä ilman CMV-fraktiota PEG-liuoksella (näennäisfuusio) ja viljeltiin uudelleen. Niin pian kuin solut olivat viljelyastian pohjalla muodostaneet aukottoman solukentän, ne liuotettiin erilleen trypsiini-EDTA-liuoksella ja siirrettiin suhteessa 1:3 tuoreisiin viljelyastioihin (= pasaasi).

7.2. Tulokset

CMV-fraktion kanssa fuusioidut endoteelisolut kiinnittyivät kylvämisen jälkeen 20-30 prosentin tehokkuudella ja kasvoivat 2-3 päivän sisällä yhteenliittyviksi solukentiksi. Näennäisesti fuusioidut solut kiinnittyivät suunnilleen yhtä tehokkaasti kiinni, mutta tuskin lisääntyivät ja kuolivat - ilman yhteenliittyvän solukentän muodostamista - noin 21 päivän sisällä täydelleen. Täysin käsittelemättömät endoteelisolut lisääntyivät maksimaalisesti kolmanteen pasaasiin asti, lopettivat siten kasvunsa, irtosivat viljelyastian pohjalta ja hajosivat. 8 eri astiassa, joissa oli endoteelisoluja yhteensä 18 eri napanuorasta, kasvoivat CMV-käsitellyt solut ilman probleemeja 10. pasaasin yli. Muunnellut endoteelisolut voitiin ilman elin- ja jakautumiskyvyn menettämistä varastoida nestemäisessä tyypessä ja ottaa varastosta pois.

7.3. Arvostelu

Humaani-umbilikaali-endoteelisoluja ei voitu ilman keksinnön mukaista muuntelumanipulaatiota viljellä 3.pasaasin yli, jolla todettiin oikeiksi kirjallisuudessa ilmoitetut kokemukset [esimerkiksi M.A. Grimbrone, Progress in Haemostasis and Thrombosis, osa 3; T.Maciag et al., J.Cell.Biol. 91, 420-426 (1981)]. Mitokondrioita sisältävän Ehrlich-Aszites-soluista saadun CMV-fraktion kanssa suoritettun fuusion kautta muuttuivat endoteelisolujen viljelyominaisuudet siten, että niitä voitiin lisäänyttää yli kriittisen kolmannen pasaasin ilman probleemeja (ja vielä 23. pasaasissa niillä ei esiintynyt "väsymysilmiöitä").

Esimerkki 8

Ihmisen melanomasolujen kuolemattomiksi tekeminen

8.1. Ainekset ja menetelmät

Melanomasoluja sisältävää kudosta saatiin poistamalla kirurgisesti lantio-lymfasolmuke-metastaasista steriileissä olosuhteissa pieninä kuutioina ja säilytettiin fuusioimiseen asti nestemäisessä tyypessä. Valmistettiin CMV-fraktioita EAZ:sta, kuten esimerkissä 6.1 on selitetty.

Ennen fuusiota melanomasoluja sisältävä materiaali sulatettiin ja trypsiinikäsittelyllä valmistettiin yksittäissolususpensio. Suurten, ruskeanpunaisten myelomasolujen fraktio vapautettiin Ficoll-gradientti-sentrifugoimisen avulla mukana olevista lymfosyyteistä ja kuten esimerkissä 6.1. on selostettu, fuusioitiin CMV-fraktion kanssa PEG-vaikutuksen alaisena (noin 4×10^5 melanomasolua CMV:n kanssa noin 1×10^6 EAZ:stä). Fuusion kontrollia varten käytettiin 4×10^5 melanomasolua, joita käsiteltiin ilman CMV:tä PEG:n kanssa. Fuusion jälkeen solut kylvettiin tiheyden ollessa 1×10^5 solua/täpläästiaa kohti, jossa oli RPMI 1640 + 20 % FKS, ja viljeltiin 37°C :ssa 5-prosenttisessä CO_2 -atmosfäärissä.

8.2. Tulokset

Kaikissa 4:ssä CMV:n kanssa fuusioitujen melanomasolujen osaviljelyssä kasvoi päivästä 28 lähtien tyypillisen värin omaavien solujen pesäkkeitä semiadherenttien solukasojen muodossa, jotka jatkuvasti suurenivat. Näennäisesti fuusioitujen solujen kontrolliviljelyssä ei esiintynyt mitään solujen lisääntymistä, päin vastoin solut osoittivat päivästä 8 lähtien lisääntyvää granuloitumista, ja päivästä 22 lähtien oli viljelyssä jäljellä enää vain solujäännöksiä.

8.3. Arvostelu

Humaaneja melanomasoluja pakastesäilytetystä metastaasikudoksesta voitiin CMV-fuusion kautta in vitro muuttaa viljely- ja lisääntymiskykyisiksi soluiksi. Näennäisesti fuusoidut, samaa alkuperää olevat melanomasolut sen sijaan kuolivat muuten samoissa viljelyolosuhteissa.

Esimerkki 9

Eukaryoottisen DNA-vektorin tuominen ihmisen kuolemattomiksi tehtyihin endoteelisoluihin.

9.1. Transfisoidun aineksen osoittaminen soluissa kosketuttamalla (Southern'in imupaperimenetelmä) Hirt'in päällyskerrok-sia.

9.1.1 Ainekset

PlasmidiZ-pBR 322/Rchr β G- Δ 425 B (P.Dierks et al. Proc.Natl. Acad.Sci. USA 78, 1411-1415 (1981) sisältää 2070 emäsparin (Bp)-kaniini- β -globiini-geenifragmentin.

pBR 322:n Cla-Pvu I-fragmentti korvattiin 3039 Bp Hpa I-Bam H I-fragmentilla, joka sisältää koko aikaisten geenien alueen ja myöhäisten geenien alun SV 40:stä (J.Tooze (1980), "DNA Tumor Viruses", J. Tooze, 2.painos, Cold Spring Harbor Laboratory ja B.Wieringa et al, Cetus-UCLA symposium aiheena "Gene regulation" 1982). Tätä plasmidia nimitetään seuraavassa pBR 322 R β G SV 40:ksi.

9.1.2 Menetelmät

Ihmisen endoteelisoluja, kuten esimerkissä 7 on selostettu, tehtiin kuolemattomiksi ja annettiin kasvaa. 10^6 solua transfectioitiin 6 μ g:n kanssa pBR 322 R β G SV 40:ää ja 4 μ g ultraäänellä käsitellyn vasikan kateenkorvan DNA kanssa käyttämällä kalsium-fosfaattisaostusmenetelmää /F.L.Graham et al. Virology 52, 456-467 (1973) ja M.Wigler et al., Cell 14, 725-731 (1978). 10 h ja 40 h transfektion jälkeen valmistettiin Hirt'in viljelyn päällysnesteitä (B.Hirt, J.Mol.Biol. 26, 365-369, (1967)7. Hirt'in viljelyn päällysnesteet erotettiin 1-prosenttiseen agarosigeeliin ja Southern'in menetelmän mukaan /E.M.Southern, J.Mol.Biol. 98, 503-517 (1975)7 siirrettiin nitroselluloosapaperin päälle. Plasmid pBR 322 R G SV 40 merkittiin 32 P:llä käyttämällä Nick-translaatiomenetelmää, P.W. Rigby et al. J.Mol.Biol. 113, 237-251 (1977) ja hybridisoitiin siirtyneen DNA:n kanssa nitroselluloosasuodattimille, kuten on selostanut T. Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982). Suodatin valotettiin röntgenfilmille -70°C:ssa.

9.1.3 Tulokset

Ihmisen endoteelisolut, jotka transformoitiin plasmidilla pBR 322 R β G SV 40, antavat voimakkaan hybridisoimissignaalin,

joka vastaa autenttista plasmidia sen liikkuvuuden suhteen agarosigeelissä. Kun verrattiin solujen Hirt-päällyskerroksien signaaleja 40 h transfektion jälkeen signaaleihin 10 h jälkeen transformoinnista tuli ilmi neljä-viisinkertainen intensiteetin kasvu hybridisoimissignaaleissa.

Hybridisoitumista DNA-lajeihin, jotka ovat pienempiä kuin tuotu plasmidi, havaittiin myös. Näitä signaaleja ei ollut todettavissa transformoiduissa kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen endoteelisoluissa.

Sama intensiteetin jakautuminen hybridisoimissignaaleissa havaittiin, jos He-La-soluja transformoitiin plasmidilla pBR 322 R8G SV 40.

9.1.4 Arvostelu

Se tosiasia, että ihmisen kuolemattomaksi tehtyjen epiteelisolujen Hirt-päällyskerroksessa, jotka oli transfisioitu plasmidipBR 322 R8G SV 40:n kanssa, todettiin DNA-hybridisoituminen tuotuun ³²P-merkittyyn plasmidiin, ei kuitenkaan soluissa, jotka eivät olleet transformoituja, on todiste siitä, että vektori oli tuotu eukaryoottiseen solulinjaan. Havainto, että hybridisoimissignaali transformoiduissa soluissa 40 h transfektion jälkeen osoitti neljä-viisinkertaista intensiteettiä verrattuna soluihin 10 h transfektion jälkeen, antaa tehdä sen loppupäätelmän, että transformoitu plasmidi soluissa replikoitui.

9.2 Kaniinin β -globiinin spesifisten transskriptioiden osoittaminen kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen endoteelisoluissa, jotka oli transformoitu plasmidilla pBR 322 R8G SV 40.

9.2.1 Ainekset

Nukleaasi S₁, T₄ polynukleotidikinaasi ja vasikan suolenfosfataasi olivat Boehringer Mannheim'in kaupasta saatavia preparaatteja.

9.2.2 Menetelmät

Kuolemattomiksi tehtyjä ihmisen epiteelisoluja lisäannettiin, kuten 9.1.2, on selostettu, ja transformoitiin kaniinin β -globiinigeenin sisältävän vektorin kanssa. 48 h transfektion jälkeen hajotettiin liuottamalla $1-2 \times 10^6$ solua ja RNA uutettiin LiCl-virtsainemenetelmän mukaisesti [C. Auffray et al. Eur.J.Biochem. 107, 303-314 (1980)].

Kaniinin β -globiinispesifisen hybridisoimissondin valmistaminen Plasmidi pBr 322 R3G SV 40 hajotettiin Hae III:n kanssa ja fragmentti, joka ulottui +135 - -75 asti [P.Dierks et al. Proc.Natl.Acad.Sci, USA 78, 1411-1415 (1981)] ja A. Van Oyen et al. Science 206, 337-344 (19) eristettiin 2-prosenttiseen agarosigeeliin ja puhdistettiin edelleen DEAE-selluloosakromatografisesti [W.Müller et al. J.Mol.Biol. 124, 343-358 (1978)]. Fragmentti ^{32}P -defosforiloitiin vasikan suolifosfaatin kanssa ja merkittiin γ - ^{32}P -ATP:n ja T_4 polynukleotidikiinaasin kanssa, kuten on selostanut [N.Mantei et al. Gene 10, 1-8 (1980)].

Nukleaasi- S_1 -kartoitus

Kinaasin kanssa käsitelty fragmentti saostettiin 10 μg :n kanssa E.coli t-RNA (Boehringer Mannheim) etanolin avulla ja liuotettiin seokseen, jossa oli 100 μl :aan 0,4 M/l NaCl, 1 mM/l EDTA, 40 mM/l Pipes-puskuria, pH 6,4 ja 80 % formamidia [N.Mantei et al. Nature 281, 40-46 (1979)]. Sellulaarinen RNA (= 25 μg) vakuumikuivattiin, ja liuotettuna 10 μl :n sondissa (0,01 pMol, 30 000 cpm) puskuriin, kuten edellä on selostettu, se denaturoitiin, sulatettiin lasikapillaarin sisään ja hybridisoitiin 16 h lämpötilassa 48°C . Kontrollikokeessa hybridisoitiin sondi kaniini- β -globiini m-RNA:n kanssa (Miles). Koenäyte laimennettiin seoksella, jossa oli 100 μl 0,2 M/l NaCl, 50 mM/l natriumasetaattipuskuria pH 4,5, 1 mM/l ZnSO_4 ja 0,5 % glyseriiniä ja inkuboitiin 50 yksikön kanssa nukleaasi- S_1 :tä 60 min 30°C :ssa [R.Weaver et al. Nucl.Acid Res 7, 1175-1193 (1979)].

Näytteitä käsiteltiin fenolilla, saostettiin 10 μg :n kanssa E.coli t-RNA etanolin avulla, pestiin 80-prosenttisellä

etanolilla (20 min -70°C :ssa), vakuumikuivattiin, liuotettiin 5 μl :aan väriliuosta (0,05 % bromifenolisinistä, 0,05 % ksyloliksyanolialia, 1 mM/l EDTA:ta, 90 % V/V formamidia), kuumennettiin 2 min kiehuvaassa vesihauteessa ja suoritettiin elektrofooresi 5-prosenttisessä polyakryyliamidigeelissä (89 mM/l trisemästä, 89 mM/l boorihappoa, 1 mM/l EDTA ja 7 mM/l virtsaainetta). Geeli autoradiografioitiin Fuji-firman röntgenfilmille käyttäen vahvistinlevyä -70°C :ssa.

9.2.3 Tulokset

Suojattujen fragmenttien suuruutta voitiin arvioida vertaamalla koonmerkitsijöihin (^{32}P -merkitty pBR 322 x Hinf I ja pBR 322 x Hae III). Ei-transfisioidut solut eivät antaneet minkäänlaisia globiinispesifisiä hybridisoimissignaaleja (paitsi renaturoitu hybridisoimissondi = 210 Bp). Transfisioiduista, kuolemattomiksi tehdyistä ihmisen epiteelisoluista uutettu RNA suojasi kahta fragmenttia, joiden suuruus määrettiin 80-90 Bp:llä. Samanlaisia transskriptioita ovat havainneet myös Grosveld et al. Nature 295, 120-126 (1982) ja U.Weidle et al., Nature (1981) ja niiden katsotaan johtuvan sisäisistä kryptisistä halkeamakohdista kaniini- β -globiini-geenissä. Transskriptioita, jotka ovat peräisin kaniini- β -globiini-geenin cap-kohdasta ei voitu todeta. Eräässä vertailukokeessa transformoitiin HeLa-soluja plasmidilla pBR 322 R β G SV 40. Virheettömästi aloitettuja transskriptioita (135 Bp suojattuja) samoin kuin transskriptioita, jotka voivat johtua sisäisen kryptisen halkeamakohdan olemassaolosta [G.Grosveld et al. Nature 295, 120-126 (1982) ja U.Weidle et al. Nature (1983)], todettiin S_1 -kartoituksen avulla.

9.2.4 Arvostelu

Se tosiseikka, että kaniini- β -globiini-spesifisiä transskriptioita voidaan todeta kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen epiteelisoluissa, jotka oli transformoitu SV 40:stä peräisin olevalle eukaryoottisella vektorilla, joka sisältää kaniini- β -globiini-geeniä, todistaa, että tämä solulinja soveltuu isäntä-systeeminä uudelleen tuotujen kloonattujen geenien saamiseen solusta.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä, jonka avulla voidaan saada jatkuvasti viljeltäviä eläin- ja humaanisolulinjoja fuusioimalla normaaleja eläin- ja humaanisoluja biologisten komponenttien kanssa, jotka aikaansaavat viljeltävyyskyvyn in vitro, tunnettu siitä, että fuusioidaan normaaleja eläin- ja humaanisoluja sellaista solufragmenttien kanssa, jotka on saatu muunnetuista soluista, ja jotka eivät yksinään ole lisääntymiskykyisiä, ja viljellä fuusioituja soluja elatusaineessa ilman valinta-aineita.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että fuusioiminen tapahtuu polyetyleeniglykolin tai Sendai-virusten läsnäollessa.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että käytetään solufragmentteina muunnettujen solujen cytochalasin B -käsittelyllä saatuja karyoplasteja tai sytoplasteja.
4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että käytetään liuotuksen tai mekaanisen hajoituksen avulla muunnetuista soluista saatuja solufragmentteja, erikoisesti tumafraktioita tai sytoplasmafraktioita.
5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että fuusioimiseen käytetään mitokondrioita sisältävää sytoplasmafraktiota.
6. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että muunnettuina soluina käytetään myeloomasoluja, Epstein-Barr-viruksilla infektoiduja soluja tai ascites-tuumorisoluja.
7. Jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukaisen menetelmän mukaan valmistetun, jatkuvasti viljeltävän humaanin tai eläinsolulinjan käyttäminen homologisten tai/ja heterologisten solutuotteiden ilmentämiseen, kuten monoklonaalisten

vasta-aineiden, hyytymistekijöiden ja lymfokiinien, tai vaikutusaineiden kokeiluun.

Patentkrav

1. Förfarande för utvinning av permanent odligsbara, animaliska och humana cellinjer genom sammansmältning av normala animaliska och humana celler med biologiska komponenter, som medför odlingsbarhet in vitro, **kännetecknat** av att man sammansmälter normala, animaliska och humana celler med i sig icke förökningsbara cellfragment av transformerade celler och genomför odling av de sammansmälta cellerna i ett odlingsmedium utan selektionssubstanser.
2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att sammansmältningen sker i närvaro av polyetylenglykol eller Sendai-virus.
3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** av att man använder genom behandling med cytokalasin B erhållna karyoplaster eller cytoplaster av transformerade celler.
4. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** av att använder genom lys eller mekanisk uppslutning av transformerade celler erhållna cellfragment, speciellt kärnfraktioner eller cytoplasma-fraktioner.
5. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** av att man använder en mitokondrierik cytoplasmafraktion för sammansmältningen.
6. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att man såsom transformerade celler använder myelomceller, med Eppstein-Barr-virus infekterade celler eller askites-tumörceller.
7. Användning av en enligt förfarandet enligt något av patentkraven 1-6 framställd, permanent odlingsbar mänsklig

eller animalisk cellinje för utvinning av homologa och/eller heterologa cellprodukter, såsom monoklonala antikroppar, levringsfaktorer och lymfokiner eller för testning av verk-samma substanser.