(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 773785 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 773785

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07G

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **14.12.1977**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **14.12.1977**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **17.06.1978**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

16.12.1976 GB 7652675

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **The International Institute of Different,** Valley House, Hirtzel Street Guernsey, Channel Islands, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Viza, Dimitri,** France, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Soluviljelmä ja menetelmä solujen viljelemiseksi
Cellkultur och förfarande för odling av celler

THE INTERNATIONAL INSTITUTE OF DIFFERENTIATION LIMITED, Valley House, Hirzel Street, St. Peter Port, Guernsey, Channel Islands, Yhdistynyt kuningaskunta

ei mukana

Lääketieteellinen mikrobiologia v. 1975
ei Suomessa

Soluviljemäsysteemi ja menetelmä näiden solujen viljelemiseksi - Cellkultursystem och förfarande för odling av dessa celler

Tämä keksintö kohdistuu solulinjoihin joita voidaan käyttää immunologisten aineiden valmistukseen.

Jatkuvasti edelleenviljeltävien solulinjojen kehittäminen on ollut tutkimusalue, joka on ollut huomattavan aktiviteetin alaisena viime vuosina. Tällaiset pysyvät solulinjat antavat huomattavia etuja primääriviljelmiin nähden useilla mikrobiologian alueilla. Ne ovat esim. erittäin käyttökelpoisia virologisteille sekä kokeellisessa työskentelyssä että viljeltäessä viruksia rokotteiden valmistamiseksi. Esimerkiksi brittiläisessä patenttijulkaisussa 1 051 262 on selostettu yleismerkinnällä BHK 21 varustettu solulinja, joka on kehitetty tällaisten virusviljemien yhteydessä.

Viimeisen vuosikymmenen aikana usean laboratorion ponnistukset ovat suuntautuneet sellaisen solulinjan aikaansaamiseen, joka on peräisin ihmisen perifeerisen verenkierron valkosoluista. Erilaiset tutkimusryhmät ovat todenneet useita tällaisia solulinjoja, mukaanluettuna varhaisimusoluista (muovautuvista valkosoluista) peräisin olevia solulinjoja. Katso esim. Nilsson, K., et al, Int. J. Cancer, Vol. 3, pp. 183-190, 1968, "Development of Immunocytes and Immunoglobulins, Production in Long Term Cultures from Normal and Malignant Human

Lymph Nodes"; ja Moore, G.E. et al, J. of Amer. Med. Assoc., Vol 199, 9, pp. 87-92, 1967, "Culture of Normal Human Leukocytes".

Nyt on kehitetty uusi solulinja, joka voidaan saada lisääntymään ilman että sen luonne olennaisesti muuttuu, joka perustuu 75 vuotta vanhoista, ilmeisesti terveistä miespuolisista vapaaehtoisista saatuihin perifeerisen verenkierron valkosoluihin. Tälle solulinjalle on annettu nimitys LDV/7. On havaittu, että tämän solulinjan solut kykenevät aikaansaamaan spesifistä immunologista ainetta, esim. spesifisiä vasta-aineita ja immuuni RNA:ta. Soluja voidaan kasvattaa elatusviljelmissä, joko staattisissa viljemissä tai sekoitetuissa viljelmissä, mutta niitä voidaan myös viljellä agarissa. Tämä ominaisuus on erityisen käyttökelpoinen koska se tekee mahdolliseksi hyvin vakiintuneiden bakteriologisten menetelmien soveltamisen ihmisen solujen ~~koelasi~~ in vitro kokeisiin tarkkailuun. Kloonaus esim. on mahdollinen ja on myös mahdollista tutkia erilaisten tekijöiden, kuten kolonisaatiota stimuloivan tekijän vaikutusta solujen erilaistumiseen.

Tämän keksinnön tarkoituksena on näin ollen aikaansaada soluviljelmäjärjestelmä, joka käsittää merkinnällä LDV/7 identifioidun solulinjan soluja sen ravintoväliaineessa.

Tämän keksinnön tarkoituksena on myös aikaansaada menetelmä merkinnällä LDV/7 identifioidun solulinjan solujen saattamiseksi lisääntymään viljelemällä soluja niiden ravintoväliaineessa.

Solulinjat todettiin alunperin seuraavalla menetelmällä (prosenttiluvut selityksessä ovat tilavuuden mukaan):

Suurin osa punasoluista erotettiin alkuperäisestä verinäytteestä lisäämällä 20 %:sta Plasmagel ® (koostumus: gelatiinia 30 g, NaCl 7 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2 g litrassa tislattua vettä) ja hylättiin koeputkissa suoritetun laskeutuksen jälkeen. Talteen otetussa suspensiossa oli punasoluja suhteessa valkosoluihin alle 20:1. Siten talteenotetut valkosolut suspendoitiin RPMI 1640 väliaineessa, jossa oli 20 % vasikansikiöseerumia pitoisuudessa 2 x 10^6 valkosolua/ml. RPMI 1640 väliaineella on seuraava koostumus:

Aineosa	Konsentraatio (mg/l)
Aminohapot	
L-arginiini	200
L-asparagiini	50
L-asparagiinihappo	20
L-systiini	50
L-glutaamihappo	20
L-glutamiini	300
glutationi, pelkistetty	1
glysiini	10
L-histidiini	15
L-hydroksiproliini	20
L-isoleusiini	50
L-leusiini	50
L-lysiinihydrokloridi	40
L-metioniini	15
L-fenyylialaniini	15
L-proliini	20
L-seriini	30
L-treoniini	20
L-tryptofaani	5
L-tyrosiini	20
L-valiini	20
Vitamiinit	
Aminobensoehappo	1
biotiini	0,2
kalsiumpantotenaatti	0,25
koliinikloridi	3
syanokobalamiini	0,005
foolihappo	1
i-inositoli	35
nikotiiniamidi	1
pyridoksiinihydrokloridi	1
riboflaviini	0,2
tiamiinihydrokloridi	1

taulukko jatkuu

Suolat	
kaliumkloridi	400
natriumbikarbonaatti	2000
natriumkloridi	6000
kalsiumnitraattitetrahydraatti	100
dinatriumfosfaattiheptahydraatti	1512
magneesiumsulfaattiheptahydraatti	100

Muut aineet	
glukoosi	2000
fenolipunainen	5

Väliaineen pH säädetään 7,2:een 10 paino-%:lla natriumkarbonaattiliuoksella (Methods in Cancer Research, 1970, s. 428). Kaksi kolmasosaa väliaineesta korvattiin tuoreella väliaineella kahdesti viikossa. Koska solukuolemaa esiintyi ensimmäisten viikkojen aikana väkevöitiin viljelmiä tarpeen mukaan soluväkevyyden pitämiseksi yli 10^6 solua/ml.

Soluja viljeltiin Roux-lasipulloissa. Kuusi viikkoa viljelmien käynnistämisen jälkeen esiintyi yhdessä näistä pulloista kasvuominaisuuksia, so. ne suurenivat ja alkoivat lisääntyä ja näitä käytettiin LDV/7-solulinjan alkuun panemiseen.

Tätä solulinjaa on sen jälkeen kasvatettu suuria määriä käyttäen alla selostettua kasvatustekniikkaa:

LDV/7-solulinjaa voidaan ylläpitää lukuisissa elatusväliaineissa. Sitä voidaan viljellä RPMI 1640 väliaineessa, jossa on 5-30 % vasikansikiöseerumia. Elatusväliaineessa on edullisesti RPMI väliainetta, jossa on 10 % vasikansikiöseerumia. Lisäksi voidaan käyttää McCoy'n ja Eagle'n Essential Mediumia solulinjan aliviljelmissä.

Solut kasvavat suspensiossa 37°C:ssa ja muodostavat möykkyjä, jotka voidaan dispergoida sekoittamalla väliainetta hellävaraisesti. Solut käydään läpi vähintään kahdesti viikossa. Tavallinen ymppäysluku on 5×10^5 solua/ml ja solujen annetaan kasvaa staattisessa viljelmässä kunnes saavutetaan pitoisuus, joka on 10^6 solua/ml. Solut kasvavat myös pyörivässä viljelmässä, jossa pyörivä steriili magneettinen sekoitin pitää solut suspensiossa elatusväliaineessa.

Siten voidaan aikaansaada korkeampi pitoisuus, joka on suuruusluokkaa 1,5 x 10^6 solua/ml, ennen solujen aliviljelemistä. Kuolleiden solujen prosentuaalinen määrä on karkeasti ottaen suuruusluokkaa 5 %, mutta vaihtelee elatusolosuhteiden mukaan. Solujen syntyaika on noin 24 tuntia riippuen jälleen elatusolosuhteista.

Yleensä olosuhteet, kuten pH ja lämpötila, joissa solulinja lisääntyy ovat olennaisesti samat kuin ne olosuhteet, jotka valkosolut kohtaavat ihmisolennossa.

Solujen tumatyyppianalyysi osoitti, että LDV/7-solulinja on hypotetraploidinen. Kromosomien lukumäärä vaihtelee 80:stä 93:een. Solujen morfologian tutkiminen valomikroskoopissa osoitti, että solut ovat heterogeenisiä ja että niillä on räjähtäneen näköinen ulkomuoto. Elektronimikroskoopilla suoritetut lisätutkimukset vahvistivat solulinjan heterogeenisyyden, osoittaen pyöreitä eri kokoisia yksitumaisia soluja, joilla oli solulimaeroavuuksia ja karkeat sisälimaverkkokudokset ja makrofagiset ominaisuudet. Nämä näyttävät koostuvan vähintään kahdesta solupopulaatiosta, joista toinen käsittää pieniä halkaisijaltaan alle 15 /um:n suuruisia soluja ja toinen suuria halkaisijaltaan 15-30 /um:n suuruisia soluja. Ilmeisesti suuret solut ovat peräisin pienemmistä.

Kolme kloonia on saatu kromosomiluvun ollessa ensimmäisellä 84 ja toisella ja kolmannella 85, mikä todistaa solun kyvyn aikaansaada identtisiä jälkeläisiä. Kloonautumiskyvyn määritettiin olevan 5 %.

Solujen fagosyyttisiä ominaisuuksia tutkittiin myös elektronimikroskoopilla. Muutamien solujen nähtiin selvästi joutuvan toisten solujen hajottamiksi. Mitään virusosasia ei havaittu saaduissa elektronimikroskooppikuvissa, ei tavanomaisissa elatusolosuhteissa otetuissa näytteissä eikä +40°C:ssa kasvatetuissa viljelmissä. On pantava merkille, että tämä solulinja on hyvin herkkä lisämunuaiskuoren steroidihormonikortisonille pitoisuudessa 10-5 /ug/ml, mikä viittaa varhaisimusolujen ja/tai sauvasolujen läsnäoloon. On myös huomattava, että mitään EB-virusantigeeneja ei ilmennyt immunofluoresenssissä.

LDV/7-solujen kudostyypitys kudossoveltuvuus-HL-A-antigeeneille osoitti seuraavien erityisominaisuuksien olevan läsnä: HLA 2 ja

HLA 32 ensimmäiseen kohtaan ja HLA-spesifisyys W 14 toiseen kohtaan. Havaittiin kuitenkin myös heikkoa reaktiviteettia muiden antiseerumien kanssa muille HLA-erityisominaisuuksille, mutta tätä pidettiin ei-spesifisenä. Suuremmat kudossoveltuvuusgeenit eli HLA-geenit sisältävät koodin polymorfiselle sarjalle kudosantigeenejä, sisältyvät kaikkiin kehon kudoksiin ja ovat erittäin tärkeitä määritettäessä tuleeko kudossiirroksen hyljintää tapahtumaan.

LDV/7-solulinjaa on laajasti tutkittu immunologisten aineiden valmistusta koskevien kokeiden yhteydessä. Havaittiin, että LDV/7-soluja voidaan indusoida nukleiinihapoilla (RNA ja DNA), jotka ovat peräisin spesifisillä antigeeneillä immunisoitujen elinten imurauhaselimistä. Indusoitumisen jälkeen osoittautui, että solut kykenivät kopioimaan niiden indusoimiseen käytettyjä nukleiinihappoja. Havaittiin, että nämä kopioidut nukleiinihapot säilyttivät antigeenisen spesifisyytensä. Lisäksi osoittautui, että spesifistä antigeeniä varten nukleiinihapoilla indusoidut LDV/7-soluista johdetut dialysaatit siirtävät soluimmuniteetin näitä antigeenejä vastaan, kun niitä annetaan ruiskeena in vivo ihmisille.

Käänteiseti osoittautui, että määrätylle antigeenille herkistetyistä ihmis- tai eläinimusoluista, kuten myös indusoiduista LDV/7-soluista saadut soludialysaatit kykenivät indusoimaan ennalta käsittelemättömiä LDV/7-soluja nukleiinihappojen aikaansaamiseksi, jotka kykenivät siirtämään erityisesti näiden antigeenien immuunista reaktiviteettia. Lisäksi havaittiin, että LDV/7-solut näillä "immuuneilla" nukleiinihapoilla ja/tai soludialysaateilla indusoimisen jälkeen synnyttivät näille antigeeneille spesifisiä vasta-aineita (Ig Ce), joita vastaan immuuneja nukleiinihappoja tai immuuneja soludialysaatteja aikaansaavat imusolut oli herkistetty. Vasta-aineet otettiin talteen näiden viljelmien päällä olevasta nesteestä. Nämä päällä olevat nesteet sisälsivät lisäksi ainetta jota voitiin käyttää ennalta käsittelemättömien lymfoidisolujen indusointiin immuunien nukleiinihappojen ja immuunien soludialysaattien valmistamiseksi samaa antigeenispesifiteettiä varten, kuin jolle päällä olevia nesteitä valmistavat solut oli herkistetty. Yllä selostetun immunologisen aineen valmistusta on myös selostettu suomalaisessa patentissa n:o (pat.hak. n:o 77 3784).

LDV/7-soluja on deponoitu nimityksellä LDV/7 laitokseen Laboratoire

d'Immunobiologie, Faculté de Médecine Broussais Hotel-Dieu, 15, rue de l'Ecole de Medecine, Paris 75006, ja nimityksellä I-038 laitokseen National Microorganism Culture Collection of the Institut Pasteur, Paris, joista niitä pyydettäessä on yleisesti saatavana.

Keksintöä havainnollistetaan seuraavassa esimerkissä, jossa varhaisimusolulinjoja LDV/7 indusoidaan Is-RNA:lla. 1 mg Is-RNA:ta liuotettiin 0,5 ml:an RPMI 1640 väliainetta. Tämä liuos tehdään 0,35 molaariseksi sakkaroosiin nähden. 10^7 LDV/7-solua suspendoidaan sen jälkeen tähän liuokseen ja inkuboidaan vähintään 30 min 37°C:ssa jatkuvasti sekoittaen. Inkuboinnin lopussa lisätään tuoretta väliainetta ja lopullinen tilavuus säädetään 20 ml:ksi, jolloin solupitoisuudeksi tulee 5 x 10^5 solua/ml. Koska tämän solulinjan keskimääräinen kaksinkertaistumisaika, kun sitä viljellään staattisissa olosuhteissa, on suuruusluokkaa 24 tuntia, lisätään päivittäin tuoretta väliainetta (RPMI 1640, täydennettynä 10 %:lla vasikansikiöseerumia) yhtä paljon kuin viljelmän tilavuus on sillä hetkellä, kunnes viljelmän kokonaistilavuus nousee 3 litraan, jolloin saadaan noin 2 x 10^9 solua. 10^7 solun alikvoottia tästä viljelmästä indusoidaan toisen kerran samalla Is-RNA:lla samalla menetelmällä. Tämä vastaindusoitu alikvootti käytetään toisen viljelmän ymppäystä varten, jota jälleen täydennetään tuoreella väliaineella ja kasvatetaan, kunnes haluttu lukumäärä soluja saadaan. Toista viljelmää kasvatetaan tavallisesti, niin että saadaan 4 x 10^9 solua. Molemmista viljelmistä peräisin olevat solut yhdistetään ja varastoidaan pakastettuna -20°C:een.

Patenttivaatimukset

1. Soluviljelmäsysteemi koostuen varhaisimusoluista muodostetun solulinjan soluista elatusväliaineessa, t u n n e t t u siitä, että soluilla on seuraavat ominaisuudet:

a) ne ovat hypotetraploideja, joiden kromosomiluku vaihtelee välillä 80-93,

b) ne ovat räjähtäneen näköisiä ja niillä on heterogeeninen solukoko tarkasteltuina elektronimikroskoopilla,

c) ne esiintyvät ainakin kahden solun populaatioina, koostuen joko pienistä soluista, jotka ovat pienempiä kuin 15 µm halkaisijaltaan tai suuremmista soluista, joiden halkaisijat ovat välillä 15-30 µm, elektronimikroskoopilla tarkasteltuina,

d) niillä on 5 % kloonautusmiskyky,

e) ne ovat hyvin herkkiä lisämunuaiskuoren ~~steroidihormoonille~~ kortisonille pitoisuudessa 10^{-5} µg/ml,

f) ne eivät sisällä EB-virusantigeeneja immunofluorsenssillä tutkittuna,

g) ne erittävät (Ig G) vasta-ainetta,

h) niillä on HLA-spesifisyys HLA 2 ja HLA 32 ensimmäiseen kohtaan ja W 14 toiseen kohtaan,

näitä soluja on talletettu nimityksellä LDV/7 laitokseen Laboratoire d'Immunobiologie, Faculté de Médecine Broussais Hotel-Dieu, 15 rue de l'Ecole de Medecine, Paris 75006, ja nimityksellä I-038 laitokseen National Microorganism Culture Collection of the Institut Pasteur, Paris.

2. Menetelmä solujen saattamiseksi lisääntymään viljelmäjärjestelmässä siihen sopivassa elatusväliaineessa, t u n n e t t u siitä, että käytetään vaatimuksessa 1 määritellyn solulinjan soluja.

Hak. n:o 773785

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

773784 ~~(C07G 7/00)~~ (A 61 K 39/395)

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

Suomi - Finland _____

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

CA 81 (1974) 102410 y
82 (1975) 122425 f

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

28.5.80 Eeva Koivisto

Allekirjoitus