

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

12 **PATENTSCHRIFT** A5

21 Gesuchsnummer: 267/84

22 Anmeldungsdatum: 20.01.1984

30 Priorität(en): 20.01.1983 JP 58-7744
20.01.1983 JP 58-7745

24 Patent erteilt: 31.03.1994

45 Patentschrift
veröffentlicht: 31.03.199473 Inhaber:
Suntory Ltd, Kita-ku/Osaka-shi/Osaka (JP)72 Erfinder:
Nakanishi, Toshihiro, Ibaraki-shi/Osaka (JP)
Matsui, Masashi, Elmsford/NY (US)
Miura, Kenju, Kyoto-shi/Kyoto (JP)
Fukuda, Yoshiaki, Takatsuki-shi/Osaka (JP)
Noguchi, Teruhisa, Fujisawa-shi/Kanagawa-ken (JP)74 Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich54 **Zelllinie für die Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen, Verfahren zur Herstellung einer menschlichen Zelllinie und Antikörper produzierendes Hybridom.**

57 Es werden neue Zelllinien beschrieben, die als Elternzellen zur Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen geeignet sind. Diese Zelllinien leiten sich von Tumorzellen ab, die jedoch keine aus Knochenmark stammenden Tumorzellen sind, wie zum Beispiel Melanomzellen, Hepatomzellen oder Lungenkrebszellen.

Verfahren zur Herstellung der Zelllinien werden erläutert.

Wenn man diese Zelllinien mit menschlichen oder tierischen B-Zellen, die mit einem Antigen sensibilisiert oder immunisiert sind, fusioniert oder verschmilzt, dann erhält man Hybridome, die ein aktives Wachstum besitzen und in der Lage sind, Antikörper zu produzieren.

Die Antikörper werden durch Züchtung dieser Hybridome hergestellt.



Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Zelllinien für die Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen. Die Zellen dieser Zelllinie enthalten Tumorzellen, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind, und die Zellen dieser Zelllinie sind zur Fusionierung mit solchen tierischen Zellen geeignet, die in der Lage sind, Antikörper zu bilden. Vorzugsweise sind die Tumorzellen dieser Zelllinie menschliche Tumorzellen.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemässen menschlichen Zelllinie zur Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen.

Des weiteren betrifft die Erfindung Antikörper bildende Hybridome, welche Hybridzellen aus menschlichen oder tierischen B-Zellen, die mit Antigen immunisiert sind, und Zellen einer Zelllinie für die Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen enthalten.

Schliesslich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines derartigen Antikörper bildenden Hybridoms und die Verwendung der entsprechenden Antikörper produzierenden Hybridome zur Herstellung von Antikörpern.

Ein wesentliches Merkmal der erfindungsgemässen Zelllinien für die Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen besteht darin, dass die Zelllinie Tumorzellen enthält, die keine vom Knochenmark stammenden Zellen sind.

Auf dem Gebiete der Immunologie, Biologie, medizinischen Wissenschaft und Pharmakologie werden intensive Anstrengungen gemacht, um als diagnostische Mittel oder therapeutische Mittel die homogenen und sehr hoch spezifischen Antikörper einzusetzen, nämlich die monoclonen Antikörper, die von solchen Hybridomzellen erzeugt wurden, die in vitro gezüchtet werden können und welche die Fähigkeit besitzen, Antikörper gegenüber spezifischen Antigenen zu produzieren.

Die Möglichkeit, Hybridome herzustellen und sie zur in vitro Erzeugung von biologischen Substanzen heranzuziehen, wurde zuerst im Jahre 1975 von Ceaser Milstein und dessen Mitarbeitern in der Universität Cambridge gezeigt, und es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichung von Milstein C. et al. in «Nature», 256, 495 verwiesen. Diese Autoren erzeugten eine Mutanten-Zelllinie mit der Bezeichnung P3-X63-Ag8 aus dem Myelomstamm P3K der Maus, der von Leo Sacks vom Sall Institute zur Verfügung gestellt wurde. Diese Mutantenzellen wurden dann mit Milzzellen der Maus fusioniert, wobei die Milzzellen mit roten Blutkörperchen von Schafen immunisiert waren. Es zeigte sich, dass das erhaltene Hybridom in der Lage war, in vitro gezüchtet zu werden und dass es dabei monoclonale Antikörper gegenüber roten Blutkörperchen der Schafe bildete.

Ein grosser Vorteil bei der Verwendung von Hybridomen ist derjenige, dass diese ein Mittel sind, um biologisch aktive Substanzen in Massenproduktion herzustellen. Zu diesem Zweck werden Tumorzellen, die eine hohe Sprossungsfähigkeit oder Wucherungsfähigkeit besitzen, die auch als proliferative Fähigkeit bezeichnet wird, mit solchen Zellen fusioniert oder verschmolzen, welche derartige biologisch aktive Substanzen bilden können, welche jedoch üblicherweise in vitro nur eine geringe oder überhaupt gar keine Sprossungsfähigkeit oder Wucherungsfähigkeit besitzen.

Anschliessend an den Bericht von Milstein et al. machten viele Forscher Untersuchungen an Hybridomen, die monoclonale Antikörper gegenüber spezifischen Antigenen produzieren. In allen diesen Untersuchungen waren die Elternzellen, die zur Herstellung der Hybridome verwendet wurden, Tumorzellen, die sich von Knochenmarkzellen ableiteten, beispielsweise von Myelomzellen. Bei den Myelomen handelt es sich um Geschwülste, die vom Knochenmark ausgehen.

Es ist wesentlich, dass die einzigen unsterblichen Elternzellen, die nach den Verfahren des Standes der Technik zur Herstellung von Antikörper produzierenden Hybridomen eingesetzt wurden, Myelomzellen waren. Myelomzellen stammen aus dem Knochenmark und sie sind von Natur aus in der Lage, antikörperähnliches Protein, nämlich Myelomprotein, zu produzieren.

Bisher war man also von der Annahme ausgegangen, dass die einzig verwendbaren unsterblichen Elternzellen, die zur Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen herangezogen werden können, diejenigen sein müssen, die in der Lage sind, antikörperähnliche Substanzen zu bilden. Dementsprechend wurden bisher auch keinerlei Vorschläge gemacht, solche Tumorzellen, die nicht aus dem Knochenmark stammen, zur Herstellung von antikörperbildenden Hybridomen heranzuziehen.

Im Gegensatz hiezu wurde jetzt überraschenderweise gefunden, dass Tumorzellen, die nicht aus dem Knochenmark stammen, wie zum Beispiel Melanomzellen, Hepatomzellen und Lungenkarzinomzellen, als Elternzellen zur Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen herangezogen werden können, obwohl die fraglichen nicht aus dem Knochenmark stammenden Tumorzellen selbst nicht in der Lage sind, antikörperähnliche Proteine zu bilden.

Die genetischen Eigenschaften von Tumorzellen, beispielsweise aus dem Knochenmark stammenden Tumorzellen, wie Myelomzellen, die nötig sind um Hybridome herzustellen, werden in der Folge näher beschrieben und ebenso auch die theoretischen Aspekte bezüglich der Hybridomherstellung.

Die erste Anforderung, die man bei der Herstellung eines Hybridomes aus zwei Arten von Elternzellen oder mehreren Arten von Elternzellen stellen muss, ist diejenige, ein solches System zu verwenden, in dem nur die hybridisierten Zellen überleben, wobei das Überleben der Elternzellen verhindert wird. Deshalb sind bei den meisten Versuchen auf dem Gebiete der Herstellung von Hybridomen, Tumorzellen, die lebhaft in vitro wachsen können, solche mutierte Zellen, die entweder einen Mangel an Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase oder einen Mangel an Thymidin-kinase aufweisen.

In der Folge wird die Hypoxanthin-guaninphosphoribosyl-transferase auch mit HGPRT abgekürzt und die Thymidin-kinase mit TK abgekürzt.

Das genetische und biochemische Verfahren der beiden oben genannten Mutanten ist im wesentlichen das gleiche und dementsprechend wird die nachfolgende Beschreibung, basierend auf den häufiger verwendeten Zellen, die einen Mangel an HGPRT aufweisen, beschrieben.

Wie dies für den Fachmann auf dem Gebiet bekannt ist, ist HGPRT eines der Enzyme, die in allen Zellen für die Synthese von DNA verantwortlich sind, und zwar über einen Rückgewinnungskreislauf auf dem Weg der DNA-Synthese. Genauer erläutert, ist der folgende Sachverhalt anzutreffen:

Wenn die DNA-Synthese in dem De-novo-kreislauf, die Komponenten des Purines oder Pyrimidins als Substrate für die enzymatische Reaktion benötigt, durch einen bestimmten Inhibitor, beispielsweise ein Aminopterin, unterdrückt wird, dann setzt die HGPRT den Wiederrückgewinnungs-Kreislauf als rettenden Ausweg in Gang und die HGPRT ermöglicht dadurch die fortgesetzte DNA-Synthese, die erforderlich ist, um die Zellen am Leben zu erhalten. Dementsprechend können keine Zellen, die einen Mangel an HGPRT aufweisen, in einem solchen Medium überleben, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält, und zwar aufgrund des Aminopterines, welches ein Inhibitor für den De-novo-kreislauf ist.

Ein Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält, wird in der Folge als HAT-Medium abgekürzt.

Die Partnerzellen für die Herstellung eines Hybridoms, beispielsweise Milzzellen, also B-Zellen, sind in der Lage, DNA über beide Wege zu synthetisieren und zwar sowohl über den De-novo-kreislauf als auch über den Wiederrückgewinnungskreislauf. Dementsprechend überleben diejenigen Hybridome, die durch Fusionierung der Milzzellen mit den Elternzellen, die keine HGPRT enthalten, erzeugt wurden, die Hemmung des De-novo-kreislaufes mit Hilfe von Aminopterin in dem HAT-Medium, und diese Hybridome verwerten nämlich in wirksamer Weise das Hypoxanthin des HAT-Mediums um die DNA über den Wiederrückgewinnungskreislauf zu synthetisieren, der von den Milzzellen ins Leben gerufen wird.

Mit anderen Worten ausgedrückt, besitzt das Hybridom sowohl die Fähigkeit der Eltern-Myelomzellen heftig in vitro zu wachsen und auch die Fähigkeit, die DNA über den Wiederrückgewinnungskreislauf zu synthetisieren, der von den Milzzellen auch dann ins Leben gerufen wird, wenn eine Hemmung des De-novo-kreislaufes in Anwesenheit des Aminopterins erfolgt, das in dem HAT-Medium enthalten ist. Ausserdem hat das Hybridom die genetische Information aus den Milzzellen, Immunglobuline, also Antikörper gegen spezifische Antigene zu produzieren, sodass man in der Lage ist, das Hybridom in dem HAT-Medium zu züchten um dadurch Immunglobuline herzustellen.

Der keine HGPRT enthaltende Stamm, der als Elternstamm für die Herstellung des Hybridoms verwendet wird, wird üblicherweise als Zelllinie ausgewählt, die durch ein geeignetes Mutations-Arbeitsverfahren gebildet wird und die gegenüber 8-Azaguanin resistent ist und nicht in der Lage ist, in dem HAT-Medium zu wachsen.

Bei sämtlichen bisher beschriebenen Arbeitsverfahren bestanden diese Elternzellen aus Tumorzellen, die aus dem Knochenmark stammen, beispielsweise Myelomzellen. Die meisten Tumorzellen, die für die Verwendung zur Herstellung von Hybridomen geclont werden können, stammen von Mäusen oder Ratten, und menschliche Myelomzellen werden selten verwendet.

Die Gründe für die seltene Verwendung von menschlichen Myelomzellen sind die folgenden:

1) Solche Clone, die einer Selektion in dem HAT-Medium unterworfen werden können, sind aus menschlichen Myelomzellen schwer herzustellen. In der Folge wird eine Selektion im HAT-Medium auch kurz als HAT-Selektion beschrieben.

2) Menschliche Myelomzellen haben keine grosse Wucherungsfähigkeit oder Sprossungsfähigkeit. Eine grosse Wucherungsfähigkeit oder Sprossungsfähigkeit wird jedoch bei Elternzellen benötigt, damit ein Hybridom, das durch Fusionierung der Elternzellen mit Partnerzellen erzeugt wird, die entsprechende Wachstumsfähigkeit besitzt. Hybridome, die unter Verwendung von menschlichen Myelomzellen erzeugt wurden, hatten dementsprechend bisher nur eine geringe Wachstumsfähigkeit. Des weiteren sind diese Hybridome nicht ausreichend beständig, damit eine grosse Menge der erwünschten Substanz, beispielsweise von Immunglobulinen, hergestellt werden kann.

Dementsprechend war es bisher nach dem Stande der Technik nicht möglich, Hybridome auf Basis von menschlichen Zellen und menschlichen Zellen herzustellen, die eine ausreichende Wachstumsfähigkeit besitzen um nützliche Substanzen zu erzeugen. Bisher waren die Forscher nämlich nicht in der Lage, menschliche Immunglobuline in ausreichenden Mengen aus gezüchteten Zellen herzustellen und statt dessen mussten sie solche Immunglobuline verwenden, die von Hybridomen aus tierischen und tierischen Zellen gebildet wurden. Immunglobuline, die von Hybridomen aus tierischen und tierischen Zellen gebildet werden, sind jedoch Proteine, die für Menschen Fremdproteine darstellen und ihre antigenetischen Eigenschaften verhindern ihre ausgedehnte Verwendung zur Behandlung von Menschen.

Es ist dementsprechend ausserordentlich wünschenswert, Immunglobuline aus Hybridomen aus menschlichen Zellen und menschlichen Zellen herzustellen. Wie bereits erwähnt wurde, war jedoch die massenweise Züchtung von Hybridomen aus menschlichen Myelomzellen ausserordentlich schwierig, und zwar aufgrund ihrer Unbeständigkeit.

Myelomzellen produzieren grosse Mengen an Immunglobulinen, die Myelomproteine genannt werden. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die so hergestellten Immunglobuline Antikörper gegenüber irgend-

welchen spezifischen Antigenen darstellen, und es ist fast unmöglich, Myelomzellen auszuwählen, die einen Antikörper gegenüber einem spezifischen Antigen produzieren. Wissenschaftler haben daraus geschlossen, dass die Anwesenheit von Myelomproteinen das Auswählen oder Screening der Hybridome komplizierter gestaltet oder die Reinigung der Antikörper komplizierter gestaltet, sodass Myelomzellen, die Myelomproteine produzieren, durch solche ersetzt wurden, die keine Myelomproteine produzieren. In anderen Worten ausgedrückt, wird jetzt die Fähigkeit, in vitro zu wachsen, als ein wesentlich wichtigerer Faktor von Myelomzellen angesehen, als die Eigenschaft, dass Myelomzellen als Elternzellen für die Herstellung von Hybridomen herangezogen werden können.

Unter diesen Umständen ist es erwünscht, menschliche Zellen als Elternzellenlinien für die Hybridomherstellung heranzuziehen, und zwar solche, die heftig wachsen und die nach ihrer Fusionierung mit Partnerzellen einer HAT-Selektionierung unterworfen werden können. Ferner wurde es als wünschenswert angesehen, menschliche Hybridome zur Verfügung zu haben, die in vitro ausreichend beständig bleiben, damit grosse Mengen der gewünschten Substanzen produziert werden können, beispielsweise grosse Mengen an Immunoglobulinen.

Man hat allgemein angenommen, dass die Elternzellen, die mit den Partnerzellen zur Herstellung von Hybridomen fusioniert werden, aus solchen Krebszellen abgeleitet werden sollen, die aus dem Knochenmark stammen, beispielsweise aus Myelomen, und zwar einschliesslich solcher Zellen, die mit Hilfe des Epstein-Barr-Virus transformiert wurden. Der Epstein-Barr-Virus wird in der Folge als EBV abgekürzt. Wie jedoch bereits vorher erläutert wurde, haben diese Elternzellen verschiedene Nachteile, die es verhinderten, dass sie in grossem Ausmass in klinischen Anwendungsgebieten verwendet wurden.

Ein Ziel der vorliegenden Erfindung war es daher, einen völlig neuen Typ an verträglichen Zelllinien zur Verfügung zu stellen, die mit Partnerzellen unter Bildung von Hybridomen fusioniert werden können, wobei diese Zelllinien frei von den Nachteilen derjenigen Zelllinien sein sollen, die bisher als Elternzellen eingesetzt wurden. Die Erfindung basiert auf der überraschenden Erkenntnis, dass Tumorzellen, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind, als Elternzellen zur Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen herangezogen werden können, indem man diese Zelllinien, die in vitro heftig wachsen, mit tierischen Zellen, die in der Lage sind, Antikörper zu bilden, fusioniert, wobei sich Hybridome bilden.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Zelllinie für die Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen, die dadurch gekennzeichnet ist, dass diese Zelllinie Tumorzellen enthält, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind, wobei die Zellen dieser Zelllinie zur Fusionierung mit tierischen Zellen, die in der Lage sind, Antikörper zu bilden, geeignet sind, wobei diese Fusionierung eine Hybridom-Zelllinie ergibt, die Antikörper produziert.

Bevorzugte, nicht aus Knochenmark stammende Tumorzellen sind Zellen, die entweder durch eine natürliche Mutation oder durch eine induzierte Mutation von anderen Krebszellen als Knochenmarkszellen gebildet wurden.

Typische Beispiele für verwendbare Tumorzellen sind Zellen von Hautkrebs, also epidermale Krebszellen, beispielsweise Zellen von Melanomen, sowie ferner Zellen von Hepatomen, Zellen von Magenkrebs, Zellen von Eingeweidekrebs, Zellen von Lungenkrebs und Zellen von Brustkrebs. Bevorzugt sind von diesen Zellen Zellen von Melanomen, Zellen von Hepatomen und Zellen von Lungenkrebs.

Spezielle Beispiele für Mutanten sind Zellen mit genetischen Defekten, die nicht in der Lage sind, bestimmte Enzyme zu bilden, die für die DNA-Synthese verantwortlich sind.

Speziell bevorzugte Tumorzellen sind menschliche Tumorzellen und von diesen menschlichen Zellen sind die Melanomzellen, Hepatomzellen oder Zellen von Lungenkrebs bevorzugt.

Von den menschlichen Melanomzellen sind diejenigen von Colo 38 oder M 21 bevorzugt. Diese menschlichen Melanomzellen sind seit langer Zeit zur Durchführung verschiedener Untersuchungen herangezogen worden und es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichung von I. Kohzoh et al. in Cancer Research 41, Seiten 1028–1033, März 1981, hingewiesen.

Von den menschlichen Hepatomzellen sind die Zellen mit der Bezeichnung menschliches Hepatom HC C-4 speziell bevorzugt. Diese Zellen wurden bereits im Jahre 1980 von T. Kuwahara beschrieben, und es sei in diesem Zusammenhang auf die entsprechende Veröffentlichung in Acta Hepatol. Jap., 21 (3), Seiten 303–315 verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemässen menschlichen Zelllinie zur Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen. Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man menschliche Tumorzellen, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind, wobei die Zellen zur Fusionierung mit tierischen Zellen, die in der Lage sind, Antikörper zu bilden, geeignet sind, in einem Medium züchtet, welches 8-Azaguanin oder Bromdesoxyuridin enthält, die gegenüber 8-Azaguanin resistenten Zellen oder die gegenüber Bromdesoxyuridin resistenten Zellen durch Cloning abtrennt und aus den resistenten Clonen diejenigen auswählt, die nicht in der Lage sind, in einem HAT-Medium zu überleben.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemässen menschlichen Zelllinie zur Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen, wobei dieses Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, dass man menschliche Tumorzellen, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind, wobei die Zellen zur Fusionierung mit tierischen Zellen, die in der Lage sind, Antikörper zu bilden, geeignet sind, mit Ultraviolettlicht bestrahlt oder mit einer chemischen Substanz, die eine Mutation hervorruft, behandelt, diese Zellen in einem Medium züchtet, welches 8-Azaguanin oder

Bromdesoxy-uridin enthält, die gegen 8-Azaguanin resistenten oder die gegen Bromdesoxy-uridin resistenten Zellen durch Cloning abtrennt und von diesen resistenten Clonen diejenigen auswählt, die nicht in der Lage sind, in einem HAT-Medium zu überleben.

Vorzugsweise werden also bei diesem Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemässen menschlichen Zelllinie die Tumorzellen vor ihrer Züchtung in dem genannten Medium mit Ultraviolettlicht bestrahlt oder mit einer chemischen Substanz behandelt, die eine Mutation hervorruft.

Die erfindungsgemässen Zelllinien stammen von Elternzellen, die in vitro eine stärkere Wucherung oder Sprossung aufweisen als bisher eingesetzte Zelllinien, die sich von aus Knochenmark stammenden Tumorzellen herleiten, insbesondere von Myelomzellen.

Die erfindungsgemässen Zelllinien sind zur Fusionierung mit Antikörper produzierenden Zellen, beispielsweise B-Zellen, geeignet, wobei durch diese Fusionierung ein Hybridom gebildet wird, das genau so stark wuchernd, bzw. sprossend ist, wie die Elternzellen und welches dennoch beständig genug bleibt, um Immunoglobuline zu erzeugen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper produzierende Hybridoma, welche Hybridzellen aus menschlichen oder tierischen B-Zellen, die mit einem Antigen immunisiert sind, und Zellen einer Zelllinie für die Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen enthalten, wobei die Zelllinie Tumorzellen enthält, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemässen Antikörper produzierenden Hybridomes, und dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man menschliche oder tierische B-Zellen, die mit einem Antigen immunisiert sind, mit Zellen einer erfindungsgemässen Zelllinie fusioniert.

Schliesslich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der genannten Antikörper produzierenden Hybridome zur Herstellung von Antikörpern.

Bei der Herstellung der Hybridome werden die erfindungsgemässen Zelllinien mit B-Zellen, die mit einem spezifischen Antigen sensibilisiert sind, fusioniert. Die entsprechenden B-Zellen können entweder menschliche B-Zellen oder B-Zellen eines anderen Tieres sein.

Bevorzugte Hybridome zur Herstellung von Antikörpern sind Human-Human-Hybridome, die durch Fusionierung erfindungsgemässer Zelllinien, in denen die Tumorzellen menschliche Tumorzellen sind, mit menschlichen B-Zellen erhalten werden, die mit einem Antigen sensibilisiert sind.

Die entsprechenden B-Zellen stammen vorzugsweise aus dem Blut, den Mandeln, also den Tonsillen, den Lymphknoten oder der Milz, wobei diese Zellen von Menschen stammen, die mit einem speziellen Antigen sensibilisiert sind.

Mit diesen Human-Human-Hybridomen können menschliche Immunoglobuline produziert werden, die zur Verabreichung an den Menschen geeignet sind, ohne dass dabei Probleme einer unerwünschten Antigenizität hervorgerufen werden.

In der Folge werden die Figuren kurz erläutert:

Fig. 1 und Fig. 2 sind Draufsichten, die schematisch das Arbeitsverfahren des Ouchterlony Tests veranschaulichen, das im Experiment 1 durchgeführt wird.

In Fig. 1 zeigen (1), (2), (3), (4), (5) und (6) Vertiefungen, die jeweils einen Durchmesser von 2,5 mm aufweisen. Die Vertiefung (7) hingegen besitzt einen Durchmesser von 4,0 mm. Die Entfernung zwischen der Vertiefung (7) und jeder der Vertiefungen (1) bis einschliesslich (6) beträgt 4,0 mm. Die Dicke des in der dargestellten Testschale befindlichen Agarose-Gels beträgt 1,5 mm.

In Fig. 2 besitzen die Vertiefungen (1), (2), (3) und (4) wiederum einen Durchmesser von 2,5 mm. Die Vertiefung (5) hingegen besitzt einen Durchmesser von 4,0 mm. Der Abstand zwischen der Vertiefung (5) und jeder der Vertiefungen (1) bis einschliesslich (4) beträgt 4,0 mm. Die Dicke des in der dargestellten Testschale befindlichen Agarose-Gels beträgt 1,5 mm.

In Fig. 3 ist eine graphische Darstellung von drei Wachstumskurven gegeben. Auf der Abszisse ist dabei die Zeit in Stunden aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Anzahl an Zellen, ausgedrückt in Zellen pro ml angeführt.

Diejenige Kurve, die mit ausgefüllten Kreisen dargestellt ist, zeigt das Wachstum von Melanomazellen, nämlich von Melanoma (Colo 38). Die mit nicht ausgefüllten Kreisen dargestellte Kurve stellt die Wachstumskurve für die Elternzelllinie (ME 1) dar, die eine erfindungsgemässe Zelllinie ist, die zur Herstellung von Hybridomen vorgesehen ist.

Diejenige Kurve, deren Messpunkte mit unausgefüllten Dreiecken dargestellt sind, stellt ebenfalls die Wachstumskurve für die Elternzelllinie ME 1 dar, jedoch wurde in diesem Fall die Züchtung der erfindungsgemässen Zelllinie in Anwesenheit von 8-Azaguanin durchgeführt.

Das Arbeitsverfahren zur Herstellung der neuen erfindungsgemässen Tumorzellenreihen, die zur Herstellung von Hybridomen dienen, das Verfahren zur Herstellung von Hybridomen unter Verwendung dieser Zelllinie als Elternzellen und das Verfahren zur Herstellung von nützlichen biologischen Substanzen unter Verwendung dieser Hybridome, werden in der Folge näher erläutert.

Die erfindungsgemässen Elternzelllinien für die Hybridomherstellung können entweder durch eine natürliche Mutation oder durch eine induzierte Mutation von solchen Tumorzellen erzeugt werden, die keine aus dem Knochenmark stammenden Zellen sind. Als besonders geeignet sind zur Herstellung der

erfindungsgemässen Zelllinien menschliche Tumorzellen, wie zum Beispiel menschliche Melanomzellen, menschliche Lungenkrebszellen und menschliche Hepatomzellen.

Die erfindungsgemässen Hybridome können hergestellt werden, indem man diese neuen Zelllinien mit anderen Elternzellen fusioniert oder verschmilzt, d.h. mit einem Partner, der sich von den B-Zellen von Tieren, einschliesslich von Menschen, die mit irgendeinem speziellen Antigen immunisiert sind ableitet.

Aus Gründen der Einfachheit wird der Erfindungsgegenstand in der Folge unter spezieller Bezugnahme auf diejenige Ausführungsart der Erfindung beschrieben, bei der ein monoklonaler Antikörper aus der Kultur eines Hybridomes hergestellt wird, indem man menschliche Tumorzellen mit Milzzellen der Maus fusioniert.

Der monoklonale Antikörper wird in der Folge auch mit MoAb abgekürzt. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass der Erfindungsgegenstand in keiner Weise auf diese hier im einzelnen beschriebene Ausführungsart beschränkt ist.

Das Verfahren zur Herstellung der menschlichen Tumorzellen, die als Elternzellen für die Herstellung von Hybridomen dienen, beginnt im allgemeinen mit der Isolierung eines Clones, der ein bestimmtes Enzym nicht aufweist, nämlich im vorliegenden Fall HGPRT, das bei der DNA-Synthese im Rückgewinnungskreislauf teilnimmt. Dadurch wird die nachfolgende Selektion der Hybridome mit Hilfe des HAT-Mediums möglich.

Dieses Arbeitsverfahren kann nach einer der beiden folgenden Arbeitsmethoden durchgeführt werden.

Bei der einen Arbeitsmethode wird eine geeignete Konzentration an 8-Azaguanin direkt dem Zuchtmedium zugesetzt, sodass man einen gegenüber 8-Azaguanin resistenten Stamm erhält.

Beim anderen Arbeitsverfahren werden Krebszellen entweder mit einer UV-Bestrahlung behandelt oder mit Hilfe eines Mutation hervorrufenden Mittels, und zwar in Abhängigkeit von dem speziellen Typ an Krebszellen, der verwendet wird. Die so behandelten Zellen werden dann anschliessend in ein Medium übertragen, das 8-Azaguanin enthält.

Die Bestrahlung mit dem Ultraviolettlicht wird durchgeführt, indem man die Zellen mit einer Ultraviolettlampe (GL-15), die sich 30 cm oberhalb der Zellkultur befindet, während eines Zeitraumes von 15 Sekunden bis 10 Minuten bestrahlt.

Ein geeignetes, die Mutation hervorrufendes Mittel ist Äthylmethan-sulfonat, das in der Folge auch als EMS abgekürzt wird oder N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, das in der Folge auch als MNNG abgekürzt wird. Diese die Mutation hervorrufenden Mittel werden in einer Menge von 0,05–10 µg/ml eingesetzt. Nachdem die Zellen in Anwesenheit des die Mutation hervorrufenden Mittels während eines Zeitraumes von mehreren Stunden bis zu drei Tagen gezüchtet worden waren, wird die Kultur kräftig mit einem serumfreien Medium gewaschen und man überträgt dann in ein Medium, welches 8-Azaguanin enthält.

Unabhängig von dem Arbeitsverfahren, das angewandt wird, endet der erste Arbeitsschritt dieses Verfahrens mit dem Auftreten von ein oder mehr Stämmen, die gegenüber 8-Azaguanin resistent sind.

Der zweite Arbeitsschritt besteht in einer Überprüfung um festzustellen, ob die Zellen des gegen 8-Azaguanin resistenten Stammes eine nachfolgende Selektion mit Hilfe des HAT-Mediums erlauben.

Hiezu werden die Zellen des gegen 8-Azaguanin resistenten Stammes in einem geeigneten Medium gezüchtet, welches dann durch Zentrifugieren entfernt wird. Die Zellen werden anschliessend zweimal mit dem HAT-Medium gewaschen und dann in ein frisches HAT-Medium in einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml übertragen. Nach einer fünf Tage dauernden Bebrütungsphase werden dann die Zellen mit Trypan-Blau gefärbt. Wenn es sich zeigt, dass beinahe alle Zellen tot sind, dann werden Zellen des gleichen gegenüber 8-Azaguanin resistenten Stammes in einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml auf eine Vertiefungen aufweisende Mikroplatte übertragen, nachdem vorher bereits 10^5 Futterzellen, beispielsweise Milzzellen, in jede der Vertiefungen der Platte eingebracht worden waren. Zur Durchführung dieses Arbeitsverfahrens wurde eine Mikroplatte mit 96 Vertiefungen mit der Bezeichnung Costar Nr. 3596 verwendet. Bevor man die gegenüber 8-Azaguanin resistenten Zellen auf die Platten aufträgt, werden sie auf eine solche Konzentration verdünnt, dass man sicher ist, dass nicht mehr als eine einzige Zelle in jeder Vertiefung der Platte anwesend sein wird. Im allgemeinen wird dies erreicht, indem die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von Zellen so eingestellt wird, dass ein Durchschnittswert von nur 0,1 Zellen pro Vertiefung eingehalten wird.

Die auf der Platte befindlichen Zellen werden etwa eine Woche lang bebrütet. Man lässt die Clone sich in der Zellpopulation vermehren und sobald diese Clone etwa 10^5 Zellen/ml erreicht haben, gibt man ihnen wieder HAT-Medium zu und belässt sie dann, bis alle von ihnen abgestorben sind. Dieses oben beschriebene Arbeitsverfahren wird vorzugsweise mindestens zweimal wiederholt. Der zweite Arbeitsschritt endet mit der Bestätigung, dass eine vollständige Abtötung der gegenüber 8-Azaguanin resistenten Zellen in dem HAT-Medium erfolgt ist. Es ist nötig, dass das 8-Azaguanin immer in dem HAT-Medium zugesetzt wird, bis die erwünschte Zelllinie sich gebildet hat.

In den oben beschriebenen Arbeitsverfahren kann das 8-Azaguanin durch Brom-desoxy-uridin ersetzt werden, wenn die Clone das Enzym Thymidin-kinase nicht enthalten und auch in diesem Fall kann eine Empfindlichkeit gegenüber dem HAT-Medium erhalten werden, weil ja eine Komponente desselben Thymidin ist. In der Folge wird das Brom-desoxy-uridin mit BudR abgekürzt und die Thymidin-kinase mit TK abgekürzt.

Nachdem sich die erwünschte Zelllinie gebildet hat, wird sie in einem Medium belassen, das, falls dies geeignet ist, Azaguanin enthält. Das Medium zur Züchtung der Zelllinie, die sich gebildet hat, kann das gleiche sein, wie dasjenige, das verwendet wurde, ehe die Mutation der menschlichen Tumorzellen stattgefunden hat. Ausserdem kann die gebildete Zelllinie als Elternzellen für die Herstellung von Hybridomen herangezogen werden, ohne dass eine spezielle Zusammensetzung des Mediums benötigt wird.

Die gebildete Zelllinie kann wirksam nach üblichen Arbeitsverfahren gelagert werden, indem man sie in einem Medium suspendiert, das 10% fötales Kälberserum und 10% Dimethylsulfoxid enthält. Anschliessend bewahrt man diese Suspension entweder unter flüssigem Stickstoff auf oder in einem Tiefkühlschrank, der eine Temperatur von etwa -80°C oder eine noch tiefer liegende Lagerungstemperatur gewährleistet.

In der Folge wird das fötale Kälberserum auch mit FCS abgekürzt und das Dimethylsulfoxid mit DMSO abgekürzt.

Die gebildete erfindungsgemässe Zelllinie ist als Elternzellen für die Herstellung von Hybridomen nützlich. Wenn diese Zelllinie aus menschlichen Tumorzellen stammt, dann ist sie als Elternzellenreihe für die Herstellung von Hybridomen aus menschlichen Zellen und menschlichen Zellen geeignet, die in der Folge auch als Human-Human-Hybridome bezeichnet werden. Der andere Elternteil dieser Hybridome, nämlich die Partnerzellen, müssen B-Zellen sein und diese Zellen können aus dem peripheren Blut, den Mandeln (Tonsillen), dem Lymphknoten und der Milz von Menschen stammen, die mit irgendeinem speziellen Antigen immunisiert sind. Ein grosser Vorteil der Hybridome aus menschlichen Zellen und menschlichen Zellen besteht darin, dass man annehmen kann, dass mit deren Hilfe Immunglobuline hergestellt werden können, welche menschliche Proteine sind und welche dementsprechend an Menschen verabreicht werden können, ohne dass das Problem der unerwünschten Antigenizität hervorgerufen wird.

Noch wichtiger ist es jedoch, dass man annimmt, dass mit Hilfe der erfindungsgemässen Zelllinie die Herstellung von Hybridomen möglich ist.

Das Verfahren zur Herstellung von Hybridomen unter Verwendung der gebildeten Zelllinie als Elternzellen, kann wie folgt durchgeführt werden:

Das verwendete Medium kann irgend eines der üblichen Medien sein, zum Beispiel Eagle MEM, das von Dulbecco verbesserte MEM mit der Bezeichnung «Dulbecco's improved MEM» und auch das Medium RPMI 1640.

Die fraglichen Medien enthalten 10% Kälberserum, bzw. 5% fötales Kälberserum +5% Kälberserum, bzw. 10% fötales Kälberserum. In der Folge wird das Kälberserum auch mit CS abgekürzt, während das fötale Kälberserum, wie bereits erwähnt, mit FCS bezeichnet wird.

Für das übliche Aufrechterhalten und Aufbewahren der Elternzellen kann irgendeines dieser Medien angewandt werden, jedoch für den speziellen Zweck der Hybridomherstellung ist ein Medium bevorzugt, das 10% an fötalem Kälberserum enthält.

Beim ersten Arbeitsschritt werden die Elternzellen, d.h. menschliche Krebszellen, und die Partnerzellen, d.h. Milzzellen, in einem Verhältnis von 1:5 unter Verwendung des Hämagglutinin-Virus von Japan, oder unter Verwendung von Polyäthylenglycol als Mediator verschmolzen oder fusioniert.

Der Hämagglutinin-Virus von Japan, der in der Folge auch mit HVJ abgekürzt wird, ist auch unter der Bezeichnung Sendai-Virus bekannt.

Eine 30–50%ige Lösung an Polyäthylenglycol-1000 ist als Mediator bevorzugt.

Die fusionierten Zellen können dann einer HAT-Selektion unterworfen werden, indem man das weiter oben beschriebene Arbeitsverfahren durchführt. Die Aussortierung oder das Screening der erhaltenen Hybridomzellen wird hauptsächlich durchgeführt, indem man überprüft, ob in der über der Kultur stehenden Flüssigkeit Immunglobuline auftreten. Man liest dann diejenigen Hybridomclone auf, die Immunglobuline bilden, und zwar nach der SPA-Bindungs-SRBC-Methode oder nach der ELISA-Methode, wobei diese zuletzt genannte Methode auch als Dynatech-Methode bezeichnet werden kann.

Betreffend die SPA-Bindungs-SRBC-Methode, in der englischsprachigen Literatur als «SPA-bind-SRBC-method», sei darauf hingewiesen, dass in dieser Bezeichnung der Wortteil «SPA» Staphylococcus-aureus-Protein A. bedeutet, und es sei in diesem Zusammenhang auf das verwiesen, was in «Procedures of Immunological Experiments VII» auf Seite 2375 beschrieben wird.

Man lässt die Clone allmählich in ihrer Zellpopulation wachsen und sobald sie eine Grösse von 10^5 Zellen/ml erreicht haben, unterwirft man sie einem sogenannten Subcloning. Um zu gewährleisten, dass alle der Hybridomzellen tatsächlich monoclonal sind, werden sie auf Mikroplatten aufgetragen, die 96 Vertiefungen besitzen, wobei in jede dieser Vertiefungen etwa 10^5 normale Milzzellen gegeben werden, die als Futterschicht in diese Vertiefungen aufgetragen worden waren. Die Hybridomzellen sollen dabei auf eine solche Konzentration verdünnt werden, dass man sicher geht, dass nicht mehr als eine einzige Zelle in jeder der Vertiefungen der Platte anwesend ist. Dies wird erreicht, indem man so stark verdünnt, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Zellen in einer Vertiefung nur bei 0,1 Zelle pro Vertiefung liegt.

Anschliessend wird dann während etwa einer Woche bebrütet. Die so erhaltenen Clone werden auf ihr Fähigkeit getestet, einen spezifischen Antikörper zu bilden. Das oben beschriebene Arbeitsverfahren wird wiederholt, bis man monoclonale Hybridomzellen erhalten hat.

Die Immunglobuline, die durch die Hybridome gebildet werden, können leicht bezüglich ihrer Klasse

und ihrer Unterklassen nach dem Arbeitsverfahren von Ouchterlony getestet werden, indem man ein Agarose-Gel verwendet. Antikörper zu den Immunglobulinen, von denen man annimmt, dass sie durch die Hybridome gebildet werden, lässt man dann mit dem über dem Zuchtmedium überstehenden Material auf einer Agarose-Platte reagieren. Es wird dabei beobachtet, dass sich 24 Stunden später eine Niederschlagslinie bildet. Bezüglich Einzelheiten der Ausführung dieses Ouchterlony-Verfahrens sei auf das nachfolgende Experiment 1 verwiesen.

Wie man aus der vorangegangenen Beschreibung sieht, widerspricht die vorliegende Erfindung der Schlussfolgerung von Milstein et al., dass eine Zelllinie von Elternzellen für die Herstellung von Hybridomen diejenige von Tumorzellen sein muss, wie zum Beispiel Myelomzellen oder B-Zellen-Lymphomen, die von Knochenmarkszellen stammen. Mit anderen Worten wurde jetzt völlig überraschend gefunden, dass beliebige Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, in vitro zu wachsen und dass sie verwendet werden können, um eine Zelllinie von Elternzellen zu erzeugen, die zur Herstellung von Hybridomen geeignet sind. Die erfindungsgemässen Zelllinien, die auf Basis von menschlichen Tumorzellen zur Verfügung gestellt werden, können viel einfacher gezüchtet werden, als bisher übliche Zelllinien auf Basis von Myelomzellen und dennoch sind die erfindungsgemässen Zelllinien beständiger und sie sind auch stärker sprossend, bzw. sich vermehrend als die bisher bekannten Zellreihen.

Indem man die erfindungsgemässen Zelllinien als Elternzellen einsetzt, kann ein erfindungsgemässes Hybridom aus Menschenzellen und Mauszellen hergestellt werden.

Anhand der nachfolgenden Beispiele und experimentellen Angaben wird das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemässen Zelllinie von Elternzellen erläutert, und ferner das Verfahren zur Herstellung eines Hybridomes, ausgehend von der Zelllinie der Elternzellen und ausserdem das Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers aus dem entsprechenden Hybridom und ferner eine Methodik zur Identifizierung dieses Antikörpers.

Beispiel 1

Verfahren zur Herstellung von menschlichen Tumorzellen Colo 38 in Form einer Zelllinie, die als Elternzellen zur Herstellung von Hybridomen verwendbar ist.

Methode A

In den folgenden Arbeitsbeispielen werden alle Kultivierungen in einer Atmosphäre durchgeführt, die 5% CO₂ + 95% Luft enthält, unter Aufrechterhaltung einer relativen Feuchtigkeit von etwa 100% und bei einer Temperatur von 37°C.

Menschlichen Zellen aus einem malignen Melanom mit der Bezeichnung Melanomzellen (Colo 38) wurden zwei oder drei Tage gezüchtet, bis sie eine logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten. Zu diesen Zellen wurde das Mutation induzierende Mittel N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, das von der Firma Sigma Chemical Co. in den Handel gebracht wird, zugegeben, und zwar in einer Menge, dass eine endgültige Konzentration von 0,05–10 µg/ml erreicht wurde.

Das N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin wird in der Folge mit MNNG abgekürzt.

Nach 36 Stunden Bebrütung bei einer Konzentration an MNNG von 5 µg/ml, zeigte es sich, dass etwa 20% der Melanomzellen tot waren. Aus dem Kulturmedium wurde dann das MNNG entfernt, indem man mit serumfreiem RPMI 1640 wusch, wobei man drei Zentrifugierungen vornahm.

Das RPMI 1640 ist ein Produkt, das von der Firma Nissui Seiyaku Co., Ltd. in den Handel gebracht wurde.

Eine Gesamtmenge von 10 ml an so behandelten Zellen, die 2×10^5 Zellen/ml enthielt, wurde zu einem Medium zugegeben, das 8-Azaguanin in einer Endkonzentration von 1–50 µg/ml enthielt. Die Züchtung wurde bei der jeweils verwendeten Konzentration in dem 8-Azaguanin innerhalb des oben genannten Bereiches während mindestens einer Woche durchgeführt, und man vergewisserte sich, dass mindestens 99% der Zellen innerhalb einer Woche absterben, wenn eine Konzentration von 20 µg/ml an 8-Azaguanin angewandt wird. Bei dieser Konzentration an 8-Azaguanin, züchtete man weiter während mindestens zwei Wochen, gerechnet vom Beginn an, wobei täglich das Wachstum der Zellen beobachtet wurde.

Etwa zwei Wochen später trat ein rasches Wachstum der Zellen auf. Dementsprechend wurden dann die Zellen durch Zentrifugieren gewonnen und sie wurden zu einem Medium zugesetzt, das 8-Azaguanin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml enthielt. Die Anzahl an Zellen, die zugesetzt wurde, war die gleiche, wie diejenige, die bei der ersten Behandlung mit dem 8-Azaguanin angewandt wurde, nämlich 2×10^5 Zellen/ml. Diejenigen Zellen, die eine zwei Wochen dauernde Bebrütung in dem Medium überlebten, wurden als Stämme, die gegenüber 8-Azaguanin resistent sind, ausgewählt.

Zellen der gegen 8-Azaguanin resistenten Stämme wurden mit einem serumfreien Medium gewaschen, indem man drei Zentrifugierungen vornahm, und man übertrug sie dann in 10 ml eines HAT-Mediums. Das Medium bestand aus dem RPMI 1640 Medium, das mit 10% an fötalem Kälberserum ergänzt war und zu dem man ferner Hypoxanthin in einer Konzentration von 10^{-4} Mol, sowie Aminopterin in einer Konzentration von 4×10^{-7} Mol und ausserdem Thymidin in einer Konzentration von $1,6 \times 10^{-5}$ Mol zugesetzt hatte. Das verwendete fötale Kälberserum war das Produkt der Firma CSL Co. in Australien.

Die Konzentration der Zellen in dem HAT-Medium betrug 10^5 Zellen/ml. Am fünften Tag der Bebrütung wurden die Zellen auf ihr Überleben getestet, indem man sie mit Trypan anfärbte.

Wenn es sich zeigte, dass alle Zellen in dem HAT-Medium tot waren, wurde ein weiterer Anteil der gegen 8-Azaguanin resistenten Zellen des gleichen Stammes in die 96 Vertiefungen der Testplatte eingebracht, und zwar in einer solchen Menge, dass die Wahrscheinlichkeit bestand, dass ein Durchschnittswert von 0,1 Zellen pro Vertiefung vorlag. Die Zellen wurden zusammen mit Milzzellen eingebracht, die vorher als Futtermittelschicht in jede Vertiefung in einer Konzentration von 10^5 Zellen pro Vertiefung eingebracht worden waren. Nachdem man etwa eine Woche lang bebrütet hatte, hatten sich in den insgesamt 96 Vertiefungen sechs Clone gebildet. Indem man die Bebrütung während noch weiterer ein oder zwei Wochen fortsetzte, war die Anzahl der Zellen in jedem der Clone auf etwa 10^5 Zellen/ml angestiegen.

Anschliessend wurden sämtliche Clone einer HAT-Selektionierung unterworfen. Die Zellen in jedem Clon starben innerhalb von fünf Tagen ab.

Einer der sechs Clone wurde nochmals in die 96 Vertiefungen der Testplatte in der gleichen Weise wie oben beschrieben, eingebracht und so einem Subcloning unterworfen, wobei man 8 Clone erhielt. Auch in diesem Fall liess man die Anzahl der Zellen in dem Clon ansteigen und dann unterwarf man sie einer Hat-Selektionierung, um zu bestätigen, dass alle Zellen in dem HAT-Medium abgestorben waren.

Die so erhaltenen Zellen des menschlichen malignen Melanoms, die gegenüber 8-Azaguanin resistent waren und die gegenüber einer HAT-Selektionierung empfindlich oder sensitiv waren, wurden als Zelllinien der ME 1 Serie bezeichnet. Diese Zellen wurden in einem Medium gelagert, das 10% fötales Kälberserum, 10% Dimethylsulfoxid und 80% übliches Medium enthielt. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff oder in einem Tiefkühlschrank bei einer Temperatur von etwa -80°C .

Beispiel 2

Herstellung einer Elternzelllinie für die Erzeugung von Hybridomen, ausgehend von menschlichen Tumorzellen Colo 38

Methode B

Die hier beschriebene Methode B unterschied sich von der vorhergehend beschriebenen Methode A dahingehend, dass die Mutation durch eine UV-Bestrahlung hervorgerufen wurde und nicht durch einen Behandlung mit einem chemischen Mittel, das Mutationen hervorruft.

Die Zellen des menschlichen malignen Melanoms, die sich in einer logarithmischen Vermehrungsphase befanden, wurden in eine Petri-schale eines Durchmessers von 10 cm gegeben, und zwar in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml. In die Petri-schale wurde eine Gesamtmenge an 10 ml eingebracht. Dann wurde eine Bestrahlung mit einer UV Lampe durchgeführt, und zwar der Lampe mit der Bezeichnung GL-15 der Firma Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., wobei die Lampe 30 cm über der Petri-schale angeordnet war. Anschliessend wurde dann 8-Azaguanin zu den Zellen in einer solchen Konzentration zugegeben, dass die Endkonzentration $20 \mu\text{g/ml}$ betrug.

Innerhalb etwa einer Woche waren mindestens 99,5% der Zellen abgestorben. Die Bebrütung wurde noch während etwa zwei weiteren Wochen unter den gleichen Bedingungen fortgesetzt, wobei die Kulturen täglich beobachtet wurden. Etwa drei Wochen nach der ersten Zugabe von 8-Azaguanin, stieg die Anzahl der Zellen rasch an und es bildete sich eine einheitliche Suspension von Zellen. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren gewonnen und man gab sie in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml zu einem Medium zu, in welchem 8-Azaguanin in einer endgültigen Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ anwesend war. Diejenigen Zellen, die eine Bebrütung von zwei Wochen überlebten, wurden als Zellen ausgewählt, die gegenüber 8-Azaguanin resistent sind.

Diese resistenten Zellen wurden anschliessend der HAT-Selektionierung in der in Beispiel 1 beschriebenen Weise unterworfen, und man erhielt so drei Zellreihen der ME 1 Serien.

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Zellen, die gegenüber 8-Azaguanin resistent sind, betrug etwa 1/5 desjenigen Wertes, der in Beispiel 1 erreicht wurde. Die Wahrscheinlichkeit, mit der die gegenüber 8-Azaguanin resistenten Zellen, jedoch gegenüber einer HAT-Selektionierung empfindlich, also sensitiv waren, war jedoch in beiden Beispielen die gleiche.

Beispiel 3

Herstellung von Zelllinien von Elternzellen für die Hybridomherstellung, ausgehend von menschlichen Tumorzellen Colo 38

Methode C

Die hier beschriebene Methode C unterscheidet sich von den Methoden A und B dahingehend, dass das 8-Azaguanin jetzt direkt zu einem Zuchtmedium von menschlichen Tumorzellen zugesetzt wird.

10 ml einer Kultur, die 2×10^5 Zellen/ml enthielt, wobei die Zellen menschliche maligne Melanomzellen mit der Bezeichnung Colo 38 waren, wurden verwendet, wobei sich die Kultur in der logarithmischen Vermehrungsphase befand. Diese Kultur wurde fünf Tage lang in Anwesenheit von 8-Azaguanin, das in einer Konzentration von 5 µg/ml anwesend war, bebrütet.

- 5 Anschliessend wurde die Menge an dem 8-Azaguanin erhöht, bis man eine endgültige Konzentration von 20 µg/ml erreicht hatte. Innerhalb von zehn Tagen der Bebrütung, waren fast alle Zellen abgestorben. Die Bebrütung wurde jedoch noch während etwa 20 weiterer Tage unter den gleichen Bedingungen fortgesetzt.

- 10 Die Wahrscheinlichkeit, ein Zellwachstum zu erreichen, war gering, aber ein rasches Ansteigen der Anzahl der Zellen trat in einer der 18 getesteten Kolben auf. Ein Anteil dieses Kolbens mit dem erhöhten Zellwachstum wurde zwei weitere Wochen lang in Anwesenheit von 8-Azaguanin bei einer Endkonzentration an dem 8-Azaguanin von 50 µg/ml gezüchtet. Diejenigen Zellen, die in der Lage waren, unter diesen Bedingungen normal zu wachsen, wurden als gegenüber 8-Azaguanin resistente Zellen selektioniert.

- 15 Diese Zellen wurden anschliessend einer HAT-Selektionierung nach der in Beispiel 1 beschriebenen Arbeitsweise unterworfen und man erhielt dabei sechs Zellreihen der ME 1 Serien.

In den Beispielen 1 bis 3 wurde eine Gesamtzahl von 17 Zellreihen an ME 1 Serien hergestellt, und zwar nach drei unterschiedlichen Methoden, ausgehend von menschlichen malignen Melanomzellen der Bezeichnung Colo 38.

- 20 Diese Zelllinien wurden als SUN N-21-1 mit aufsteigender letzter Ziffer bis einschliesslich SUN N-21-17 bezeichnet.

Beispiel 4

- 25 Herstellung einer Zelllinie von Elternzellen für die Hybridomerzeugung, ausgehend von menschlichen Tumorzellen M 21

- 30 Anhand dieses Beispiels sieht man, dass eine Zelllinie von Elternzellen für die Hybridomherstellung auch ausgehend von anderen menschlichen Tumorzellen erzeugt werden kann als den Zellen Colo 38. Das Arbeitsverfahren, das in diesem Beispiel 4 angewandt war, war im wesentlichen das gleiche, wie dasjenige, das in Beispiel 1 eingesetzt wurde.

- 35 Die menschlichen Melanomzellen mit der Bezeichnung M 21 wurden 60 Stunden lang gezüchtet, bis die logarithmische Vermehrungsphase erreicht war. Als Mittel zur Hervorrufung der Mutation wurde N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, das in der Folge mit MNNG abgekürzt wird, zugegeben, und zwar bis zur Erreichung einer endgültigen Konzentration von 5 µg/ml.

Nachdem man 36 Stunden lang bebrütet hatte, während welcher Zeit etwa 35% der Melanomzellen abgestorben waren, wurde aus dem Zuchtmedium das MNNG entfernt, indem man mit einem serumfreien Medium RPMI 1640 wusch, wobei man bis zu drei Mal zentrifugierte.

- 40 Insgesamt 10 ml, die pro ml 2×10^5 lebensfähige Zellen enthielten, wurden in einem Medium bebrütet, das 8-Azaguanin in einer endgültigen Konzentration von 20 µg/ml enthielt. Innerhalb einer Woche waren mindestens 99,5% der Zellen abgestorben, aber die Bebrütung wurde unter den gleichen Bedingungen während zwei weiteren Wochen fortgesetzt.

- 45 Die Kulturen wurden ein Mal pro Tag bezüglich irgendeines Zellwachstums unter Verwendung eines Mikroskopes kontrolliert. Etwa 20 Tage später trat ein allmähliches Ansteigen der Anzahl der Zellen auf und innerhalb von fünf weiteren Tagen entstand ein schnelles Zellwachstum. Die wachsenden Zellen wurden gewonnen, indem man zentrifugierte und sie wurden in 10 ml eines Mediums in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml suspendiert. Das verwendete Medium enthielt 8-Azaguanin in einer endgültigen Konzentration von 50 µg/ml. Die Bebrütung wurde während etwa zwei Wochen fortgesetzt, und diejenigen Zellen, die sich in ihrer Anzahl vermehrt hatten, wurden als gegenüber 8-Azaguanin resistente Zellen ausgewählt.

- 50 Diese Zellen wurden einer HAT-Selektionierung unterworfen und auch das in Beispiel 1 beschriebene Subcloning wurde durchgeführt. Als Ergebnis erhielt man von diesen menschlichen Melanomzellen der Bezeichnung M-21 sechs Zelllinien von Elternzellen für die Hybridomherstellung, wobei die Zellen gegenüber 8-Azaguanin resistent waren und in dem HAT-Medium abstarben.

- 55 Jede dieser sechs Zellreihen wurde erkannt, und zwar beginnend mit SUN N-22-1 mit aufsteigender letzter Ziffer bis einschliesslich SUN N-22-6 der ME 2 Serien.

Beispiel 5

- 60 Herstellung von Zelllinien die als Elternzellen für die Hybridomherstellung geeignet sind, ausgehend von menschlichen Hematomzellen

Methode D

- 65 Menschliche Hematomzellen mit der Bezeichnung HC C-4 wurden im Medium RPMI 1640 während

24 Stunden gezüchtet. Zu der Kultur wurde als Mittel zur Hervorrufung der Mutation Äthyl-methan-sulfonat bis zur Erreichung einer endgültigen Konzentration von 1 mM zugesetzt. Das Äthyl-methan-sulfonat ist von der Firma Sigma Chemical Co. erhältlich und es wird in der Folge auch mit EMS abgekürzt.

5 Durch eine dreistündige Bebrütung wurde eine Mutation in den menschlichen Hepatomzellen HC C-4 hervorgerufen. Die Zellen wurden anschliessend drei Mal mit einem serumfreien RPMI 1640 Medium gewaschen und in einem gesamten, also einem Serum enthaltenden RPMI 1640 Medium während eines Zeitraumes von 48 Stunden bis 72 Stunden gezüchtet. Anschliessend erfolgte eine 3–4 Wochen dauernde Züchtung in einem RPMI 1640 Medium, welches ausserdem 2,0 µg/ml an 8-Azaguanin enthielt.

10 Etwa drei Wochen später trat ein rasches Ansteigen in der Anzahl der Zellen auf, und einheitliche Clone von anhaftenden Zellen bildeten sich. Die Kulturen wurden zwei weitere Wochen lang in einem RPMI 1640 Medium bebrütet, das jedoch jetzt 10 µg/ml an 8-Azaguanin enthielt. Die wachsenden Zellen wurden als gegenüber 8-Azaguanin resistente Zellen ausgewählt.

15 Diese Zellen wurden anschliessend bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer HAT-Selektionierung nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren überprüft. Als Ergebnis wurden acht Clone an Zellen erhalten, die eine Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase enthielten. Diese Zelllinien, die als Elternzellen für die Hybridomherstellung geeignet sind, konnten also ausgehend von menschlichen Hepatomzellen hergestellt werden.

20 Die erhaltenen acht Clone wurden einzeln bezeichnet, und zwar beginnend mit SUN N-31-1 mit aufsteigender letzter Ziffer, bis einschliesslich SUN N-31-8.

Beispiel 6

25 Herstellung von Zelllinien, die als Elternzellen für die Hybridomerzeugung geeignet sind, ausgehend von menschlichen Hepatomzellen

Methode E

30 In der gleichen Weise, wie dies im Beispiel 5 beschrieben ist, wurde eine Kultur von menschlichen Hepatomzellen mit der Bezeichnung HC C-4 mit dem eine Mutation hervorrufenden Mittel Äthylmethan-sulfonat behandelt. Aus der Zellkultur wurde dann das Äthyl-methan-sulfonat entfernt, indem man mit einem serumfreien RPMI 1640 Medium wusch.

35 Anschliessend wurden die Kulturen 3–4 Wochen lang in einem Medium bebrütet, das 2,0 µg/ml an Bromodesoxyuridin enthielt. Das Bromodesoxyuridin ist von der Firma Sigma Chemical Co. erhältlich und es wird in der Folge mit BudR abgekürzt. Die unter diesen Bedingungen wachsenden Zellen wurden dann in ein Medium übertragen, das 10 µg/ml an BudR enthielt und sie wurden dort etwa zwei Wochen lang bebrütet. Diejenigen Zellen, die unter diesen Zuchtbedingungen ein Wachstum erreichten, wurden als gegenüber BudR resistente Zellen ausgewählt.

40 Die Zellen wurden anschliessend auf ihre Empfindlichkeit gegenüber einer HAT-Selektionierung nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren überprüft. Als Ergebnis erhielt man 6 Clone an Zelllinien, die keine Thymidin-kinase, abgekürzt als TK enthielten. Diese Zellen sind als Elternzellen für die Hybridomherstellung geeignet und sie konnten ausgehend von menschlichen Hepatomzellen erhalten werden.

45 Die 6 erhaltenen Clone wurden einzeln bezeichnet, und zwar beginnend mit SUN N-32-1 mit aufsteigender letzter Ziffer bis einschliesslich SUN N-32-6.

Beispiel 7

50 Herstellung von Zelllinien, die als Elternzellen für die Hybridomerzeugung geeignet sind, ausgehend von menschlichen Lungenkarzinomzellen

55 Menschliche Lungenkarzinomzellen mit der Bezeichnung A-549 wurden in einem RPMI 1640 Medium 24 Stunden lang gezüchtet. Zu den Kulturen wurde dann als Mittel zur Hervorrufung von Mutationen Äthyl-methan-sulfonat in einer solchen Menge zugesetzt, dass eine endgültige Konzentration von 1 nM erreicht wurde. Durch eine dreistündige Bebrütung wurde eine Mutation bei den menschlichen Lungenkarzinomzellen A-549 hervorgerufen.

60 Anschliessend wurden die Zellen drei Mal mit einem serumfreien RPMI 1640 Medium gewaschen, und man züchtete sie dann in einem gesamten, also Serum enthaltenden RPMI 1640 Medium während eines Zeitraumes im Bereich von 48 bis 72 Stunden.

Anschliessend wurden die Zellen 3–4 Wochen lang in einem RPMI 1640 Medium gezüchtet, das 2,0 µg/ml an Bromodesoxyuridin, abgekürzt als BudR enthielt. Etwa drei Wochen später trat ein rasches Ansteigen der Anzahl der Zellen auf, und es bildete sich eine einheitliche Schicht dann miteinander zusammenhaftenden Zellen.

65 Anschliessend wurde die Kultur zwei weitere Wochen lang in einem RPMI 1640 Medium gezüchtet,

das jetzt aber 10 µg/ml an BudR enthält. Diejenigen Zellen, bei denen ein gutes Wachstum erreicht wurde, wurden als gegenüber BudR resistente Zellen ausgewählt.

Diese Zellen wurden anschliessend auf ihre Empfindlichkeit gegenüber einer HAT-Selektionierung nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren überprüft. Als Ergebnis erhielt man fünf Clone von Zelllinien, die keine Thymidin-kinase enthalten. Diese Zelllinien sind als Elternzellen für die Hybridomherstellung geeignet und sie konnten aus menschlichen Lungenkrebszellen erhalten werden.

Die fünf erhaltenen Clone wurden einzeln bezeichnet, und zwar beginnend mit SUN N-33-1 mit aufsteigender letzter Ziffer bis einschliesslich SUN N-33-5.

Die Zelllinien von Elternzellen, die nach den Verfahren der Beispiele 1 bis 7 erhalten wurden, können mit B-Zellen fusioniert werden, beispielsweise mit Milzzellen, wobei sich Hybridome bilden, welche in einem Zuchtmedium Immunglobuline bilden.

Diese Zellverschmelzung oder Fusionierung wird in dem folgenden Beispiel beschrieben.

Beispiel 8

Herstellung von Hybridomen durch Fusionierung der ME 1 Zellen des Beispiels 1 mit Milzzellen der Maus, die mit menschlichen Lungenkarzinomzellen A-549 immunisiert worden waren und Feststellung, dass aus diesen Hybridomen monoklonaler Antikörper abgeschieden wird

Aus Elternzellen wurde eine Kultur von 10^7 Zellen von SUN N-21-2 verwendet und diese wurden mit 5×10^7 Milzzellen, die als Partnerzellen dienten, fusioniert. Die Milzzellen stammten von einer vier Wochen alten weiblichen BALB/c Maus, die einmal pro Woche mit menschlichem Lungenkarzinom A-549 vier Wochen lang beimpft worden war, und zwar mit einer Dosis von 10^7 Zellen pro Einimpfung. Als Verschmelzungsmittel oder Fusionsmediator wurde Polyäthylenglycol der Bezeichnung PEG 1000 der Firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd. verwendet, und zwar in einer Konzentration von 40%.

Das Fusionsverfahren oder Verschmelzungsverfahren wurde wie folgt durchgeführt:

Die Elternzellen und die Partnerzellen wurden miteinander vermischt und in einem Zentrifugierröhrchen zentrifugiert und das darüberstehende Material wurde verworfen. Etwa 0,5 ml an PEG 1000 wurden unter Verwendung von RPMI 1640-Medium verdünnt, bis eine Konzentration an dem Polyäthylenglycol von 40% erreicht war und diese verdünnte Lösung wurde zu den fest zusammengepackten Zellen zugesetzt. Man liess die Mischung etwa drei Minuten lang stehen und zentrifugierte anschliessend drei Minuten lang bei 500 Umdrehungen pro Minute.

Anschliessend wurden etwa 5 ml eines Mediums langsam zugegeben, und die Mischung wurde zentrifugiert und das darüber stehende Material verworfen. Alle Zellen wurden langsam in einen T-75 Kolben (Falcon No. 3024) übergeführt und es wurden weitere Mengen an Medium zugesetzt, bis ein Gesamtvolumen von etwa 40 ml erreicht war. Anschliessend erfolgte eine Züchtung über Nacht, und dann wurde die Kultur einschliesslich aller Zellen in ein Zentrifugierröhrchen übergeführt und nach dem Zentrifugieren wurde das darüber stehende Material verworfen.

40 ml an einem HAT-Medium wurden zu den zusammengepackten Zellen zugegeben und man rührte kräftig. Die Mischung wurde in 96 Vertiefungen, die sich in einer Mikroplatte befanden, eingebracht, und zwar in einer Menge von etwa 100 µl pro Vertiefung. Das gleiche Arbeitsverfahren wurde wiederholt, um die Vertiefungen von 4 Mikroplatten mit einer Mischung der Zellen in dem Hat-Medium zu füllen. Anschliessend erfolgte eine eine Woche dauernde Bebrütung der Mikroplatten, und es zeigte sich, dass sich in etwa 10% der Vertiefungen Kolonien gebildet hatten.

Die Kolonien hatten die Neigung, sich flacher auszubreiten als die Kolonien der Elternzellen. Beginnend mit der ersten Woche der Bebrütung, wurde ein Tropfen, also eine Menge von etwa 25–30 µl an HT-Medium, jeder Vertiefung zugesetzt.

Das HT-Medium besitzt die gleiche Zusammensetzung wie das HAT-Medium, mit Ausnahme dessen, dass in dem HT-Medium das Aminopterin fehlt, welches bekanntlich eine Komponente des HAT-Mediums darstellt.

Wenn ein vernünftiges Wachstum der Hybridome stattgefunden hatte, was etwa 10–14 Tage später der Fall war, wurde die darüber stehende Flüssigkeit der Kultur auf das Auftreten von monoklonalem Antikörper gegen das menschliche Lungenkarzinom A-549 überprüft. Zu dieser Überprüfung verwendete man die Protein A-Bindungs-SRBC-Methode. Es zeigte sich, dass vier der 45 gebildeten Clone den monoklonalen Antikörper gegen A-549 produzierten.

Einer der vier Clone wurde nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren einem Subcloning unterworfen. Es wuchsen dabei vier Subclone und alle diese vier Subclone produzierten den monoklonalen Antikörper gegen A-549.

Diese Hybridomzellen konnten nach bekannten Arbeitsverfahren gelagert werden, beispielsweise indem man sie in einem Medium suspendierte, das aus 10% fötalem Kälberserum, 10% Dimethylsulfoxid und 80% gewöhnlichem Medium zusammengesetzt war. Die Lagerung der Zellsuspension erfolgte in flüssigem Stickstoff oder in einem Tiefkühlschrank bei einer Temperatur von etwa – 80°C.

Experiment 1

Bestimmung der Klassen und Unterklassen der Immunglobuline, die von den gemäss Beispiel hergestellten Hybridomen gebildet wurden, nach dem Verfahren von Ouchterlony

5 ml einer 15%-igen Lösung von Agarose mit einem Gehalt von 0,01% an NaN_3 wurden in vier Petri-schalen mit einem Innendurchmesser von 52 mm gegeben und man liess die Lösung etwa 30 Minuten lang stehen, bis sich die Agarose verfestigt hatte. Vertiefungen wurden in das Agarosegel in jede der Schalen eingedrückt, und zwar so, wie dies in Fig. 1 veranschaulicht ist. Die sechs in der Tabelle 1 angeführten Antikörper wurden jeder in eine der sechs am Rande befindlichen Vertiefungen eingefüllt, und zwar in einer Menge von 5 μl . In die Vertiefung, die sich im Zentrum des Agarosegels befand, wurden 15 μl jedes der zehnfachen Konzentrates des gezüchteten Mediums eingebracht, das vier monoclonale Antikörper LAC 1, 2, 3 und 4 enthielt, die durch das Hybridom gebildet wurden, das in Beispiel 8 erzeugt wurde.

Man liess die Gele 24 Stunden lang stehen und die Klasse jedes monoclonalen Antikörpers wurde durch die Bildung einer Linie an Niederschlag bestimmt.

Tabelle 1

Nr.	Antikörper	Ursprung
1	Anti-Human IgM (Höchst AG)	Kaninchen
2	Anti-Human IgG (Höchst AG)	Kaninchen
3	Anti-Maus IgG (Capel Co.)	Kaninchen
4	Anti-Maus IgM (Höchst AG)	Schaf
5	Anti-Human Ig(G+A+M) (Höchst AG)	Schaf
6	Anti-Human IgA (Höchst AG)	Kaninchen

Es stellte sich heraus, dass die vier monoclonalen Antikörper, die getestet wurden, Maus IgG waren, weil alle Niederschlagslinien zwischen der Vertiefung (3) und der zentralen Vertiefung (7) gebildet wurden.

Die Unterklasse des IgG wurde nach dem gleichen Arbeitsverfahren bestimmt.

Wie dies in Fig. 2 dargestellt ist, wurden insgesamt fünf Vertiefungen in das Agarosegel in jede von vier Petri-schalen eingedrückt. Die vier am Rande der Petri-schale befindlichen Vertiefungen wurden mit jeweils 5 μl jedes der Antikörper derjenigen Unterklassen gefüllt, die in Tabelle 2 angeführt sind. Die im Zentrum liegende Vertiefung (5) wurde in den jeweiligen Petri-schalen mit Agarosegel jeweils mit 15 μl an einem der vier monoclonalen Antikörper LAC 1–4 gefüllt. Man liess die Petri-schalen 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen.

Tabelle 2

Nr.	Antikörper	Ursprung
1	Anti-Maus IgG1 (Miles Labs., Inc.)	Kaninchen
2	Anti-Maus IgG2a (Miles Labs., Inc.)	Kaninchen
3	Anti-Maus IgG2b (Miles Labs., Inc.)	Kaninchen
4	Anti-Maus IgG3 (Miles Labs., Inc.)	Kaninchen

Es zeigte sich, dass die vier getesteten monoclonalen Antikörper IgG2a waren, weil ihre Ausfällungslinien zwischen den Vertiefungen 2 und 5 gebildet wurden.

Die Menge an monoclonalen Antikörpern, die mit Hilfe des Hybridomes, das gemäss Beispiel 8 hergestellt wurde, gebildet wurde, betrug etwa 30 $\mu\text{g/ml}$. Dies war nahezu die gleiche Menge, wie diejenige Menge an monoclonalen Antikörpern, die mit Hilfe von Hybridomen erzeugt wurde, die unter Verwendung von Myelomzellen der Maus als Elternzellen hergestellt wurden.

Die Einheitlichkeit der Antikörper, die mit Hilfe der Hybridome gemäss Beispiel 8 erzeugt wurden, wurde durch eine Gel-Electrophorese bewiesen.

Die oben angeführten Ergebnisse zeigen, dass bevorzugte erfindungsgemässe Zelllinien, die menschliche Zellen sind, wie zum Beispiel die Zelllinie SUN N-21-1 oder ME 1 Reihen, als Elternzellen mit B-Zellen fusioniert werden können und dass diese Produkte Immunglobuline bilden, welche die genetische Information ausdrücken, die von den B-Zellen stammt.

Es wurde früher versucht, menschliche Myelomzellen als Elternzellen für die Hybridomherstellung einzusetzen. Diese Zellen haben jedoch verschiedene Nachteile, wie zum Beispiel Schwierigkeiten bei ihrer

Züchtung, geringe Wachstumsgeschwindigkeit und Unbeständigkeit. Wie jedoch unten gezeigt wird, haben die erfindungsgemässen Zelllinien solche Wachstumseigenschaften, wie sie für Krebszellen typisch sind.

Experiment 2

Wachstumseigenschaften von Krebszellen und erfindungsgemässen Zellen der ME 1 Zelllinie

Es wurden 10 ml eines Kulturmediums verwendet, das 2×10^5 menschliche Melanomzellen (Colo 38) pro ml enthielt. Man bebrütete in einem RPMI 1640-Medium, das zusätzlich 10% an fötalem Kälberserum enthielt.

10 ml einer Kultur, die 2×10^5 Zellen pro ml enthielt, und zwar die Zellen SUN N-21-1 der ME 1 Reihen, die sich aus den Zellen Colo 38 ableiteten, wurde ebenfalls in einem RPMI 1640-Medium, das zusätzlich 10% fötales Kälberserum enthielt, bebrütet.

10 ml einer weiteren Kultur, die eine gleiche Anzahl an Zellen pro ml enthielt, wie die beiden oben genannten Kulturen, und zwar wiederum SUN N-21-1 wurde ebenfalls in einem RPMI 1640-Medium, das zusätzlich 10% an fötalem Kälberserum enthielt, bebrütet, jedoch enthielt in diesem Fall das Medium ausserdem 8-Azaguanin in einer Endkonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$.

Es wurden Proben genommen, und die Anzahl der lebenden Zellen in jeder dieser drei Kulturen wurde gezählt. Die Ergebnisse, die dabei erhalten wurden, sind graphisch in Fig. 3 dargestellt.

Man sieht aus dieser Fig. 3, dass die Wachstumseigenschaften, also das Wachstumsprofil der SUN N-21-1 Zellen ähnlich ist, wie dasjenige von menschlichen Melanomzellen Colo 38, und man sieht ferner, dass die Wachstumseigenschaften sich sogar dann nur wenig verändern, wenn man in Gegenwart von 8-Azaguanin züchtet.

Die vier Clone der Hybridome, die gemäss Beispiel 8 hergestellt wurden, hatten ebenfalls Wachstumseigenschaften, die ähnlich denjenigen der SUN N-21-1 Zellen waren. Diese Ergebnisse sind jedoch in Fig. 3 nicht dargestellt.

Patentansprüche

1. Zelllinie für die Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelllinie Tumorzellen enthält, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind, wobei die Zellen dieser Zelllinie zur Fusionierung mit tierischen Zellen, die in der Lage sind, Antikörper zu bilden, geeignet sind, wobei diese Fusionierung eine Hybridom-Zelllinie ergibt, die Antikörper produziert.

2. Zelllinie nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorzellen menschliche Tumorzellen sind.

3. Zelllinie nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die menschlichen Tumorzellen menschliche Melanomzellen, Hepatomzellen oder Zellen von Lungenkrebs sind.

4. Zelllinie nach einem der Patentansprüche 1–3, dadurch gekennzeichnet, dass die menschlichen Melanomzellen diejenigen von Colo 38 oder M 21 sind.

5. Zelllinie nach einem der Patentansprüche 1–4, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorzellen solche sind, die einen Mangel an Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase aufweisen.

6. Zelllinie nach einem der Patentansprüche 1–3 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorzellen solche sind, die aus menschlichem Melanom Colo 38, menschlichem Melanom M 21 oder menschlichem Hepatom HC C-4 stammen, und dass sie einen Mangel an Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase aufweisen.

7. Zelllinie nach einem der Patentansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorzellen solche sind, die einen Mangel an Thymidin-kinase aufweisen.

8. Zelllinie nach einem der Patentansprüche 1–3 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorzellen solche sind, die aus menschlichem Hepatom HC C-4 oder menschlichem Lungen-carcinom A-549 stammen, und dass sie einen Mangel an Thymidin-kinase aufweisen.

9. Verfahren zur Herstellung einer menschlichen Zelllinie nach Patentanspruch 1, zur Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen, dadurch gekennzeichnet, dass man menschliche Tumorzellen, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind, wobei die Zellen zur Fusionierung mit tierischen Zellen, die in der Lage sind, Antikörper zu bilden, geeignet sind, in einem Medium züchtet, welches 8-Azaguanin oder Bromdesoxy-uridin enthält, die gegenüber 8-Azaguanin resistenten Zellen oder die gegenüber Bromdesoxy-uridin resistenten Zellen durch Cloning abtrennt und aus den resistenten Clonen diejenigen auswählt, die nicht in der Lage sind, in einem HAT-Medium zu überleben.

10. Verfahren zur Herstellung einer menschlichen Zelllinie nach Patentanspruch 1 zur Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen, dadurch gekennzeichnet, dass man menschliche Tumorzellen, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind, wobei die Zellen zur Fusionierung mit tierischen Zellen, die in der Lage sind, Antikörper zu bilden, geeignet sind, mit Ultraviolettlicht bestrahlt oder mit einer chemischen Substanz, die eine Mutation hervorruft, behandelt, diese Zellen in einem Medium züchtet, welches 8-Azaguanin oder Bromdesoxy-uridin enthält, die gegen 8-Azaguanin resistenten oder die gegen Bromdesoxy-uridin resistenten Zellen durch Cloning abtrennt und von diesen resistenten Clonen diejenigen auswählt, die nicht in der Lage sind, in einem HAT-Medium zu überleben.

11. Antikörper produzierende Hybridoma, welche Hybridzellen aus menschlichen oder tierischen B-Zellen, die mit einem Antigen immunisiert sind, und Zellen einer Zelllinie für die Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen enthalten, wobei die Zelllinie Tumorzellen enthält, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind.

12. Hybridom nach Patentanspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen der Zelllinie einen Mangel an Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase aufweisen.

13. Hybridom nach Patentanspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen der Zelllinie einen Mangel an Thymidin-kinase aufweisen.

14. Hybridom nach einem der Patentansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen der Zelllinie menschliche Tumorzellen sind, vorzugsweise menschliche Melanomzellen, Hepatomzellen oder Lungenkrebszellen.

15. Hybridom nach einem der Patentansprüche 11 oder 12 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorzellen der Zelllinie menschliches Melanom Colo 38, menschliches Melanom M 21 oder menschliches Hepatom HC C-4 sind, und dass sie einen Mangel an Hypoxanthin-guanin-phosphoriboxyl-transferase aufweisen.

16. Hybridom nach einem der Patentansprüche 11 oder 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorzellen der Zelllinie menschliches Hepatom HC C-4 oder menschliches Lungen-carcinom A-549 sind, und dass sie einen Mangel an Thymidin-kinase aufweisen.

17. Hybridom nach einem der Patentansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass es in der Lage ist, menschliche Antikörper zu produzieren und dass es Hybridzellen aus menschlichen B-Zellen, die mit einem Antigen immunisiert sind, und Zellen einer Zelllinie für die Herstellung von Antikörper bildenden Hybridomen enthält, wobei die Zelllinie menschliche Tumorzellen enthält, die keine aus Knochenmark stammenden Zellen sind.

18. Verfahren zur Herstellung eines Antikörper produzierenden Hybridomes gemäss Patentanspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man menschliche oder tierische B-Zellen, die mit einem Antigen immunisiert sind, mit Zellen einer Zelllinie gemäss Patentanspruch 1 fusioniert.

19. Verwendung der Antikörper produzierenden Hybridome gemäss Patentanspruch 11, zur Herstellung von Antikörpern.

20. Verwendung gemäss Patentanspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Hybridom gemäss Patentanspruch 17 zur Herstellung von menschlichen Antikörpern verwendet.

21. Verwendung gemäss Patentanspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass man monoclonale Antikörper herstellt.

Fig. 1

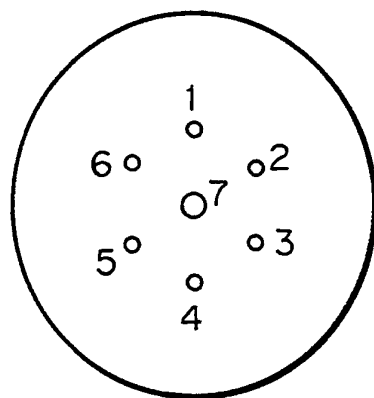


Fig. 2

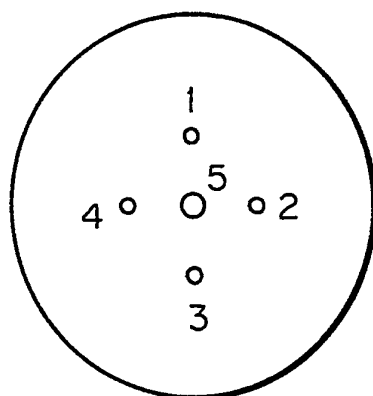


Fig. 3