

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
8. Januar 2015 (08.01.2015)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2015/000856 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 5/073 (2010.01) *C12N 5/0797* (2010.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/063866
- (22) Internationales Anmeldedatum:
30. Juni 2014 (30.06.2014)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2013 106 844.8 1. Juli 2013 (01.07.2013) DE
- (71) Anmelder: CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN
BERLIN [DE/DE]; Charitéplatz 1, 10117 Berlin (DE).
- (72) Erfinder: CICHON, Günter; Hortensienstr. 38, 12203
Berlin (DE). STANKE, Jonas; Zinzendorfstr. 17, 10555
Berlin (DE).
- (74) Anwalt: BUCHANAN, Luke; HERTIN und Partner,
Kurfürstendamm 54/55, 10707 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: IMMORTALIZED HUMAN CHORION CELL LINE AND METHOD FOR IMMORTALIZING HUMAN CHORION CELLS

(54) Bezeichnung : IMMORTALISIERTE HUMANE CHORIONZELLINIE SOWIE VERFAHREN ZUR IMMORTALISIERUNG HUMANER CHORIONZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to an immortalized chorion cell line and a method for producing immortal cell lines from human embryonic chorion tissue, and to the use of the cell line for producing recombinant protein and/or medicinal agents.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine immortalisierte Chorionzelllinie und ein Verfahren zur Herstellung immortaler Zelllinien aus humanem embryonalem Choriongewebe, sowie die Verwendung der Zelllinie zur Herstellung von rekombinantem Protein und/oder medizinischer Wirkstoffe.



WO 2015/000856 A1

IMMORTALISIERTE HUMANE CHORIONZELLINIE SOWIE VERFAHREN ZUR IMMORTALISIERUNG HUMANER CHORIONZELLEN

BESCHREIBUNG

- 5 Die Erfindung betrifft eine immortalisierte Chorionzelllinie und ein Verfahren zur Herstellung immortaler Zelllinien aus humanem embryonalem Choriongewebe, sowie die Verwendung der Zelllinie zur Herstellung von rekombinantem Protein und/oder medizinischer Wirkstoffe.

HINTERGRUND ZUR ERFINDUNG

- 10 Die Herstellung immortaler Zelllinien aus differenziertem (adulten) Gewebe oder Zellen humanen Ursprungs ist ein schwieriges und nur in Ausnahmefällen erfolgreiches Verfahren, da humane Zellen durch eine große Zahl von natürlichen Tumorsuppressorgenen vor unkontrollierter Teilung geschützt sind. Die meisten humanen Zellen, die heute in der medizinischen Forschung zu unterschiedlichsten Fragestellungen Verwendung finden, sind daher aus der Kultivierung bösartiger Tumore hervorgegangen. Die Entstehung eines
15 bösartigen Tumors ist ein Vorgang, der sich normalerweise über 2-3 Jahrzehnte erstreckt und durch Mutation oder Fehlregulation den Funktionsverlust mehrerer Tumorsuppressorgene zur Voraussetzung hat.

- Zur Produktion rekombinanter Proteine oder Impfstoffe, die einer medizinischen Verwendung zugeführt werden sollen, werden nur in Ausnahmefällen Tumorzellen herangezogen, da diese
20 durch die Anwesenheit teilweise auch undefinierter Onkogene oder viraler Erreger belastet sind. Aus diesem Grund werden zur Produktion rekombinanter Proteine eher Zelllinien tierischen Ursprungs (z.B. COS-Zellen) verwendet. Die Nutzung tierischer Zelllinien ist allerdings durch unerwünschte Kontaminationen des Produktes mit tierischen Eiweißen belastet, so dass Zelllinien, die humanen Ursprungs sind, aber keinen malignen Hintergrund
25 haben, besonderen Wert zur Produktion medizinischer Wirkstoffe haben.

- Ausgedehnte Transfektionsstudien in den 1970iger und 80iger Jahren haben deutlich gemacht, dass die Immortalisierung humaner embryonaler Zellen leichter gelingt, als die von aus adultem Gewebe stammenden Zellen, da embryonale Zellen natürlicherweise noch ein höheres Wachstumspotential und einen niedrigeren Differenzierungsgrad in sich tragen und
30 noch nicht so stark durch epigenetische Regulation in ihrem Proliferationsverhalten eingeschränkt sind. So wurden häufig primäre humane embryonale Nierenzellkulturen als Zielzellen zur Bestimmung des transformierenden Potentials viraler Gene herangezogen. Auf diese Weise ist auch die weltweit verbreitete HEK (human embryonic kidney) 293 Zelllinie entstanden (Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line

transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol. 1977 Jul;36(1):59-74.), die initial durch Transfektion des kompletten Genoms eines Adenovirus Serotyp 5 hergestellt worden ist.

5 Das Embryonenschutzgesetz (ESchG) ist ein deutsches Gesetz zur Regelung der In-vitro-Fertilisation und trifft eine Abwägung zwischen moralisch-ethisch vertretbaren Handlungen an Embryonen, sowie im weitesten Sinne Erbinformationen enthaltenen Zellen humanen Ursprungs, sowie der Freiheit von Wissenschaft und Forschung. Gegenwärtig schützt das ESchG die Nutzung pluripotenter Stammzellen bis zum 8-Zellstadium, betrifft jedoch nicht die Verwendung von embryonalem Gewebe, welches z.B. im Rahmen eines
10 Schwangerschaftsabbruches zugänglich wird.

Gleichwohl ist die wissenschaftliche oder kommerzielle Nutzung von Embryonen, die im Rahmen eines Schwangerschaftsabbruches zugänglich werden, wenn auch nicht verboten, so doch ethisch-moralisch nicht unkritisch.

15 Im Unterschied dazu erscheinen die Nutzung und der Rückgriff auf embryonale Zellen, die natürlicherweise im Rahmen der humangenetischen Diagnostik anfallen und die nach Abschluss der Untersuchungen üblicherweise verworfen werden, ethisch vertretbar.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zu Grunde, dass embryonale Zellen als Ausgangspunkt für die Herstellung von Zelllinien viele Vorteile aufweisen.

20 So beschreibt beispielsweise die EP 1 161 548 B2 die Herstellung von rekombinanten Proteinen in menschlichen Zellen durch Verwendung von Adenovirus E1 Protein kodierenden Sequenzen. Dabei offenbart die EP 1 161 548 B2 insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von wenigstens einem rekombinanten Protein in einer Zelle, umfassend das Bereitstellen einer Zelle, die in ihrem Genom Sequenzen umfasst, die E1A und E1B eines Adenovirus kodieren, wobei die Zelle in ihrem Genom keine Sequenz umfasst, die ein strukturelles
25 adenovirales Protein codiert, und wobei die Zelle von einem humanen embryonalen Retinoblasten stammt.

Retinoblasten sind die Vorläuferzellen der Netzhaut. Ihre Gewinnung ist problematisch, weil es unumgänglich ist hierzu direkt auf vitale Zellen zuzugreifen, die ausschließlich im Rahmen eines Schwangerschaftsabbruches gewonnen werden können.

Eine immortalisierte Zelllinie wird beispielsweise in WO 2001/036615 A2 offenbart. Die darin offenbarte Zelllinie betrifft eine permanente Amniozyten-Zelllinie, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, die die Expression der Genprodukte der E1-Region von Adenovirus bewirkt. Die Anwendung von Choriongewebe als Ausgangspunkt für die Herstellung einer immortalisierten Zelllinie wird in WO 2001/036615 A2 weder offenbart noch nahegelegt.

Die Etablierung von stabilen Zelllinien aus Choriongewebe unter Nutzung starker Onkogene wie z.B. des SV40 T-Antigen oder der Papillomavirusonkogene E6 und E7 ist in der Vergangenheit mehrfach gelungen (Lei et. al. (1992b), Graham et al. (1993), Shih et al. (1998), Choy and Manyonda (1998), Khoo et al (1998)). Eine Immortalisierung von Choriongewebe unter Nutzung adenoviraler Gene ist bislang im Stand der Technik weder offenbart noch nahegelegt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Die Erfindung hat daher das Ziel ein anderes Ausgangsmaterial zu verwenden, welches unproblematisch zu gewinnen und darüber hinaus vorteilhaft für die weitere Verwendung ist. Erfindungsgemäß wird bevorzugt als Ausgangsmaterial der embryonale Anteil der Plazenta (das embryonale Chorion) verwendet.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Mittel und entsprechende Verfahren bereitzustellen, durch welche Substanzen synthetisiert werden können, die letztlich als Medikamente dienen können.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale des Anspruchs 1. Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen beschrieben.

Die Erfindung betrifft daher eine immortalisierte humane Chorionzelllinie.

Der embryonale Anteil der Plazenta besteht aus der Chorionplatte, der eine dünne Eihaut (das Amnion) aufliegt. Der mütterliche Anteil der Plazenta ist die sog. Dezidua. Die Chorionplatte stellt den Hauptgewebeanteil der embryonalen Plazenta und trägt die Hauptlast des Stoffwechsels zwischen mütterlichem und embryonalem Kreislauf.

Chorionzellen synthetisieren natürlicherweise eine große Zahl von endokrinen Faktoren und Proteinen, was sie in besonderer Weise zur Nutzung als Produktionszelllinie zur Expression rekombinanter humaner Proteine und Impfstoffe geeignet macht (M.H.F. Sullivan, Endocrine cell lines from the placenta, Molecular and Cellular Endocrinology 228 (2004) 103-119, Mitchell et al. Progesterone synthesis by human amnion, chorion and decidua at term. Am. J. Obstet. Gynecol. 1987 157(2):349-53).

Bisher ist im Stand der Technik die Immortalisierung einer Zelllinie auf Basis eines Choriongewebes nicht beschrieben. Eine Immortalisierung von Choriongewebe unter Nutzung adenoviraler Gene hat den Vorteil, dass die genutzten Onkogene (Adenovirus E1-Gene) im Kontext menschlicher Zellen nur ein vergleichsweise niedriges Transformationspotential besitzen. Bei Menschen sind keine bösartigen Tumore bekannt, die durch Adenovirus E1-Gene ausgelöst werden, so dass die Herstellung von Medizinprodukten (rekombinante Proteine, Impfstoffe, Wachstumsfaktoren, Hormone, u.ä.) auf durch Adenovirus E1-Gene immortalisierten Zelllinien sicherheitsbiologisch unkritischer erscheint.

Die Erfindung betrifft ebenfalls eine immortalisierte humane Chorionzelle, die ursprünglich aus dem embryonalen Anteil der Plazenta (dem embryonalen Chorion) gewonnen wurde. Die Begriffe „Zelllinie“ und „Zelle“ sind beide für eine Beschreibung der vorliegenden Erfindung anzuwenden. Zelllinien sind Zellen einer Gewebeart, die sich im Laufe der Zellkultur fortpflanzen können. Es sind sowohl immortalisierte (unsterbliche) Zelllinien als auch primäre Zellen kultiviert (Primärkultur) im Stand der Technik bekannt. Als Primärkultur bezeichnet man eine nicht-immortalisierte Zellkultur, die direkt aus einem Gewebe gewonnen wurde. Die Erfindung betrifft daher immortalisierte (unsterbliche) Zelllinien und Zellen, die aus Choriongewebe bzw. Chorionzellen generiert werden.

Unter Immortalisierung versteht man die Aufhebung der Begrenzung der Anzahl von Zellteilungen. Immortalisierte Zellen können sich im Gegensatz zu gewöhnlichen Zellen beliebig häufig teilen und lassen sich in Zellkultur im Wesentlichen unbegrenzt vermehren. Unter einer "permanenten" oder „immortalisierten“ Zelllinie versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung, dass die entsprechenden Zellen in irgendeiner Weise derart genetisch verändert sind, dass sie im Wesentlichen permanent in Zellkultur weiterwachsen können.

Die immortalisierte Zelllinie der vorliegenden Erfindung ermöglicht die Herstellung von rekombinanten Proteinen, rekombinanten Adenoviren oder weitere medizinische Wirkstoffen in einer Zelllinie ohne Risiko von unerwünschten Kontaminationen des rekombinanten Produktes mit sicherheitsrelevanten Onkogenen. Außerdem sind die immortalisierten humanen Chorionzelllinien der vorliegenden Erfindung durch ihre biologischen Eigenschaften für die Herstellung von rekombinanten Wirkstoffen sehr gut geeignet.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die immortalisierte humane Chorionzelllinie dadurch gekennzeichnet, dass die Zelllinie (bzw. die einzelnen Zellen der Zelllinie) Nukleinsäuresequenzen (oder mindestens einen Nukleinsäure) umfasst, die ein oder mehrere E1-Gene eines Adenovirus kodieren und bevorzugt die Expression der E1-Genprodukte bewirken. Bei den E1-Genen sind bevorzugt die E1a-, E1b1- und/oder E1b2-Gene.

Bei der (mindestens einen) Nukleinsäure oder Nukleinsäuresequenzen, die die Expression der E1-Genprodukte von Adenovirus bewirkt, kann es sich um jede geeignete Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuren handeln, die zu einer stabilen Expression dieser Genprodukte führen. Die Nukleinsäuresequenzen sind bevorzugt exogene Nukleinsäuresequenzen. Unter exogene

5 Nukleinsäuresequenzen sind sämtliche Sequenzen zu verstehen, die als Transgen oder andere neu in der Zelle (nach Isolierung der Zelle) eingeführte Nukleinsäure verwendet wurden. Um die gewünschte Immortalisierung der Zellen über längere Zeiträume beizubehalten, sollten die exogenen Nukleinsäuresequenzen bevorzugt in das Genom integriert sein.

10 Die E1-Sequenzen können über PCR-Amplifikation aus dem Genom von aus Wildtypadenoviren isolierter DNA entnommen werden. Die genaue Lage der adenoviralen E1-Gene ist über online-Gendatenbanken zugänglich (z.B. NCBI; beispielsweise human Adenovirus Typ 5 komplettes Genom: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AC_000008.1).

Im Beispielteil der vorliegenden Anmeldung wurden E1-Gene der humanen Adenovirusserotyp

15 5 zur Immortalisierung gewählt. Grundsätzlich ist eine Immortalisierung aber auch mit E1-Genen anderer Adenoviren der 57 bislang bekannten verschiedenen Adenovirusserotypen möglich.

Folgende Genabschnitte wurden für die Klonierung des bevorzugten Immortalisierungsplasmides verwendet: Ad5 Basenposition 437 – 3366:

20 **Bevorzugte Nukleotidsequenz der adenoviralen E1-Gene (SEQ ID NO. 1):**

ttttattattatagtcagctgacgtgtagtgtatattatacccggtgagttcctcaagaggccactcttgagtgcagcgagtagaggtttctcctccgagccgctccgacaccgggactgaaaatgagacatattatctgccacggaggtgttattaccgaagaaatggccgccagtccttttgaccagctgatcgaagaggtactggctgataatcttccacctcctagccattttgaaccacctacccttcacgaactgtatgatttagacgtgacggccccgaagatcccaacgaggaggcggtttcgcagattttcccgactctgtaatgttggcggtgcaggaagggattgacttactcacttttccgcccggcgccccggttctccggagccgctcacctttcccggcagcccagcagccggagcagagagccttggtccggtttctatgccaaaccttgtagcggaggtgatcgatcttacctgccacgaggctggctttccacccagtgacgacgaggatgaagaggggtgaggagtttggttagattatgtggagcaccgccggcacgggttcaggtcttgtcattatcacccggaggaatacgggggaccagatattatgtgttcgctttgctatatgaggacctgtggcatgtttgtctacagtaagtgaataattatgggcagtggtgatagagtgggtgggtttgggtgtggtaat

25 ttttttttaatttttacagttttgtggtttaagaattttgtattgtgatttttttaaaaggtcctgtgtctgaacctgagcctgagccccgagccagaaccggagcctgcaagacctaccgccgtcctaaaatggcgccctgctatcctgagacgccccgacatcacctgtgtctagagaatgcaatagtagtagtgatgactccggtccttctaacacacctcctgagatacacccgggtggtcccgcgtgtgccccattaaaccagttgccgtgagagttgggtggcgctgccaggctgtggaatgtatcgaggacttgcttaacgagcctgggcaacctttggacttgagctgtaaacgccccaggccataaggtgtaaacctgtgattgctgtgtgtggttaacgcctttgtttgctgaatgagttgatgt

30 aagtttaataaagggtgagataatgtttaacttgcatggcggtgttaaatggggcggggcttaaaagggtatataatgcgcggtgggctaattcttggttacatctgacctcatggaggcttgggagtggtttggaagatttttctgctgtgcgtaacttgctggaacagagcttaacagtagcttctgggttttgagggtttctgtggggctcatcccaggcaaggttagtctgcagaattaaggaggattacaagtgggaatttgaaagccttctgtggtgagctg

35 40

tttgattctttgaatctgggtcaccaggcgcttttccaagagaaggtcatcaagacttttgatttttccacac
 cggggcgcgctgcgggtgctgttgcctttttgagttttataaaggataaatggagcgaagaaacccatctgag
 cggggggtacctgctggattttctggccatgcatctgtggagagcggttgtgagacacaagaatcgctgcta
 ctgttgccttccgtccgcccggcgataataccgacggaggagcagcagcagcagcaggaggaagccaggcggc
 5 ggcggcaggagcagagcccatgtgaacccgagagccggcctggacctcggaatgaatgttgtagcagggtggc
 gaactgtatccagaactgagacgcattttgacaattacagaggatgggcaggggctaagggggtaaagaggg
 agcgggggggcttgtgaggctacagaggaggctaggaatctagcttttagcttaatgaccagacaccgtcctga
 gtgtattacttttcaacagatcaaggataattgcgctaattgagcttgatctgctggcgagaagtattccata
 gagcagctgaccacttactggctgcagccaggggatgattttgaggaggctattagggtatatgcaaagggtg
 10 cacttagggccagattgcaagtacaagatcagcaaacttgtaaataatcaggaattgttgctacatttctgggaa
 cggggcccagggtggagatagatacggaggatagggtggccttttagatgtagcatgataaataatgtggccggg
 gtgcttggcatggacgggggtggttattatgaatgtaagggttactggcccaatttttagcggtagcgttttcc
 tggccaataccaaccttatcctacacgggtgtaagcttctatgggttaacaatacctgtgtggaagcctggac
 cgatgtaagggttcggggctgtgccttttactgctgctggaaggggtggtgtgtcgcccaaaagcagggt
 15 tcaattaagaaatgcctctttgaaagggtgtaccttgggtatcctgtctgagggttaactccagggtgcgcaca
 atgtggcctccgactgtggttgcctcatgtagtgaagcggtggctgtgattaagcataacatggtatgtgg
 caactgcgaggacagggcctctcagatgctgacctgctcggacggcaactgtcacctgctgaagaccattcac
 gtagccagccactctcgcaaggcctggccagtgtttgagcataacatactgacctgctgttccttgcatattgg
 gtaacaggaggggggtgttcctaccttaccaatgcaatttgagtcacactaagatattgcttgagccgagag
 20 catgtccaagggtgaacctgaacgggggtgtttgacatgaccatgaagatctggaagggtgctgaggtacgatgag
 accgcaccagggtgcagacctgcgagtggtggcggtaaacataattaggaaccagcctgtgatgctggatgtga
 ccgaggagctgaggccgatcacttggtgctggcctgcacccgcgctgagtttggctctagcgatgaagatac
 agattga

25 Die vorgenannten bevorzugten adenoviralen Gen-Sequenzen codieren für folgende Genprodukte:

Bevorzugten Aminosäuresequenzen der adenoviralen E1-Genprodukte (hAd5):

Ad5 E1a (SEQ ID NO. 2):

30 MRHIICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELYDLDTAPEDPNEEAVSQIFPDSVMLA
 VQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVSMPLVPEVIDLTCEAGFPSPDDEDEEGEEFVLDY
 VEHPGHGCRSCHYHRRNTGDPDIMCSLCYMRTCGMFVYSPVSEPEPEPEPEPEPARPTRRPKMAPAILRRPTS
 PVSRECNSSSTDSCDSGPSNTPEIHPVVLCPKIPVAVRVGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLCKRPRP

Ad5-E1b (19K) (SEQ ID NO. 3):

35 MEAWECELEDFSAVRNLEQSSNSTSWFWRFLWGSSQAKLVCRIKEDYKWEFEELLKSCGELFDSLNLGHQALF
 QEKVIKTLDFSTPGRAAAVAFLSFIKDKWSEETHLSGGYLLDFLAMHLWRAVVRHKNRLLLLSSVRPAI IPT
 EEQQQQQEEARRRRQE QSPWNPRAGLDPRE

Ad5-E1b (55K) (SEQ ID NO. 4):

40 MERRNPSERGVPAGFSGHASVESGCETQESPATVVFRPPGDNTDGAAAAAGGSQAAAAGAEPMEPESRPGPS
 GMNVVQVAELYPELRRILITITEDGQGLKGVKRERGACEATEEARNLAFSLMTRHRPECITFQQIKDNCANELD
 LLAQKYSIEQLTTYWLQPGDDFEEAIRVYAKVALRPDCKYKISKLVNIRNCCYISGNAGAEVIDTEDRVAFR
 SMINMWPGVLGMDGVVIMNVRFTGPNFSGTVFLANTNLIHGVSYFYGNNTCWEAWTDVRVRGCAFYCCWKGV
 VCRPKSRASIKKCLFERCTLGILSEGNRSVRHNVASDCGCFMLVKSVAVIKHNMVCNCDRASQMLTCS DGN

CHLLKTIHVASHSRKAWPVFEHNIILTRCSLHLGNRRGVFLPYQC�LSHTKILLEPESMSKVNŁNGVFDMTMKI
WKVŁRYDETRTRCRPCECGGKHIRNQPVMLDVTEELRPDHLVLACTRAEFGSSDEDTD

- 5 Sie kann/können in das Genom der Zelle integriert, d.h. chromosomal, oder extrachromosomal, z.B. als episomal replizierendes Plasmid oder Mini-Chromosom, vorliegen. Die Expression der verschiedenen Genprodukte kann dabei von ein und demselben Nukleinsäuremolekül oder beispielsweise verschiedenen Nukleinsäuremolekülen bewirkt werden. Als "Expression" wird im Stand der Technik der Prozeß des Herstellens des Produkts
- 10 eines Gens, das entweder ein spezifisches Protein ist, das ein spezifisches Merkmal oder eine spezifische Eigenschaft bewirkt, oder von RNA-Formen verstanden, die nicht in Proteine translatiert werden (z.B. antisense RNAs, tRNAs). Dem Fachmann werden angesichts der vorliegenden Beschreibung, insbesondere auch des vorgeschlagenen Verfahrens, geeignete Möglichkeiten zur Erzielung der gewünschten Expression ersichtlich sein.
- 15 Die Einführung eines adenoviralen E1-Gens, das den Zellzyklus teilweise dereguliert, zeigt eine überraschend gute Transformationsrate, ohne dass Tumorinduzierende Mittel erforderlich sind. Die Verwendung adenoviraler E1-Genen zur Immortalisierung von Chorionzellen stellt eine Möglichkeit der Erzeugung einer Chorionzelllinie durch risikoarme und nicht-tumorinduzierende Agentien dar. Da die auf Basis der adenoviraler E1-Gene hergestellten
- 20 immortalisierten Zelllinien nicht Tumor auslösend sind, sind die in dieser Zelllinie hergestellten rekombinanten Proteine für die medizinische Anwendung im Menschen deutlich sicherer als Proteine, die in einer immortalisierten Krebszelllinie hergestellt wurden.
- Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft immortalisierte humane Chorionzellen, die Nukleinsäuresequenzen umfasst, die zu einer (bevorzugten kontinuierlichen) Expression des
- 25 CAR-Rezeptors führen.
- Der CAR-Rezeptor (Cosackie und Adenovirusrezeptor) verbessert die Infizierbarkeit von Chorionzellen mit rekombinanten Adenoviren, was hinsichtlich der Produktion rekombinanter Proteine und der Produktion adenoviraler Impfstoffe von Vorteil ist.
- Ein besonderer Aspekt der Erfindung betrifft die Art der Verknüpfung der Gene des CAR-
- 30 Rezeptors und der für die Immortalisierung benötigten E1-Gene. Die Verknüpfung dieser beiden Gene erfolgt bevorzugt in einer Weise, die eine dauerhaft stabile Expression des CAR-Rezeptors erlaubt, obwohl der CAR-Rezeptor keinen Beitrag zur Immortalisierung der Chorionzellen leistet.
- Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft immortalisierte humane Chorionzelllinien,
- 35 die Nukleinsäuresequenzen umfasst, die humane Telomerase kodieren und bevorzugt die

Expression der Telomerase bewirken. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Telomerase die Reverse-Transkriptase-Untereinheit des humanen Telomerasekomplexes (hTERT).

Die Sequenzen der humanen Telomerase sind in online-Genbanken hinterlegt (z. B. NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB085628.1>).

Bevorzugte Nukleotidsequenz: humane Telomerase (SEQ ID NO. 5):

atgcgcgcgcgtccctcgtcccgagcctgcgtccctgctgcgcagccactaccgcgaggtgctgccgctgg
ccacgttcgtgcgggcctggggccccagggctggcggtggtgcagcgcggggacccgcggctttccgcgc
gctggtggcccagtgctggtgtgctgcccaggacgcacggccgccccccgcgcgcctccttccgccag
10 gtgtcctgcctgaaggagctggtggcccagtgctgcagaggctgtgcgagcgcggcgcgaagaacgtgctgg
ccttcggcttcgcgctgctggacggggcccgggggccccccgaggccttcaccaccagcgtgcgcagcta
cctgcccacacgggtgaccgacgcactgcgggggagcggggcgtgggggctgctgctgcgccgcgtgggcgac
gacgtgctggttcacctgctggcacgctgcgcgctctttgtgctggtggctcccagctgcgcctaccaggtgt
gcgggccgcgcgtgtaccagctcggcgctgccactcaggcccgcccccgccacacgctaagtggaccccgaag
15 gcgtctgggatgcaaacgggcctggaaccatagcgtcagggaaggccgggggtccccctgggcctgccagccccg
ggtgcgaggaggcgcgggggacgtgccagccgaagtctgccgttgccaaagaggcccaggcgtggcgctgcc
ctgagccggagcggacgcccgttgggcaggggtcctggggccaccgggcaggacgcgtggaccgagtgaccg
tggtttctgtgtggtgtcacctgccagaccgcgaagaagccacctctttggagggtgcgctctctggcacg
cgccactcccacccatccgtgggcccgcagcaccacgcggggccccccatccacatcgcgccaccacgtccct
20 gggacacgccttgtccccgggtgtacgccgagaccaagcacttcctctactcctcaggcgacaaggagcagct
gcggccctccttcctactcagctctctgaggccagcctgactggcgctcggaggctcgtggagaccatcttt
ctgggttccaggccctggatgccagggaactccccgcaggttgccccgcctgcccagcgctactggcaaatgc
ggccccctgtttctggagctgcttgggaaccacgcgcagtgcccctacgggggtgctcctcaagacgcactgcc
25 gctgcgagctgcggtcaccccagcagccggtgtctgtgccggggagaagccccagggtctgtggcgccccc
gaggaggaggacacagacccccgtgcctggtgcagctgctccgccagcacagcagccccctggcaggtgtacg
gcttcgtgcgggcctgctgcgccggctggtgcccccaggcctctggggctccaggcacaacgaacgccgctt
cctcaggaacaccaagaagttcatctccctggggaagcatgccaaagctctcgtgcaggagctgacgtggaag
atgagcgtgcgggactgcgcttggtgcgcaggagcccaggggttggtgtgttccggccgcagagcaccgtc
30 tgcgtgaggagatcctggccaagttcctgcactggctgatgagtgtgtacgtcgtcgagctgctcaggctctt
cttttatgtcacggagaccacgtttcaaaagaacaggctctttttctaccggaagagtgtctggagcaagttg
caaagcattggaatcagacagcacttgaagaggggtgcagctgcgggagctgtcggaagcagaggtcaggcagc
atcgggaagccaggcccgccctgctgacgtccagactccgcttcacccccaaagcctgacgggctgcggccgat
tgtgaacatggactacgtcgtgggagccagaacgttcgcgagagaaaagaggccgagcgtctcacctcgagg
35 gtgaaggcactgttcagcgtgctcaactacgagcggggcgcgcccccggcctcctgggcgcctctgtgctgg
gcctggacgatatccacagggcctggcgcaccttcgtgctgcgtgtgcggggccaggacccgccgcctgagct
gtactttgtcaaggtggatgtgacgggcgcgtacgacaccatccccaggaacaggctcacggaggctcatcgcc
agcatcatcaaaccacgaacacgtactgcgtgcgtcggtatgccgtggtccagaaggccgcccatgggcacg
tccgcaaggccttcaagagccacgtctctaccttgacagacctccagccgtacatgcgacagttcgtggctca
40 cctgcaggagaccagcccgtgagggatgccgtcgtcatcgagcagagctcctccctgaatgaggccagcagt
ggcctcttcgacgtcttcctacgcttcatgtgccaccacgccgtgcgcacatcaggggcaagtcctacgtccagt
gccaggggatcccgcagggtccatcctctccacgctgctctgcagcctgtgctacggcgacatggagaacaa
gctgtttgcggggattcggcgggacgggctgctcctgcgtttgggtggatgatttcttgttggtgacacctcac
ctcaccacgcgaaaaccttcctcagctatgcccgacctccatcagagccagctctcaccttcaaccgcggct
45 tcaaggctgggaggaacatgcgtcgaaactctttggggctcttgcggtgaagtgtcacagcctgtttctgga
tttgacaggtgaacagcctccagacggtgtgcaccaacatctacaagatcctcctgctgcaggcgtacaggttt
cacgcatgtgtgctgcagctcccatttcacagcaagtttggaagaaccccacatttttccctgcgcgtcatct

ctgacacggcctccctctgctactccatcctgaaagccaagaacgcagggatgtcgctgggggccaagggcgc
cgccggccctctgccctccgagggcgtgcagtggctgtgccaccaagcattcctgctcaagctgactcgacac
cgtgtcacctacgtgccactcctggggtcactcaggacagcccagacgcagctgagtcggaagctcccgggga
cgacgctgactgccctggaggccgcagccaacccggcactgccctcagacttcaagaccatcctggactga

- 5 Die vorgenannten bevorzugten Sequenzen kodieren für humane Telomerase-reverse Transkriptase.

Bevorzugte Aminosäuresequenz der humanen Telomerase (SEQ ID NO. 6):

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQ
VSCLELVARVLQRLCERGAKNVLAFFGALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGD
10 DVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRLGCERAWNHVSREAGVPLGLPAP
GARRRGGSSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVS PARPAEEATSLEGALSGT
RHSHPVSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIF
LGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGGSVAAP
EEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWK
15 MSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRLLFFYRKS VWSKL
QSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPAALLTSRLRFIPKPDGLRPINMDYVVGARTFRREKRAERLTSR
VKALFSLVNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIA
SIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASS
GLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPH
20 LTHAKTFLSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLF LDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRF
HACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRH
RVTVVPLLGLSLRTAQTLQSRKLP GTTTLTALEAAANPALPSDFKTILD

- 25 Bei der (mindestens einen) Nukleinsäure oder Nukleinsäuresequenzen, die die Expression der Telomerase bewirkt, kann es sich um jede geeignete Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuren handeln, die zu einer stabilen Expression dieser Genprodukte führen. Die Nukleinsäuresequenzen sind bevorzugt exogene Nukleinsäuresequenzen. Unter exogene Nukleinsäuresequenzen sind sämtliche Sequenzen zu verstehen, die als Transgen oder andere neu in der Zelle (nach Isolierung der Zelle) eingeführte Nukleinsäure verwendet wurden.
- 30

- Die Erfindung setzt die künstliche Expression von Schlüsselproteinen um, die für die Unsterblichkeit der Zellen wirksam sind, beispielsweise die Telomerase, die eine Beeinträchtigung der Chromosomenenden während der DNA-Replikation in Eukaryonten vermeidet. Telomerase stellt die Endstücke der Chromosomen, die sogenannten Telomere, wieder her. Eine Immortalisierung mittels Telomerase stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar, 35 mittels einer nicht tumorerzeugenden Transformation, die Zellen zu immortalisieren.

Durch die Anwendung von Telomerase und/oder adenoviralen E1-Gene können die Chorionzellen überraschenderweise ohne erhebliche phänotypischen Änderungen der nativen Zellen immortalisiert werden.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine immortalisierte humane Chorionzelllinie, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen, die ein oder mehrere E1-Gene eines Adenovirus und/oder Telomerase kodieren, im Genom an den Genort eines Tumorsuppressorgens (z.B. p53 oder Rb) integriert sind. Der „Genort“ eines Tumorsuppressorgens betrifft sämtliche Genomregionen, die in Zusammenhang mit der Expression des Tumorsuppressorgens stehen. Insbesondere sind solche Regionen das tumorsuppressorkodierende Gen, der Promoter des Gens und/oder weitere Promoter/Enhancer-Kombinationen, die einen Einfluss auf die Genexpression des Tumorsuppressors aufweisen.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine immortalisierte humane Chorionzelllinie, dadurch gekennzeichnet, dass das Tumorsuppressorgen durch das Integrationsereignis ausgeschaltet ist. Die „Ausschaltung“ eines Gens betrifft sämtliche mögliche Änderungen des Gens, die zu einer reduzierten, inhibierten oder bevorzugt nicht-vorhandenen Expression des Gens führen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie, wobei humanes embryonales Choriongewebe als Ausgangsgewebe verwendet wird, welches mittels adenoviraler E1-Gene und/oder humaner Telomerase immortalisiert wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung einer permanenten Chorionzelllinie, insbesondere einer wie vorangehend definierten Chorionzelllinie, gekennzeichnet durch das Transfizieren von Chorionzellen mit mindestens einer Nukleinsäure, die die Expression der adenoviralen Genprodukte der E1a-Region und/oder E1b-Region bewirkt, oder einer Telomerase. Die erhaltenen Zellklone können dann gegebenenfalls weiter isoliert und unter Erhalt von Einzelzelllinien, wenn gewünscht, kloniert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung und/oder Gewinnung von Chorionzellen, bevorzugt von humanem embryonalem Choriongewebe als Ausgangsmaterial; umfassend bezogen auf das Inkulturbringen der Zellen;
- b) Transfektion der Zellen mit Nukleinsäuresequenzen (oder mindestens einen Nukleinsäure), die ein oder mehrere E1-Gene eines Adenovirus kodieren und bevorzugt die Expression der E1-Genprodukte bewirken, und/oder Transfektion der Zellen mit Nukleinsäuresequenzen (oder mindestens einen Nukleinsäure), die humane Telomerase kodieren und bevorzugt die Expression der Telomerase bewirken;

- c) Kultivierung der Zellen in Zellkultur;
- d) Subklonierung der Zellen, wobei die Zellen so verdünnt werden, dass (bevorzugt bei mikroskopischer Kontrolle) Zellpopulationen entstehen, die aus einer einzelnen Zelle hervorgehen.
- 5 e) Kultivierung der Zellen in Zellkultur.

Unter dem Begriff „Bereitstellung und/oder Gewinnung“ wird hierin jedes Verfahren verstanden, dass zur Vorbereitung von Choriongewebe geeignet ist.

10 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird das humane embryonale Choriongewebe mittels Biopsie gewonnen. Alternativ kann es auch aus Gewebe gewonnen werden, das im Rahmen eines Spontanabortes anfällt und einer humangenetischen Diagnostik zugeführt wird. Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch mit bereits gewonnenen oder isolierten Choriongewebe durchgeführt werden.

15 Die Gewinnung von Choriongewebe durch Biopsie ist auch als Chorionzottenbiopsie (engl. chorion biopsy) bekannt. Die Chorionzottenbiopsie, auch Chorionbiopsie genannt, ist eine Untersuchungsmethode der pränatalen (= vorgeburtlichen) Diagnostik. Es sind zwei Arten möglich, um die Chorionzotten zu entnehmen: 1) Transabdominale Methode: Unter Ultraschallkontrolle wird durch die Bauchdecke der Schwangeren eine Nadel in die Plazenta vorgeschoben und Gewebe entnommen (= Punktion). 2) Transzervikale Methode: Ein dünner Schlauch (Katheter) wird über die Vagina und den Gebärmuttermund in die Plazenta (= 20 Mutterkuchen) geführt und Choriongewebe entnommen.

Die Erfindung betrifft daher in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, in dem menschlichen Embryonen nicht zerstört werden. Als Ausgangsmaterial können embryonale Zellen, die bevorzugt im Rahmen der humangenetischen Diagnostik anfallen und die nach Abschluss der Untersuchungen üblicherweise verworfen werden, oder Zellen, die durch eine 25 Biopsie gewonnen werden, verwendet werden.

Die Erfindung kann – in Zusammenhang mit einem oder mehreren der hierin offenbarten Ausführungsformen – als ein Verfahren zur Immortalisierung humaner Chorionzellen oder als ein Verfahren zur Herstellung immortaler Chorionzelllinien gekennzeichnet werden.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Verfahren eine Trennung der Chorionzellen aus dem Material der Chorionzottenbiopsie umfassen. Beispielsweise können die Chorionzellen von Amniozyten getrennt werden, um die gewünschten Chorionzellen als Ausgangsmaterial zu isolieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird (bevorzugt unter sterilen Bedingungen) Choriongewebe in Kulturmedium eingesetzt und anschließend mit einem enzymatischen Verdau behandelt. Diese Behandlung kann eine Trypsin- und/oder Collagenase-Behandlung umfassen, bevorzugt für mindestens 10 Minuten, oder zwischen 10 bis 120 Minuten, bevorzugt zwischen 20 und 60 Minuten. In einer bevorzugten Ausführungsform finden hier rekombinante Enzyme nicht-tierischer Herkunft Verwendung, um das Risiko einer unerwünschten Kontamination mit Krankheitsrerregern tierischen Ursprungs niedrig zu halten.

Anschließend werden die in Zellkultur wachsenden Zellen mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren transfiziert. Ohne Zugabe transformierender Agentien können die isolierten bzw. bereitgestellten Chorionzellen nur ca. 4-6 Passagen kultiviert werden. Nach erfolgreicher Integration und kontinuierlicher Expression von adenoviralen E1-Genen bzw. Telomerase wird die Wachstumshemmung aufgehoben und der relative Anteil von transfizierten Zellen in der Zellkultur steigt kontinuierlich an.

4 bis 8 Wochen, bevorzugt 6 Wochen nach Transfektion liegt der Anteil an E1-exprimierenden Zellen bei etwa 15 bis 35 %, bevorzugt 25%. Während dieser Zeit wird der Anteil an humanen Serum im Kulturmedium bei 20% bis 40%, bevorzugt 30% gehalten.

Um eine reine Zellpopulation zu erhalten werden die Zellen subkloniert. Hierbei werden die Zellen beispielsweise unter mikroskopischer Kontrolle in 96-well Platten vereinzelt, so dass sichergestellt ist, dass eine neu auswachsende Zellpopulation aus einer einzelnen Vorläuferzelle hervorgegangen ist.

Nach der Sub-Klonierung wird der Anteil an humanem Serum in der Kulturmedium kontinuierlich reduziert um die Zellen letztendlich unter serumfreien Bedingungen kultivieren zu können.

Zu diesem Ziel ist nach der Sub-Klonierung in einer Ausführungsform vorgesehen, den Anteil an humanem Serum in der Kulturmedium auf 15 bis 20%, und nach weiteren 2 bis 4, bevorzugt 3 Wochen auf 7 bis 15, bevorzugt 10% reduziert wird. Anschließend sollte der Anteil an humanem Serum in der Kulturmedium 2 bis 4 Wochen später, bevorzugt 3 Wochen später auf 2,5 bis 7%, bevorzugt 5% reduziert werden, dann 2 bis 4 Wochen, bevorzugt 3 Wochen später auf 1% bis 5%, bevorzugt 2,5%, und schließlich auf 0% reduziert werden. Von diesem Zeitpunkt an werden die Zellen bevorzugt unter serumfreien Bedingungen (z. B. in 293-SFM (life technologies)) kultiviert.

Nach 5 bis 7 Monaten, bevorzugt 6 Monaten, liegt die Teilungsgeschwindigkeit der schnellsten Klone bei bevorzugt 24-36 Stunden und die Immortalisierung ist abgeschlossen.

Unter dem Begriff "Transfizieren" oder „Transfektion“ wird hierin jedes Verfahren verstanden, dass sich zum Einbringen der genannten Nukleinsäure(n) in die Zellen eignet. Als Beispiele sind die Elektroporation, liposomale Systeme jeglicher Art und Kombinationen dieser Verfahren zu nennen. Calciumphosphat-Coprazipitation kann eingesetzt werden. Bei dieser

5 Art der Transfektion wird die DNA in ein Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat eingebracht.

Bei der mindestens einen Nukleinsäure, die die Expression der adenoviralen E1-Genprodukte oder Telomerase bewirkt, kann es sich bevorzugt um genomische DNA, cDNA, synthetische DNA, RNA und mRNA handeln. Vorzugsweise wird die Nukleinsäure in Form eines DNA-

10 Expressionsvektors verwendet. Beispiele hierfür sind integrative Vektoren, bakterielle Plasmide, episomal replizierende Plasmide oder Mini-Chromosomen. Bevorzugt sind Expressionsplasmide, die durch Transfektion in das Genom der Empfängerzelle zur Integration gebracht werden.

Mit dem Ausdruck "mindestens eine Nukleinsäure" wird zum Ausdruck gebracht, dass die die Expression bewirkenden Elemente sich sowohl auf einer und der gleichen Nukleinsäure als auch auf verschiedenen Nukleinsäuren befinden können. Beispielsweise können getrennte Nukleinsäuren für die Expression der Genprodukte der E1A- und E1B-Regionen vorgesehen sein.

15

In einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zu adenoviralen-E1-Genen das Gen für den CAR-Rezeptor exprimiert wird.

20

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinien, bei dem das zur Immortalisierung verwendete Gen (z.B. adenovirus E1-Gene oder Telomerase) durch gezielte homologe Rekombination an den Genort eines Tumorsuppressorgens (z.B. p53 oder Rb) und dieses durch das Integrationsereignis ausschaltet.

25

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinien, bei dem die expressionssteuernden Elemente des Tumorsuppressorgens erhalten bleiben, so dass die mit dem Verlust des Tumorsuppressorgens reflektorisch gesteigerte Promoterleistung zur Expression des Transgens (z.B. adenovirale E1-Gene oder Telomerase) genutzt wird.

30

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung immortaler Chorionzelllinien, das dadurch gekennzeichnet ist, dass zur Insertion des Transgens DNA-Sequenzen genutzt werden, die homolog zu den das Tumorsuppressorgen flankierenden genomischen Arealen sind.

35

Die Erfindung betrifft daher eine immortalisierte humane Chorionzelllinie, welche durch das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren gewonnen wird. Die immortalisierte humane Chorionzelllinie kann ggf. durch eines oder mehrere der Verfahrensmerkmale oder entsprechende Strukturmerkmale, die im Zusammenhang mit dem Verfahren offenbart sind, gekennzeichnet werden.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen immortalisierten humanen Chorionzelllinie zur Herstellung von rekombinanten Proteinen und/oder medizinischen Wirkstoffen.

Demgemäß ist ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanter Proteine vorgesehen, welches auf Basis der immortalisierten humanen Chorionzelllinie durchgeführt wird, wobei die Zellen eine geeignete Expressionskassette enthalten, die ein oder mehreren E1-Gene eines Adenovirus und/oder eine Telomerase kodieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das rekombinante hergestellte Protein ein humanes Protein.

Als rekombinantes Protein kann im Wesentlichen jedes beliebige Protein exprimiert werden. Insbesondere sind medizinische relevante humane Proteine bevorzugt. Beispiele für menschliche rekombinante Proteine sind menschliches Wachstumshormon (rGH), menschliches Insulin (BHI), Follikel-stimulierendes Hormon (FSH), Faktor VIII Kogenate, Erythropoietin (EPO), Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), Filgrastim, alpha-Galactosidase A alpha-L-Iduronidase (rhIDU; Iaronidase), N-Acetyl-4-Sulfatase (rhASB; Galsulfase), Gewebe-Plasminogen-Aktivator (TPA), Glucocerebrosidase, Interferon (IF) oder Interferon beta-1b, oder Insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1).

Die erforderlichen Methoden für die Expression und Isolierung eines rekombinant hergestellten Proteins sind einem Fachmann auf dem Gebiet der Proteinexpression oder Molekularbiologie bekannt.

Die erfindungsgemäße Chorion-Zelllinie eignet sich neben ihrer Verwendung zur Herstellung von Gentransfervektoren im allgemeinen insbesondere zur Herstellung von adenoviralen Vektoren, die durch Deletionen der E1A- und E1B-Gene charakterisiert sind. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Adenoviren unter Verwendung der erfindungsgemäßen immortalisierten humanen Chorionzelllinien. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die rekombinanten Adenoviren E1/E3 deletierte Adenoviren.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Genen der adenoviralen E1-Region zur Immortalisierung einer Chorionzelle, wobei die Gene der adenoviralen E1-Region eine

Sequenzidentität zu sog. E1-deletierten Adenoviren von weniger als 90%, bevorzugt weniger als 70% Sequenzidentität, weiterhin bevorzugt weniger als 50% Sequenzidentität, aufweisen, um das Risiko einer unerwünschten Rekombination zwischen den E1-deletierten Adenoviren und Genen der adenoviralen E1-Region zu minimieren.

- 5 Eine bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Gene der adenoviralen E1-Region keine ausreichende Sequenzhomologien zu sog. E1-deletierten Adenoviren aufweisen, um eine Rekombination zwischen den E1-deletierten Adenoviren und Genen der adenoviralen E1-Region zu ermöglichen.

- 10 Auf diese Weise werden das Risiko einer unerwünschten Rekombination und die Entstehung von Wildtypviren minimiert. Gemäß dieser Ausführungsform kann eine ausreichende Homologie (bzw. Sequenzidentität) durch Routinemaßnahmen festgestellt werden. Ein Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie ist in der Lage zu prüfen, ob durch eine gewisse Sequenzidentität die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination reduziert wird.

- 15 Beispielsweise können die Nukleinsäuresequenzen verändert werden, ohne die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins zu ändern. Degenerierten Codons und somit die Redundanz des genetischen Codes können hierfür verwendet werden. Hierdurch können die Risiken einer Rekombination minimiert werden, ohne funktionelle Änderungen des Proteins hervorzurufen.

- 20 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren, bei welchem durch homologe Rekombination adenovirale E1-Gene in einer Weise in das Genom der (Chorion-) Zielzelle eingeführt werden, die gleichzeitig zur einer Inaktivierung einzelner Tumorsuppressorgene führt und auf diese Weise in einem verkürzten Zeitraum und in einem höheren Anteil zur Immortalisierung und Transformation von Zielzellen beiträgt. Bevorzugt ist ein Verfahren, in dem das zur Immortalisierung verwendete Gen (z.B. adenovirus E1-Gene oder Telomerase) durch gezielte
25 homologe Rekombination an den Genort eines Tumorsuppressorgens (z.B. p53 oder Rb) und dieses durch das Integrationsereignis ausschaltet.

BEISPIELE UND DETAILLIERTE ERLÄUTERUNG DER ERFINDUNG

- 30 Die Erfindung wird weiter durch die folgenden Beispiele beschrieben. Diese betreffen mögliche und zum Teil bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung und sollen nicht den Umfang der Erfindung beschränken.

Anatomische Lage und physiologische Bedeutung des Choriongewebes

Das Amnion (*Amnios*, auch *Schafshaut*) ist die dünne, gefäßlose innerste Eihaut und damit Teil der Fruchtblase der Amnioten (Reptilien, Vögel und Säugetiere). Das Chorion

(Zottenhaut) bildet die mittlere und die Dezidua (Siebhaut) die äußere Eihaut. Das Chorion ist der äußere Anteil der beiden embryonalen Lagen der Fruchtblase, während die Dezidua zum maternalen Anteil der Fruchtblase gehört. Das Chorion besteht aus dem extraembryonalen Mesoderm und dem Trophoblasten und bildet den kindlichen, bzw. embryonalen Anteil der Plazenta, während das Amnion das innerste einschichtige Epithel der Fruchtblase vorstellt und zu einem wesentlichen Anteil für die Produktion des Fruchtwassers verantwortlich ist.

Amnion und Chorion unterscheiden sich sowohl von ihrer anatomischen Lokalisation, von ihrer Funktion und von ihrem genetischen Expressionsprofil her. Das Choriongewebe stellt den Hauptanteil des embryonalen Plazentagewebes dar und trägt die Hauptlast des Stoffwechsels zwischen Mutter und Kind. Über das Choriongewebe wird das Embryo mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt. Seinen vielfältigen physiologischen Funktionen entsprechend sind Chorionzellen ähnlich der Leber in der Lage eine große Zahl von Hormonen (wie humanes Choriongonadotropin (HCG), schwangerschafts-assoziiertes Protein A (PAPP-A) humanes Plazentalaktogen (hPL), plazentares corticotropin Releasing-Hormon), Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren (Myostatine, Endogline, proangiogenetischer Plazentawachstumsfaktoren), immunologische Abwehrstoffen (wie Defensine, Leukozytenproteaseinhibitoren, Elafine), Enzyme oder gerinnungs-modulierende Faktoren (Faktor VII-aktivierende Protease, Faktor XIII) und viele weitere Proteine zu produzieren.

Die unterschiedliche anatomische Lage erfordert im Rahmen der humangenetischen Diagnostik auch eine unterschiedliche Art und Weise der Probengewinnung (entweder mittels Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie). Ferner fällt Choriongewebe im Rahmen von Schwangerschaftsabbrüchen an. Während der Fötus bei einem Schwangerschaftsabbruch unweigerlich verloren geht, bleibt das Choriongewebe über längere Zeit vital, woraus sich wiederum die Chorionzellen gewinnen lassen. Bedingt durch die unterschiedliche anatomische Lage entnimmt man bei der Amniozentese Fruchtwasser per Spritze und zentrifugiert die darin schwimmenden Amniozyten ab. Chorionzellen gewinnt man auf diese Weise nie, da sich keine Chorionzellen im Fruchtwasser befinden. Am deutlichsten wird der Unterschied zwischen der Eihaut (Amnion) und dem darunterliegenden Chorion nach der Entbindung. Die glänzende dem Kind zugewandte Seite der Plazenta ist die dünne Eihaut (Amnion), die von der Plazenta durch einfachen Zug abgelöst werden kann. Darunter kommt das Choriongewebe zur Darstellung. Auch wenn Amnion- und Chorionzellen in Zellkultur morphologische Ähnlichkeiten aufweisen unterscheiden sie sich in ihrem Expressionsprofil. Das Chorion bildet den sog. Trophoblasten und von Amnionzellen durch die Höhe und das Expressionsprofil von sog. Trophoblastenmarkern wie CDX2, alpha- und β -HCG, EOMES, EpCam/TROP1, ERR beta/NR3B2, FGF-4 und TROP-2 (Plouzek et al. Placenta 1993 14(3):277-85, Fariha Cytotherapy 2011 13(5): 582-93, Portmann-Lanz et al. Am. J. Obstet.

Gynecol. 2006;194:664-73, Simat et al. Med. J. Malaysia 2008; 63:53-4, Poloni et al. Cytotherapy 2008;10; 690-7,).

Choriongewebe ist daher ein biologisches Material das verfügbar wird, ohne dass Embryonen getötet werden müssen. Auch durch die im Rahmen einer Schwangerschaftsdiagnostik häufig durchgeführte Chorionzottenbiopsie, auch Chorionbiopsie genannt, ist derartiges Material grundsätzlich und ohne moralisch-ethische Komplikationen verfügbar. Die Chorionzottenbiopsie ist eine Untersuchungsmethode der pränatalen (= vorgeburtlichen) Diagnostik. Bereits sehr früh in der Schwangerschaft (10. bis 12. Schwangerschaftswoche) kann diese Diagnosemethode Aufschluss über bestimmte Stoffwechselerkrankungen und Chromosomenschäden beim Ungeborenen geben.

Das zottige Choriongewebe ist die Vorstufe des Mutterkuchens. Es enthält – in der Regel – die gleichen Erbinformationen wie die Körperzellen des Embryos. Die Gewinnung der Zellen erfolgt für gewöhnlich zwischen der 10. und 12. Schwangerschaftswoche. Es sind zwei Arten möglich, um die Chorionzotten zu entnehmen: (a) Transabdominale Methode: Unter Ultraschallkontrolle wird durch die Bauchdecke der Schwangeren eine Nadel in die Plazenta vorgeschoben und Gewebe entnommen (= Punktion), (b) Transzervikale Methode: Ein dünner Schlauch (Katheter) wird über die Vagina und den Gebärmuttermund in die Plazenta (= Mutterkuchen) geführt und Choriongewebe entnommen. Die transabdominale Methode wird aufgrund der geringeren Risiken heutzutage bevorzugt. Die im Rahmen einer Biopsie entnommenen Gewebeproben enthalten ca. 20 bis 30 Milligramm Chorionzotten.

Zur Gewinnung und Isolierung natürlicherweise von Chorionzellen produzierter körpereigener Proteine und Wirkstoffe, als auch zur Nutzung als Produktionsplattform für rekombinante Proteine (Antikörper, Gerinnungsfaktoren, Impfstoffe, Hormone etc.) sind Chorionzellen gegenüber anderen embryonalen Geweben in besonderer Weise geeignet, da die Produktion von Wachstums- und Nährstoffen zu ihrer physiologischen Bestimmung gehört.

Ein überraschende Aspekt der Erfindung besteht in der Nutzung von Choriongewebe zur Etablierung neuer humaner Zelllinien, die ähnlich wie Amnionzellen auf unkritische Weise im Rahmen der humangenetischen Diagnostik zugänglich werden, sich aber nicht nur durch eine andere anatomische Lage, sondern auch einen anderen funktionellen Hintergrund und ein unterschiedliches Expressionsprofil von Amnionzellen unterscheiden.

Eine Chorionzottenbiopsie kann in der Regel früher als eine Amniozentese durchgeführt werden (da für die Amniozentese eine erst gewisse Menge an Fruchtwasser vorhanden sein muß). In der frühen Embryonalentwicklung weist Choriongewebe eine erhöhte Anfälligkeit für neoplastische Entwicklungsstörungen (Blasenmole, Chorionkarzinom) durch Chromosomenfehlverteilungen auf, was ein Hinweis auf eine erhöhte Transformationsneigung

ist und den Versuch einer absichtsvollen Transformation bzw. Immortalisierung (z.B. durch die stabile Expression adenoviraler E1-Gene) erleichtert. Aufgrund seiner physiologischen Bedeutung bei der nutritiven Versorgung des Embryos und seinen vielfältigen Synthesaufgaben, eignen sich Choriongewebe in besonderer Weise zur Etablierung von Zelllinien für die Produktion rekombinanter Wirkstoffe und Proteine.

Die Immortalisierung bzw. Transformation von Chorionzellen durch stabile Transfektion eines oder mehrerer für den Menschen ungefährlicher Transgene (z.B. adenovirale E1-Gene) ermöglicht den Zugang zu neuen humanen Zelllinien, die sich durch einen hohen biologischen Sicherheitsprofil auszeichnen und in besonderer Weise für die Herstellung rekombinanter Wirkstoffe geeignet sind.

Immortalisierung primärer humaner Zellen durch Nutzung adenoviraler E1-Gene

Adenoviren sind eine relativ homogene Gruppe von Viren, die durch ein ikosaedrisches Kapsid charakterisiert sind, das hauptsächlich aus den viral-kodierten Hexon-, Penton- und Fiber-Proteinen, sowie einem linearen, doppelsträngigen DNA-Genom mit einer Größe von etwa 36 Kilobasen (kb) besteht. Das virale Genom enthält an den Enden die invertierten Terminalen Wiederholungssequenzen (ITRs), bei denen es sich um den viralen Replikationsursprung handelt. Ferner befindet sich am linken Ende des Genoms das Verpackungssignal, das für die Verpackung des viralen Genoms in die Viruskapside im Verlauf eines Infektionszyklus erforderlich ist. Adenoviren sind von vielen Spezies isoliert worden. Es gibt mehr als 40 verschiedene menschliche Serotypen, basierend auf zwischen den verschiedenen Serotypen diskriminierenden Parametern wie Hämagglutination, Tumorigenität und DNA-Sequenzhomologie (Wigand et al., in: Adenovirus DNA, Doerfler Hrsg., Martinus Nijhoff Publishing, Boston, S. 408-441, 1986). Adenovirale Vektoren sind bisher meist von den Serotypen 2 (Ad2) und 5 (Ad5) abgeleitet. Infektionen durch Ad2 und Ad5 sind endemisch beim Menschen. Ad2 und Ad5 sind im Menschen nicht onkogen und haben eine gute Sicherheitsdokumentation, da in den USA erfolgreich und komplikationslos Vakzinierungen an militärischem Personal durchgeführt wurden (Pierce et al., Am. J. Epidemiol. 87, 237-246, 1968).

E1a ist das erste virale Gen, das nach Erreichen des Zellkerns durch das virale Chromosom exprimiert wird. Das E1a-Gen kodiert für die 12S- und HS-Proteine, die durch alternatives Spleißen der E1a-RNA gebildet werden. Die E1A-Proteine aktivieren die Transkription einer Reihe von zellulären und viralen Genen durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren. Die Hauptfunktionen von E1a sind a) die Aktivierung der anderen frühen viralen Funktionen E1b, E2, E3 und E4 und b) die Induktion ruhender Zellen, in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten. Die alleinige Expression von E1A führt zum programmierten Zelltod von Zellen (Apoptose).

E1B ist eines der frühen viralen Gene, die durch E1a aktiviert werden. Das E1b-Gen kodiert für das E1B-55-kD-Protein und das E1B-19-kD-Protein, die durch alternatives Spleißen der E1b-RNA entstehen. Das 55-kD-Protein moduliert die Progression des Zellzyklus durch Interaktion mit dem p53-Tumorsuppressorgen, ist involviert in die Verhinderung des Transports zellulärer mRNA spät während der Infektion, und verhindert die E1A-induzierte Apoptose von Zellen. Das E1b-19-kD-Protein ist ebenfalls für die Verhinderung der E1A-induzierten Apoptose von Zellen wichtig.

Alle humanen Adenoviren sind in der Lage, Zellen in der Zellkultur zu transformieren. Für die Transformierung ist in der Regel die Ko-expression von E1a und E1b bevorzugt. Eingebettet in die E1b-Transkriptionseinheit ist das Protein IX-Gen, das für eine Strukturkomponente des viralen Kapsids kodiert. Die Gene der sog. early region 1 (E1-Region) von Adenovirus Serotyp 5 (E1a, E1b1, E1b2) sind nach aktuellem Stand der Forschung nicht tumorigen für den Menschen. Im Unterschied dazu ist das krebsauslösende Potential anderer viraler Gene, wie z.B. das der HPV-Onkogene E6 und E7 oder das des SV40 Virus (SV40 T-Antigen) unstrittig. Die Nutzung von Genen der adenoviralen E1-Region ist daher ein Weg Zellen zu immortalisieren, der das Risiko unerwünschter Kontaminationen eines rekombinanten Produktes mit sicherheitsrelevanten Onkogenen sehr niedrig hält.

Neben der Produktion rekombinanter Proteine sind Zelllinien, die durch stabile Transfektion adenoviraler E1-Gene immortalisiert worden sind, zur Produktion rekombinanter sog. E1/E3 deletierter Adenoviren geeignet, da die in den Viren deletierten Gene bzw. Genfunktionen in diesem Fall durch die Verpackungszelle funktionell komplementiert werden kann.

Adenovirale Vektoren der ersten Generation (Gilardi et al., FEBS Letters 267, 60-62, 1990; Stratford-Perricaudet et al., Hum. Gene Ther. 1, 241-256, 1990) sind durch Deletionen der E1a- und E1b-Gene, und/oder des E3-Gens, charakterisiert. E1a und E1b haben transformierende und transaktivierende Eigenschaften. Ferner ist E1a für die Aktivierung viraler Gene und E1b für die Akkumulation viraler Transkripte erforderlich. In einigen Vektoren ist außerdem E3 deletiert, um die Kapazität für die Aufnahme fremder DNA zu erhöhen. E3 ist für die Herstellung von Adenoviren in der Zellkultur entbehrlich. Die Kapazität für die Aufnahme fremder DNA beträgt etwa 8 kb. Adenovirus-Vektoren der ersten Generation sind bisher überwiegend in 293-Zellen produziert worden (siehe unten), die den E1A- und E1B-Defekt der Vektoren komplementieren.

Adenovirale Vektoren der zweiten Generation sind durch Deletionen von E2 und/oder E4 zusätzlich zu Deletionen von E1a und E1b charakterisiert (Engelhardt et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91, 6196-6200, 1994; Yang et al., Nature Genet., 7, 362-367, 1994; Gorziglia et al., J. Virol. 70, 4173-4178, 1996; Krougliak und Graham, Hum. Gene Ther. 6, 1575-1586, 1995; Zhou et al., J. Virol. 70, 7030-7038, 1996). In einigen Vektoren ist außerdem E3 deletiert, um

die Kapazität für die Aufnahme fremder DNA zu erhöhen. Adenovirale Vektoren der zweiten Generation wurden entwickelt, um die Transkription von viralen Genen und die Expression viraler Proteine weiter zu reduzieren und um somit die antivirale Immunantwort weiter zu verringern. Die Kapazität für die Aufnahme fremder DNA ist gegenüber adenoviralen Vektoren der ersten Generation nicht wesentlich erhöht. Adenovirus-Vektoren der zweiten Generation werden in Zelllinien produziert, die zusätzlich zu E1a und E1b den jeweiligen Defekt (E2 und/oder E4) komplementieren.

Die Kapazität für die Aufnahme fremder DNA beträgt etwa 37 kb, da der weit überwiegende Teil des adenoviralen Genoms entfernt ist. Es sind verschiedene Systeme zur Herstellung adenoviraler Vektoren großer DNA-Kapazität beschrieben worden (Kochanek et al., supra; Parks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13565-13570, 1996; Hardy et al., J. Virol. 71, 1842-1849, 1997). Der Vorteil dieser adenoviralen Vektoren mit großer DNA-Kapazität im Vergleich zu adenoviralen Vektoren der ersten und zweiten Generation liegt in der größeren Kapazität für die Aufnahme fremder DNA und in einer geringeren Toxizität und Immunogenität (Schiedner et al., Nature Genet. 18, 180-183, 1998; Morral et al., Hum. Gene Ther. 9, 2709-2716, 1998).

Bei der Konstruktion dieser in der Medizin verwendeten rekombinanten, replikationsdefizienten Adenoviren wird die E1-Region durch ein therapeutisches Gen ausgetauscht. Die Herstellung dieser rekombinanten, ein therapeutisch wertvolles Gen tragenden Viren, erfolgt z.B. durch Kotransfektion eines sog. Helfer- oder Transferplasmides, bei dem das Transgen an beiden Seiten von zum Virusgenom homologen Bereichen flankiert wird. Die Entstehung eines rekombinanten Virus setzt eine homologe Rekombination zwischen Transferplasmid und viralem Genom voraus. Beide Plasmide können für sich allein keine Adenoviren generieren. Kommt es jedoch zufällig zur Kotransfektion einer 293-Zelle mit den beiden Plasmiden, kann es zu einem Austausch der genetischen Information durch Cross-over, einer homologen Rekombination kommen. Daraus entstehen rekombinante, E1- und E3-deletierte Adenoviren, die das therapeutische Gen beinhalten. Um hohe Konzentrationen des Virus für Therapiestudien zu erreichen, werden diese Adenoviren, die in normalen Zellen nicht replikationsfähig sind, in der 293 Helfer-Zelllinie vermehrt. Diese Zellen enthalten die fehlende E1-Region stabil in ihrem Genom integriert, stellen das Genprodukt für die Virusreplikation zur Verfügung und ermöglichen so die Amplifikation des rekombinanten Adenovirus. Diese Adenoviren können in keinem anderen zellulären System replizieren.

Bei den therapeutischen Genen, die von in transformierten Chorionzellen, d.h. einer immortalen Chorionzelllinie, produzierten Vektoren (z. B. E1/E3 deletierter Adenoviren) kodiert und exprimiert werden können, kann es sich z. B. um jede beliebigen Muskelproteine, Gerinnungsfaktoren, Membranproteine oder Zellzyklusproteine handeln. Beispiele für

Proteine, die von in transformierten Chorionzellen hergestellten Vektoren exprimiert werden können, sind Dystrophin (Hoffman et al., Cell 51, 919, 1987, Faktor VIII (Wion et al., Nature 317, 726 1985, Zystische Fibröse Transmembran Regulator Protein (CFTR) (Anderson et al., Science 251, 679, 1991, Omithin-Transcarbamylase (OTC) (Murakami et al., J. Biol. Chem., 263, 18437, 1988, Alpha₁-Antitrypsin (Fagerhol et al., in: Hum. Genet., Bd. 11, Harris Hrsg., Plenum, New York, S.I, 1981. Die Gene, die für Proteine kodieren, sind bekannt und können aus genomischen oder cDNA-Banken kloniert werden. Ein Beispiel für ein weiteres Gen, welches von Vektoren exprimiert werden, die in transformierten Chorion hergestellt werden können, ist das Thymidin-Kinase-Gen von Herpes simplex-Virus (HSV) Typ I zur Therapie von Tumorerkrankungen.

Vektoren, die in transformierten Chorionzellen hergestellt werden, können zusätzlich zum therapeutischen Gen ein beliebiges Reporter-Gen enthalten, um die Expression des Vektors besser verfolgen zu können. Beispiele von Reporter-Genen sind im Stand der Technik bekannt und schließen z.B. das β -Galaktosidase-Gen ein (Fowler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1507, 1977). Vektoren, die in transformierten Chorionzellen hergestellt werden können, können mehr als ein einzelnes Gen enthalten. Die maximale Zahl an Genen, die in solchen Vektoren produziert werden können, hängt von der Aufnahmekapazität des jeweiligen Vektors und von der Gengröße ab.

Die erfindungsgemäß hergestellte Zelllinie eignet sich auch zur Expression von zur Immortalisierung geeigneter Gene, insbesondere adenoviraler E1-Gene.

Freiheit von Pathogenen tierischen Ursprungs

Die Kultivierung und Immortalisierung der Chorionzellen erfolgt ausschließlich in Abwesenheit von Materialien tierischen Ursprungs. Es werden bei der Kultivierung bevorzugt ausschließlich Kulturmedien verwendet, die nur humane Seren, bzw. rekombinante Proteine oder weitere Komponenten (Wachstumsfaktoren, Insulin, rekombinantes Trypsin etc.) nicht-tierischen Ursprungs enthalten.

Alle Produkte, die mit Hilfe dieser Zelllinie produziert werden (therapeutische Proteine, Impfstoffe, rekombinante Viren, Hormone) sind frei von Pathogenen tierischen Ursprungs.

Verfahren zur Immortalisierung durch homologe Rekombination in Tumorsuppressor-Genorte

Diese Anmeldung beschreibt im Weiteren ein Verfahren zur Immortalisierung, bei der die transformierenden adenoviralen E1-Gene durch homologe Rekombination in das Genom der Zielzelle eingebracht werden. Die homologe Rekombination erfolgt dabei bevorzugt in die

Genorte von Tumorsuppressorgen (insbesondere in die Genorte der Tumorsuppressorgene p53 und des Retinoblastomgens (Rb)).

Durch die homologe Rekombination wird die Funktion dieser Tumorsuppressorgene ausgeschaltet. Gleichzeitig erfolgt die Rekombination in einer Art und Weise, die die
5 expressionssteuernden Elemente der Tumorsuppressorgene, also die Promoterregion oberhalb des Startcodons der Tumorsuppressorgene und die polyAdenylierungsregion unterhalb des Stopcodons der Tumorsuppressorgene, intakt läßt. Durch diese Art der Rekombination kann die nach Verlust des Tumorsuppressorgens reflektorisch gesteigerte Promoterleistung (der Tumorsuppressorgene) für die Expression der zur Immortalisierung
10 genutzten Gene (E1-Gene, Telomerase) genutzt werden.

Üblicherweise erfolgt die Integration von zur Immortalisierung von Zellen genutzten Genen zufällig in transkriptionsaktive des Genoms der Zielzelle. Aus den Erfahrungen bei der Herstellung von knock-in oder knock-out Mäusen, bei denen bestimmte Genfunktionen gezielt an oder abgeschaltet werden sollen, ist bekannt, dass die Wahrscheinlichkeit einer gerichteten
15 Integration an einen bestimmten Genlocus im Genom dadurch gesteigert werden kann, daß das einzubringende Gen von Gensegmenten flankiert wird, die zur Zielregion im Genom homolog sind. Üblicherweise erfolgt die homologe Rekombination dann in einer Weise, in der die zwischen den homologen Elementen liegenden Gene gegen die zuvor im Genom integrierten Anteile ausgetauscht werden. Die unten stehende Figur 4 erläutert das Prinzip am
20 Beispiel der Integration in den p53 Genort. Grundsätzlich kann dieses Prinzip aber auf alle Gene angewandt werden, deren Abschaltung zu einer Beschleunigung der Zellzyklus bzw. zu einer Abnahme der Apoptoseneigung (Apoptose: innerer Zelltod) einer Zelle führt.

Die Nutzung dieses Verfahrens erhöht die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Immortalisierung insbesondere von Primärzellen humanen Ursprungs, da mit der stabilen
25 Integration des zur Immortalisierung genutzten Gens (z.B. adenovirale E1-Gene oder humane Telomerase) gleichzeitig eine Tumorsuppressorfunktion der Zielzelle (z.B. p53 oder Rb) ausgeschaltet wird. Grundsätzlich gilt, dass die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination mit der Länge der flankierenden Bereiche korreliert. Im Idealfall sollten die homologen Anteile mehrere Tausend Basenpaare lang sein.

Eigene Untersuchungen zur Immortalisierung muriner Fibroblasten (NIH-3T3) haben gezeigt, dass die Nutzung des beschriebenen Mechanismus zur Deletion von Tumorsuppressorfunktionen die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Zelltransformation um den Faktor 5-10 gegenüber der einfachen ungezielten stabilen Integration erhöht.

Tumorsuppressoren sind Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren. Es handelt sich weniger
35 um die Bezeichnung einer Proteinfunktion als um eine physiologische Definition. Eine

Mutation oder Deletion eines für einen Tumorsuppressor codierenden Gens (Tumorsuppressorgens) erhöht die Wahrscheinlichkeit einer verbleidenden Zellteilung. In diesem Sinne haben Tumorsuppressorgene eine vergleichbare Auswirkung bei Mutationen wie Proto-Onkogene. Beispiele für Tumorsuppressoren sind: p16: Diese Proteinfamilie hemmt die CDKs und verhindert so einen Übertritt von der G1 zur S-Phase des Zellzyklus. p27: Dieses Protein kontrolliert den Übergang von G0 zur G1-Phase des Zellzyklus und verhindert diesen, wenn es vermehrt gebildet wird. Sowohl von Viren befallene Zellen fördern über einen Gewebemediator (TGF- β) die p27 Bildung, als auch benachbarte Zellen bei der Kontaktinhibition. Rb: Rb umschließt normalerweise schalenartig den Transkriptionsfaktor E2F, der zur Einleitung der S-Phase zwingend gebraucht wird. Durch Phosphorylierung öffnet sich nach und nach die Hülle, und der Transkriptionsfaktor wird "freigelassen". In Tumorzellen ist das Gen für das RB-Protein in über 60 % der Fälle mutiert. Die Regulation (also der Phosphorylierungsmechanismus) des RB-Proteins ist sogar in jeder Tumorzelle in irgendeiner Weise gestört. Das p53: Dieses Protein sorgt in der Regel dafür, dass sich eine Zelle nur dann teilt, wenn ihr Erbgut auch intakt ist. Das Protein p53 ist in vielen Typen von entarteten Zellen in erhöhter Menge messbar. Es ist auch in normal wachsenden Zellen vorhanden, aber in ruhenden Zellen kaum oder gar nicht zu finden. In vielen Tumortypen ist das für p53 kodierende Gen mutiert. In manchen, aber nicht allen Tumoren scheint das Protein als Tumorsuppressor zu wirken. p53 spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, wo es die Aktivität einer Anzahl von Genen bremst. p53 ist in allen Wirbeltieren zu finden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird p53 als Integrationstarget verwendet, um die erfindungsgemäße Transgene im Genom zu integrieren.

Die "homologe Rekombination" ist für einen Fachmann bekannt und bezieht sich auf einen Austausch zwischen zwei DNA-Sequenzregionen mit einer ausreichenden Sequenzidentität. Voraussetzung sind „homologe“, nämlich doppelsträngige DNA-Abschnitte mit einer zueinander hohen Sequenzidentität. "Homolog" kann auch so verstanden werden, als eine hohe Sequenzidentität oder -Ähnlichkeit in der Nucleotidsequenz. Homologen können daher mehr als eine 50%, 60%, 70%, 80%, oder bevorzugt mehr als 90% Sequenzidentität zu einander aufweisen. Die Erfindung umfasst daher die mögliche Anwendung einer Sequenzspezifischen Rekombination, nämlich eine gezielte (also nicht zufällige) Integration von DNA in ein Genom durch eine Rekombination. Rekombination ist in der Gentechnik weit verbreitet und für einen Fachmann auf dem Gebiet der molekularen Biologie gut bekannt. In der Gentechnik stehen heute Werkzeuge zur Verfügung, mit deren Hilfe rekombinante DNA künstlich hergestellt und in Organismen eingeschleust werden kann. Im Zuge einer Klonierung können DNA Sequenzen mit Restriktionsenzymen an spezifischen Erkennungssequenzen geschnitten und mit Ligasen neu verknüpft. Häufig dienen Plasmide oder Viren als Vektoren, um die rekombinante DNA in den Zielorganismus zu transferieren. Alternative zur

konventionellen DNA-Klonierung mit Restriktionsenzymen und Ligasen sind auch bekannt, auf homologer Rekombination basierende Technologien, wie das Recombineering (Recombination-Engineering) und Kassettenaustauschverfahren. Die Anwendung solcher üblichen Methoden zur Durchführung der Erfindung ist hiermit umfasst.

5 Sequenzvariante

Die Erfindung umfasst die Anwendung von Nukleinsäuresequenzen, ein oder mehrere E1-Gene eines Adenovirus und/oder Telomerase kodieren. Die Nukleinsäuresequenzen sind bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- 10 a) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO. 1 oder SEQ ID NO. 5;
- b) ein Nukleinsäuremolekül, welches zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) komplementär ist,
- c) Ein Nukleinsäuremolekül, welches mit einer Nukleotidsequenz gemäß a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert (Hybridisierungsbedingungen sind einem Fachmann bekannt, und sind z. B. in Sambrook, Molecular Cloning, Ed. 1-3, Cold Spring Harbor, N.Y., beschrieben);
- 15 d) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine ausreichende Sequenzidentität aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz gemäß a), b) oder c) funktionsanalog zu sein,
- e) ein Nukleinsäuremolekül, das infolge des genetischen Codes zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) bis c) degeneriert ist; und
- 20 f) ein Nukleinsäuremolekül gemäß einer Nukleotidsequenz nach a) bis e), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) bis e) ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Anwendung einer

25 Nukleinsäuresequenz vorgesehen, die eine ausreichende Sequenzidentität aufweist, um mit der Nukleinsäuresequenz gemäß Punkt a), b) und/oder c) funktionsanalog zu sein. Im Sinne der Erfindung heißt, um zu den genannten Nukleotidsequenzen bzw. mit diesen Nukleotidsequenzen hybridisierenden Sequenzen funktionsanalog zu sein, dass die Sequenzvariante sicher und effektiv die gewünschte Immortalisierung der Chorionzellen

30 hervorrufen können. Funktionsanaloge Sequenzen im Sinne der Erfindung sind alle Sequenzen, die der Fachmann durch Routineversuche als gleichwirkend identifizieren kann. In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung weist das Nukleinsäuremolekül mindestens 60 %, vorzugsweise 70 %, bevorzugt 80 %, ganz besonders bevorzugt 90 %, Sequenzidentität zu einem Nukleinsäuremolekül gemäß Punkt a), b) und/oder c) auf.

35 Coexpression des CAR-Rezeptors

Nahezu alle bekannten Viren bedienen sich bei der Infektion von Säugerzellen der Hilfe von Oberflächen-Rezeptoren, die von diesen Säugerzellen natürlicherweise exprimiert werden und die im Kontext einer gesunden Zelle bestimmte physiologische Funktionen besitzen. Im Rahmen einer Infektion binden die Viren zunächst an die extrazellulären Anteile dieser meist membranständigen Rezeptoren und gelangen dann im Rahmen natürlicher Mechanismen (Endozytose) ins Innere der Zelle. Humane Adenoviren nutzen häufig den CAR-Rezeptor zur Infektion. Die natürliche Aufgabe des CAR-Rezeptors ist die Bindung an und die Kommunikation mit anderen Zellen. Die Höhe der Expression des CAR-Rezeptors in unterschiedlichen Geweben kann stark variieren, so findet man auf embryonalen Nervenzellen eine hohe Zahl von CAR-Rezeptoren, während sie bei adulten Nervenzellen kaum noch nachweisbar sind (Bergelson et al. Science 275 (5304): 1320–3).

Um Zelllinien zur Herstellung und Vermehrung von Adenoviren zu nutzen, ist es daher von Vorteil, wenn diese Zellen eine erhöhte Dichte von CAR-Rezeptoren an ihrer Oberfläche tragen. Durch die erhöhte Zahl von CAR-Rezeptoren steigt die Wahrscheinlichkeit, dass es bei physischen Kontakt eines Virus mit einer Wirtszelle zu einer Infektion kommt, so dass in der Folge geringere Menge von Viren nötig sind alle Zellen eines Kulturansatz zu infizieren. Wir konnten zeigen, dass sich die Infizierbarkeit von Zielzellen durch die konstitutive Expression des CAR-Rezeptors deutlich verbessern lässt.

Im Unterschied der Expression von E1-Genen, die für die Etablierung und Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes einer Zelle essentiell sind, besitzt die CAR-Rezeptor Expression keine Bedeutung für die Zelltransformation. Dadurch droht immer die Gefahr, dass das Gen bei Kultivierung und Vermehrung der Zelllinie wieder verloren geht.

Um einen Verlust des für die Infizierbarkeit einer Zelllinie hilfreichen CAR-Rezeptors zu verhindern, wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Expression des CAR-Rezeptors mit der Expression der E1-Gene in einer Weise verknüpft, die einen Verlust des CAR-Rezeptors weitgehend unmöglich macht.

Zum Ziel der Immortalisierung von Chorionzellen mit einem erhöhten CAR-Rezeptorbesatz, wurden daher das CAR-Rezeptorgen und die adenoviralen E1-Gene in einer Weise miteinander verknüpft, die sicherstellt, dass E1-Gene und der CAR-Rezeptor immer gemeinsam exprimiert werden. Dieses Ziel wird durch folgende Anordnung von Genen und expressionssteuerenden Elementen erreicht. Direkt unter dem Promoter (homologe Bereiche) liegt zunächst das Gen für den CAR-Rezeptor, das von dem vollständigen Genen der adenoviralen E1-Region gefolgt wird. Zwischen den beiden Genen liegt eine sog. *interribosomal entry site* (IRES-site). Wird diese Expressionskassette stabil in das Genom einer Wirtszelle eingebaut, erfolgt die Expression der Gene notwendigerweise immer gemeinsam, da zunächst nur ein sog. Primärtranskript (nur eine mRNA) gemacht wird, die

aber sowohl über den 5' untranslatierten Anteil der mRNA als auch über die IRES-Sequenz an das Ribosom binden kann, was dazu führt, dass aus nur einem mRNA Strang zwei verschiedene Proteine hergestellt werden. An Stelle einer sog. IRES-site können zum gleichen Ziel aus sog. selbstspaltenden Sequenzen eingeführt werden, die zu auch zur Expression zweier verschiedener Genprodukte führt (siehe Fig. 5).

AUSFÜHRUNGSBEISPIEL

Immortalisierung von Chorionzellen:

Es wurde zunächst ein Plasmid zur Synthese in Auftrag (gene art) gegeben, dass 1000 Basenpaare der upstream-Region und 1000 Basenpaare der downstream-Region des Gens für humanes p53 trägt. Zwischen diese beiden p53-flankierenden Sequenzen wurde im nächsten Schritt ein Genfragment aus dem Genom des humanen Adenovirus Serotyp 5 Genom gesetzt. Das Genfragment umfasst die Basenpaare 438 – 3510 des adenoviralen Wildtypgenoms. Am 5' Ende dieser Sequenz liegt ein kurzes Anteil des E1-A Promoters (Position 438 - 559) und ab Base 560 die für E1-Gene codierenden Anteile. Am 3' Ende wurde ein zusätzliche poly-Adenylierungssignal eingesetzt (poly-A aus bovinem Wachstumshormon). In Figur 6 wird das p53-Ad5-E1 (final)-Plasmid dargestellt.

Vor der Transfektion auf Chorionzellen wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten, wodurch unerwünschte Sequenzanteile (Ampicillin-Resistenz und die Ansatzstelle für bakterielle DNA-Polymerase, das sog. *origin of replication* (ori)) aus dem Plasmid herausfallen (siehe Plasmidkarte; Fig. 6). Die beiden Genfragmente wurden auf einem Agarosegel (0,8%) aufgetrennt und das gewünschte 5321 Basenpaar lange Segment herausgeschnitten und aufgereinigt.

Das Einbringen der DNA auf Chorionzellen erfolgte durch Calciumphosphat-Coprazipitation. Bei dieser Art der Transfektion wird die DNA in ein Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat eingebracht. Bei dieser Reaktion fällt Calciumphosphat als unlösliches Salz aus, das an seiner Oberfläche negativ geladene DNA Moleküle bindet. Die unlöslichen Calciumphosphat-DNA Komplex sinken unter dem Einfluss der Schwerkraft auf den Boden der Kulturschale auf die zu transfizierenden Zellen und werden über Endozytose in das Zytosol der Zelle aufgenommen und von dort in den Kern geschleust.

Präparation der Chorionzellen:

Als Quelle für primäre Chorionzellen dient zum einen überschüssiges Choriongewebe, das nach Chorionzottenbiopsie anfällt, als auch das im Rahmen eines natürlichen Abortes und der sich anschließenden humangenetischen Diagnostik anfallenden Gewebe.

Hierzu werden zunächst unter mikroskopischer Sicht und möglichst sterilen Bedingungen mütterliche Gewebe Anteile abpräpariert. Das Gewebe wird dann in Medium (DMEM) zunächst für ca. 30 Minuten einem enzymatischen Verdau mit Trypsin/EDTA (0,05%) und bevorzugt anschließend einem ca. 60 minütigem Verdau mit Collagenase unterzogen. Um
5 jeden Kontakt mit tierischen Produkten zu vermeiden, wird humanes recombinantes Trypsin (aus E.coli, Biozol), sowie recombinantes Collagen (aus Clostridium perfringens, Sigma-Aldrich) verwendet. Die Geschwindigkeit des enzymatischen Verdaus soll etwa alle 10 Minuten mikroskopisch kontrolliert werden, da eine zu lang andauernde Inkubation die Viabilität der Zellen herabsetzt und ein zu kurzer Verdau die Ausbeute verringert und nur eine
10 ungenügende Menge an Zellen aus dem Gewebeverband freisetzt. Durch leichte mechanische Irritation (Beklopfen des Falconröhrchens) kann der Vorgang der Zellfreisetzung unterstützt werden. Nun werden die in dieser Weise freigesetzten Zellen zweimal gewaschen und in DMEM-Kulturmedium (ohne tierische Zusätze) aber unter Zugabe von 30% humanem Serum kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel und die toten Zellen werden
15 abgetrennt, da sie das Wachstum der sich am Boden der Kulturschale anhaftende Zellen beeinträchtigen können.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt zunächst in 6-well Platten (9 cm^2 pro well). Nachdem die Chorionzellen ca. 70% konfluent gewachsen sind, wird $10\text{ }\mu\text{g}$ vorgeschchnittene DNA (nach EcoRI Verdau) durch Calciumtransfektion (in $200\text{ }\mu\text{l}$ Transfektionspuffer) gleichmäßig in das
20 Zellmedium eingetropft. Die Größe der Calciumkristalle kann unter dem Mikroskop kontrolliert werden (je kleiner umso besser). Nach 6 Stunden und nach 24 Stunden wird das Medium gewechselt und die Zellen jeweils einmal sanft mit Medium gewaschen. Lässt man das Transfektionsgemisch zu lange auf den Zellen, stirbt ein zu großer Teil der Zellen ab.

Nun werden die Zellen weiter kultiviert und nach ca. 1 x pro Woche gesplittet (1:3).
25 Chorionzellen wachsen nur langsam, allerdings erkennt man bereits nach 10 -14 Tagen, dass innerhalb der Gesamtpopulation kleine Herde von Zellen entstehen, die etwas kleiner erscheinen, sich aber durch eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit auszeichnen. Ohne Zugabe transformierender Agentien kann man Chorionzellen nur über 4-6 Passagen kultivieren, danach sistiert das Wachstum fast vollständig. Nach erfolgreicher Integration und
30 kontinuierlicher Expression von adenoviralen E1-Genen ist die Wachstumshemmung aufgehoben und der relative Anteil von erfolgreich transfizierten Zellen in der Zellkultur steigt kontinuierlich an.

6 Wochen nach Transfektion liegt der Anteil an E1-exprimierenden Zellen bei etwa 25%. Während dieser Zeit wird der Anteil an humanen Serum bei 30% gehalten.

35 Nun erfolgt eine Subklonierung der Zellen. Zu diesem Zweck werden die Zellen in einer 96-well Platte so stark verdünnt, dass bei mikroskopischer Kontrolle in einzelnen wells nur noch

eine Zelle nachweisbar ist. Um den Zellen in dieser Phase die Proliferation zu erleichtern, wird zur weiteren Kultivierung noch Zellkulturüberstand aus der Bulk-Kultur zugesetzt (der noch stimulierende Wachstumsfaktoren enthält). Unter diesen Bedingungen lässt sich aus einzelnen Zellen wieder ein kompletter Gewebeverband heranziehen.

- 5 Im nächsten Schritt wird alle 3 Wochen der Anteil an humanem Serum auf 20% und nach weiteren 3 Wochen auf 10%, dann auf 5%, auf 2,5% und schließlich auf 0% reduziert. Von diesem Zeitpunkt an werden die Zellen unter serumfreien Bedingungen in 293-SFM (life technologies) kultiviert.

- 10 Während des kontinuierlichen Serumentzugs verlangsamt sich zunächst das Wachstum der Zellen, dennoch fallen Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit einzelner Subklone auf. Die 10 am schnellsten wachsenden Subpopulationen werden kontinuierlich weiterkultiviert. Nach 6 Monaten liegt die Teilungsgeschwindigkeit der schnellsten Klone bei 24-36 Stunden und die Immortalisierung ist abgeschlossen.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

- 15 Die Erfindung wird anhand der Figuren beschrieben. Diese betreffen mögliche bzw bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung und beschränken den Umfang der Erfindung nicht.

- Figur 1:** Organisation des Adenovirusgenoms, Lage der frühen Gene. Die Abbildung zeigt ein Schema der Organisation eines Adenovirusgenoms. Üblicherweise unterteilt man das ca. 35000 Basenpaare lange Genom in 100 sog. Mapunits (mu). 1 mu misst entsprechend ca. 350 Basenpaare (bp). Die Gene der sog. E1-Region beginnen bei ca. 1,5 mu und enden bei ca. 10 mu, umspannen also (unter Einbeziehung der Promoter- und polyA-Region) einen Bereich von etwa 3500 bp. Da die Anwesenheit dieser Gene zu einer beschleunigten Degradation der beiden Tumorsuppressorgene p53 und Rb (Retinoblastomgen) führen, kommt es zu einer Beschleunigung des Zellzyklus und zur Transformation der Zelle.

- 25 **Figuren 2 und 3:** Anatomische Zuordnung des Chorion innerhalb einer humanen Plazenta. Das Choriongewebe ist darin gekennzeichnet.

- Figur 4:** Schema der homologen Rekombination: Das p53-Gen wird gegen das E1-Gen ausgetauscht, ohne dass die expressionssteuernden Elemente des p53-Locus verloren gehen. Auf diese Weise kann die nach Verlust des p53 Gens reflektorisch gesteigerte p53-Promotorleistung zur Expression des Transgens genutzt werden.

Figur 5: Die Nutzung einer *interribosomal entry site* (IRES) – Sequenz zwischen CAR-Rezeptorgen und E1-Gen erlaubt es die CAR-Rezeptorexpression zwingend an die des E1-

Gens zu koppeln. Auf diese Weise kann eine stabile CAR-Rezeptorexpression ohne Nutzung eines Selektionsmarkers sichergestellt werden.

Figur 6: Schematische Darstellung des p53-Ad5-E1 (final)- Plasmids.

PATENTANSPRÜCHE

1. Immortalisierte humane Chorionzelllinie.
2. Immortalisierte humane Chorionzelllinie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelllinie Nukleinsäuresequenzen umfasst, die ein oder mehrere E1-Gene eines Adenovirus kodieren.
3. Immortalisierte humane Chorionzelllinie nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die ein oder mehrere E1-Gene eines Adenovirus die E1a-, E1b1- und/oder E1b2-Gene sind.
4. Immortalisierte humane Chorionzelllinie nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelllinie Nukleinsäuresequenzen umfasst, die zu einer (bevorzugt kontinuierlichen) Expression des Cosackie und Adenovirusrezeptors (CAR-Rezeptors) führen.
5. Immortalisierte humane Chorionzelllinie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelllinie Nukleinsäuresequenzen umfasst, die humaner Telomerase kodieren.
6. Immortalisierte humane Chorionzelllinie nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Telomerase die Reverse-Transkriptase-(RT-)-Untereinheit des humanen Telomerase-Komplexes (hTERT) ist.
7. Immortalisierte humane Chorionzelllinie nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen, die ein oder mehrere E1-Gene eines Adenovirus und/oder Telomerase kodieren, im Genom integriert sind.
8. Immortalisierte humane Chorionzelllinie nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen, die ein oder mehrere E1-Gene eines Adenovirus und/oder Telomerase kodieren, im Genom an den Genort eines Tumorsuppressorgens (z.B. p53 oder Rb) integriert sind.
9. Immortalisierte humane Chorionzelllinie nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das Tumorsuppressorgen ausgeschaltet ist.
10. Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie, dadurch gekennzeichnet, dass humanes embryonales Choriongewebe als Ausgangsgewebe verwendet wird, welches mittels ein oder mehrere E1-Gene eines Adenovirus und/oder Telomerase immortalisiert wird.

11. Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zu adenoviralen-E1-Genen das Gen für den CAR-Rezeptor exprimiert wird.
12. Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das zur Immortalisierung verwendete Gen (z.B. adenovirus E1-Gene oder Telomerase) durch gezielte homologe Rekombination in den Genort eines Tumorsuppressorgens (z.B. p53 oder Rb) integriert wird.
13. Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das Tumorsuppressorgen durch das Integrationsereignis ausgeschaltet wird.
14. Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie nach dem vorhergehenden Anspruch, bei dem die expressionssteuernden Elemente des Tumorsuppressorgens erhalten bleiben.
15. Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die mit dem Verlust des Tumorsuppressorgens reflektorisch gesteigerte Promoterleistung zur Expression des Transgens (z.B. adenovirale E1-Gene oder Telomerase) genutzt wird.
16. Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Insertion des zur Immortalisierung verwendeten Gens DNA-Sequenzen verwendet werden, die homolog zu den das Tumorsuppressorgen flankierenden genomischen Arealen sind.
17. Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Ausgangsgewebe mittels einer Chorionbiopsie gewonnen wird.
18. Verfahren zur Herstellung einer immortalen Chorionzelllinie nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Ausgangsgewebe im Rahmen eines Spontanabortes anfällt und/oder einer humangenetischen Diagnostik gewonnen wird.
19. Immortalisierte humane Chorionzelllinie, hergestellt und/oder herstellbar durch ein Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche.

20. Verwendung der immortalisierten humanen Chorionzelllinie nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung rekombinanter Proteine.
21. Verwendung der immortalisierten humanen Chorionzelllinie nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung medizinischer Wirkstoffe.
22. Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine unter Verwendung einer immortalisierten humanen Chorionzelllinie gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche.
23. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelllinie eine geeignete Expressionskassette enthält, die ein oder mehreren E1-Gene eines Adenovirus und/oder eine Telomerase kodieren.
24. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das rekombinante Protein ein humanes Protein ist.
25. Verfahren zur Herstellung rekombinanter Adenoviren unter Verwendung einer immortalisierten humanen Chorionzelllinie gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche.
26. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der rekombinante Adenovirus einen E1/E3-deletierten Adenovirus ist.
27. Verwendung von Genen der adenoviralen E1-Region zur Immortalisierung einer Chorionzelle, wobei die Gene der adenoviralen E1-Region eine Sequenzidentität zu sog. E1-deletierten Adenoviren von weniger als 90%, bevorzugt weniger als 70% Sequenzidentität, weiterhin bevorzugt weniger als 50% Sequenzidentität, aufweisen, um das Risiko einer Rekombination zwischen den E1-deletierten Adenoviren und Genen der adenoviralen E1-Region zu minimieren.

Fig. 1

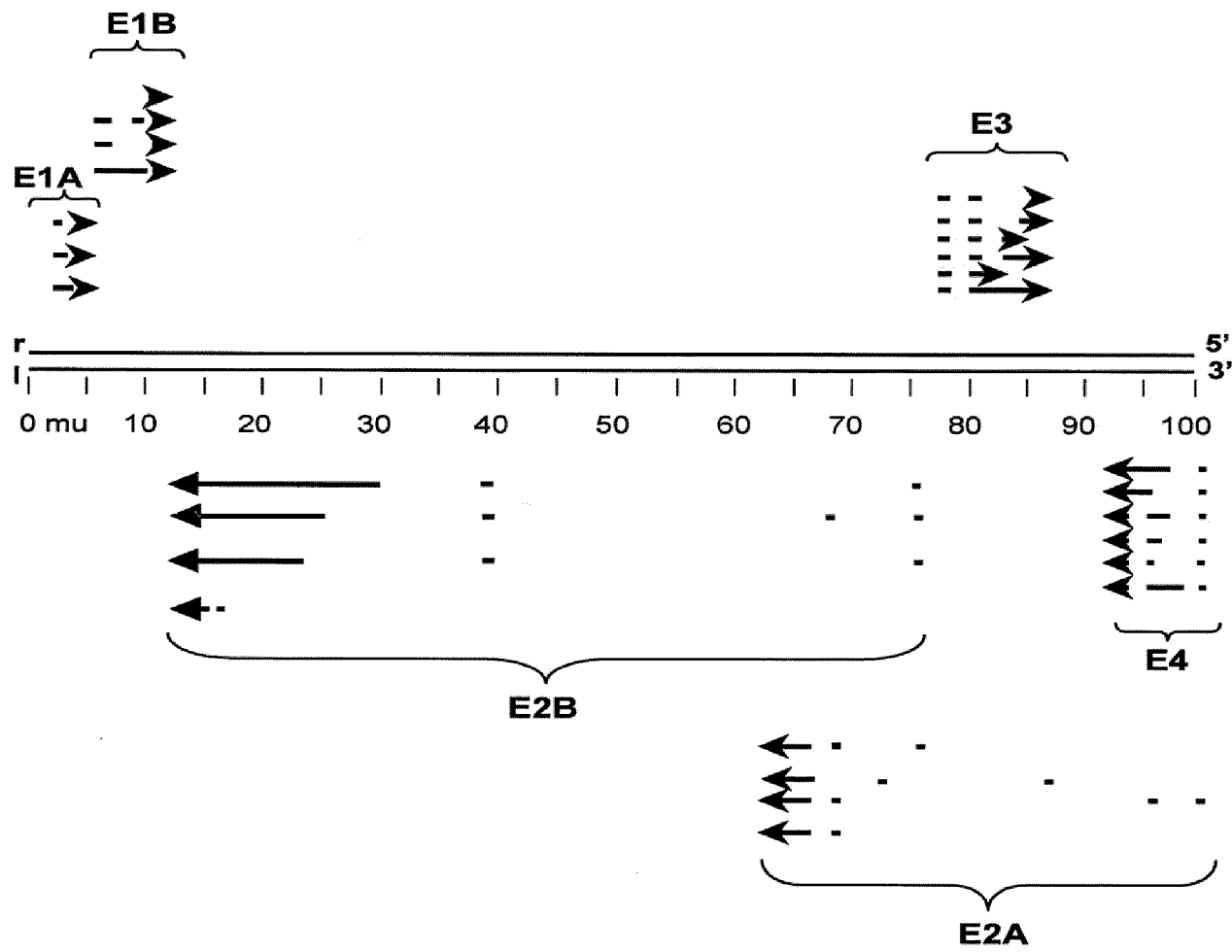


Fig. 2

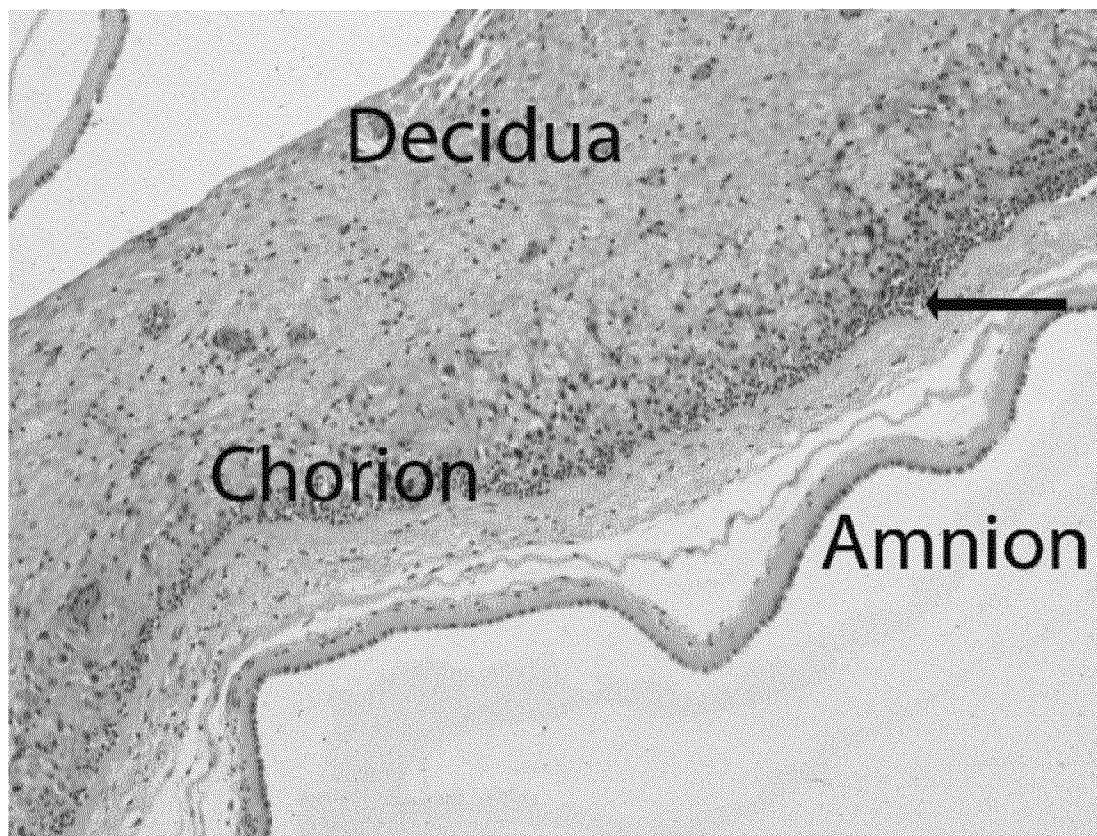


Fig. 3

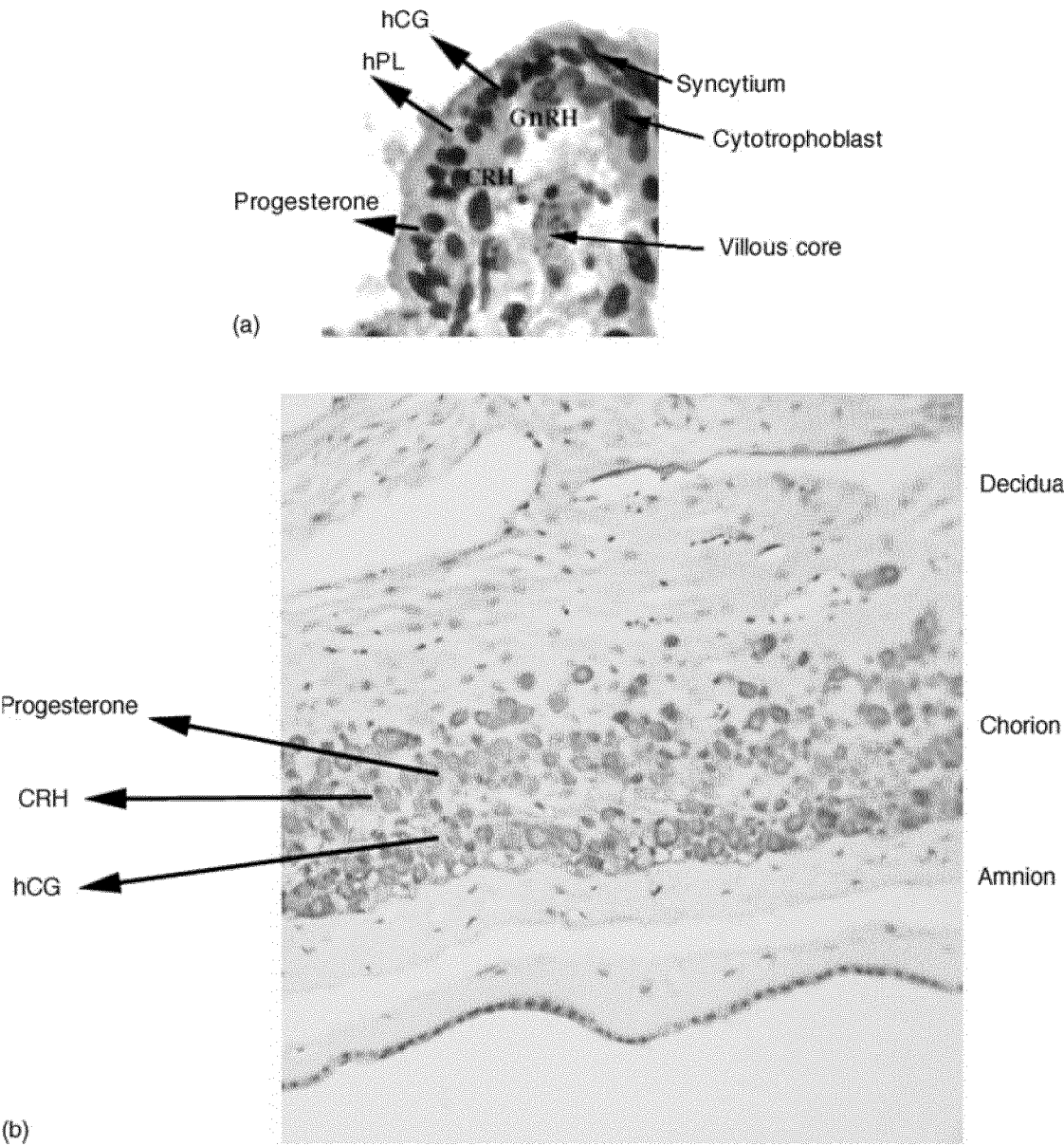


Fig. 4

**Deletion der p53-Funktion durch homologe Rekombination
unter Erhalt der p53-expressionsteuernden Sequenzen**

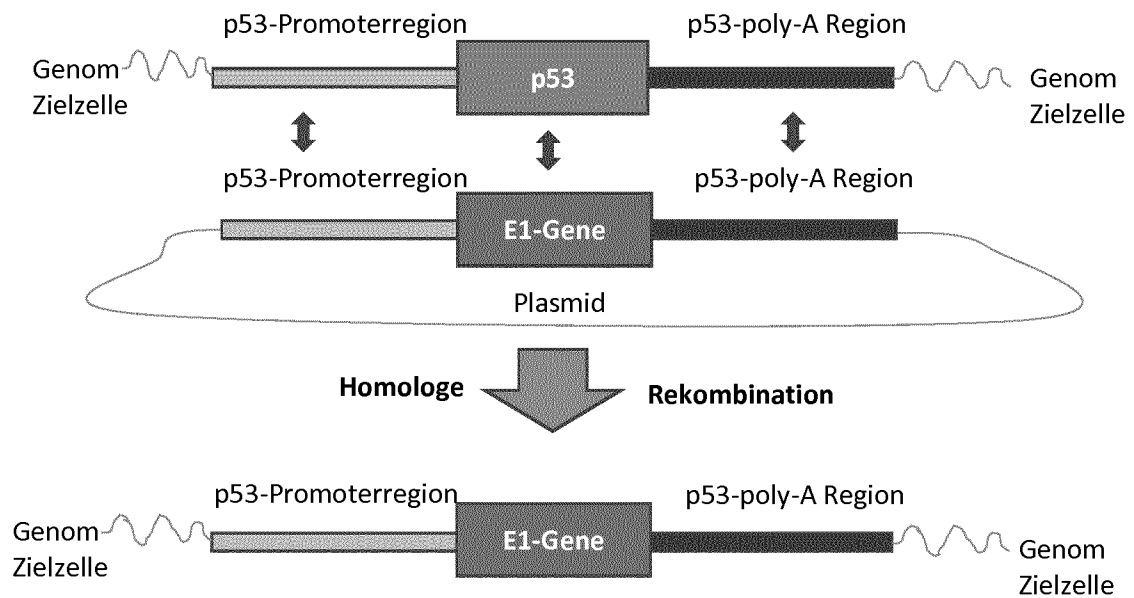


Fig. 5

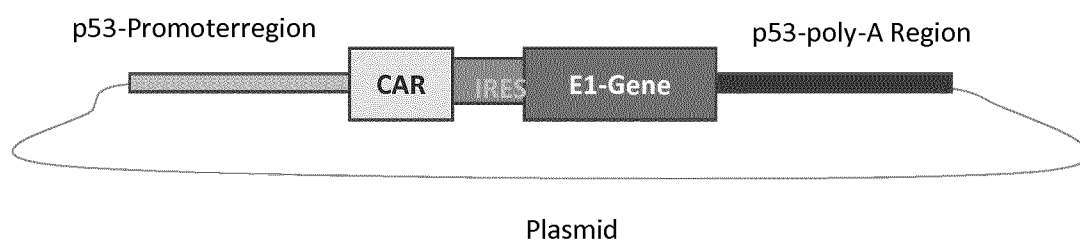
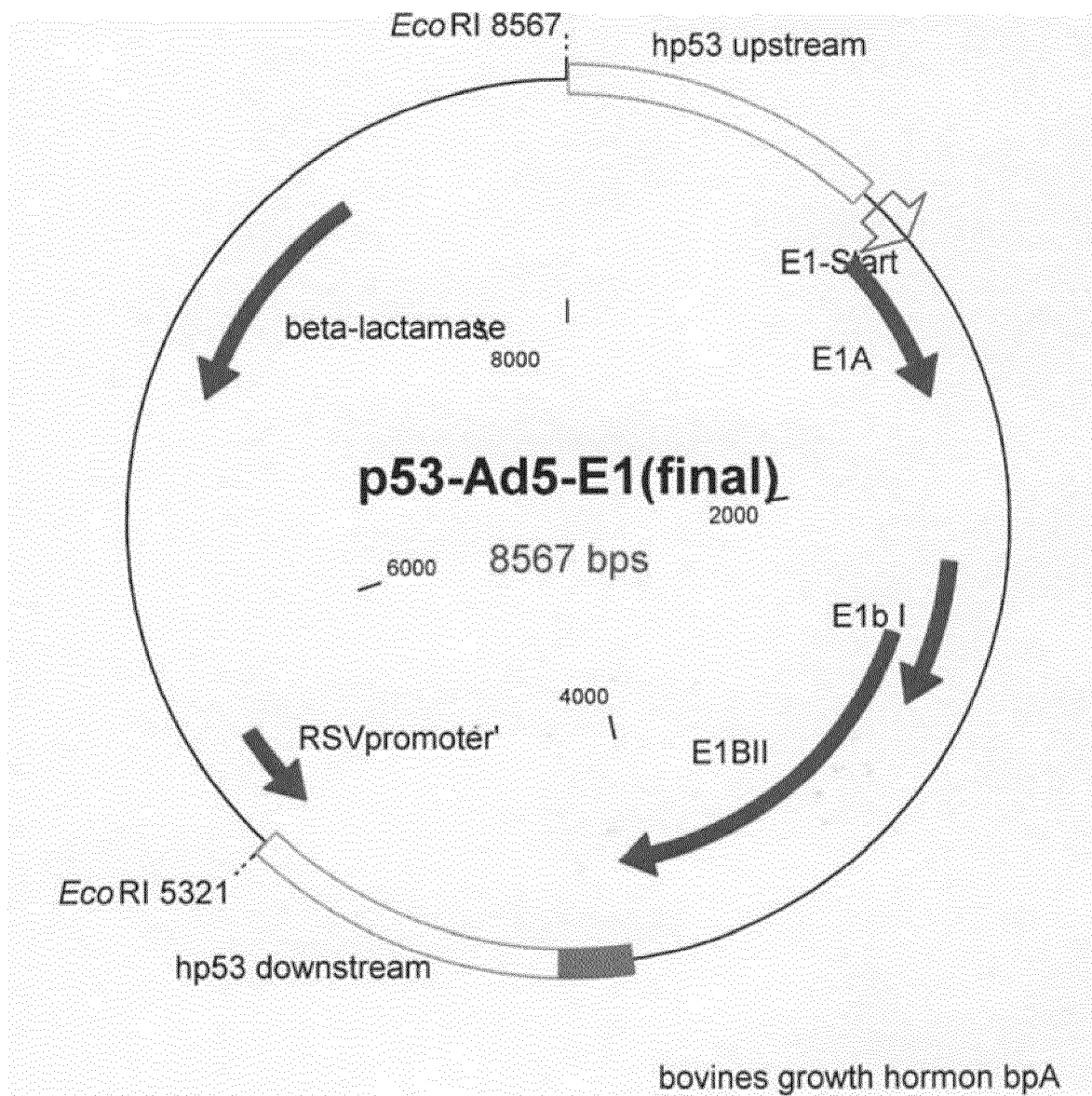


Fig. 6:



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/063866

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/073 C12N5/0797
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEI K J ET AL: "Immortalization of virus-free human placental cells that express tissue-specific functions", REGENERATIVE MEDICINE, FUTURE MEDICINE LTD, GB, vol. 6, no. 5, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 265-273, XP009179714, ISSN: 1746-0751 page 704, right-hand column, paragraph 2 page 709, right-hand column, last paragraph ----- -/--	1-27



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 2014

Date of mailing of the international search report

02/09/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Petri, Bernhard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/063866

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OLGA GENBACEV ET AL: "Establishment of Human Trophoblast Progenitor Cell Lines from the Chorion", STEM CELLS, 1 January 2011 (2011-01-01), pages N/A-N/A, XP055135246, ISSN: 1066-5099, DOI: 10.1002/stem.686	1
A	page 1428, right-hand column, paragraph 1-2	2-27
A	----- K Van Doren ET AL: "Efficient transformation of human fibroblasts by adenovirus-simian virus 40 recombinants", Molecular and Cellular Biology, 1 August 1984 (1984-08-01), pages 1653-1656, XP55135994, UNITED STATES DOI: 10.1128/MCB.4.8.1653 Retrieved from the Internet: URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6092928 page 1653, left-hand column, paragraph 2	1-27
A	----- SCHIEDNER GUDRUN ET AL: "Efficient and reproducible generation of high-expressing, stable human cell lines without need for antibiotic selection", BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB, vol. 8, no. 1, 12 February 2008 (2008-02-12), page 13, XP021035682, ISSN: 1472-6750 page 2, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph first page 6, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph first	1-27
A	----- WO 01/36615 A2 (KOCHANNEK STEFAN [DE]; SCHIEDNER GUDRUN [DE]) 25 May 2001 (2001-05-25) cited in the application page 3, lines 2-3 page 3, lines 13-15 page 9, line 9 - page 16, line 2	1-27
A	----- MUHAMMAD IRFAN MAQSOOD ET AL: "Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment", CELL BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 37, no. 10, 24 June 2013 (2013-06-24) , pages 1038-1045, XP55135713, ISSN: 1065-6995, DOI: 10.1002/cbin.10137 the whole document	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/063866

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0136615	A2	25-05-2001	AT 257512 T 15-01-2004
		AU 784003 B2	12-01-2006
		AU 1699001 A	30-05-2001
		CA 2391591 A1	25-05-2001
		CN 1433476 A	30-07-2003
		CZ 20021709 A3	14-08-2002
		DE 19955558 A1	07-06-2001
		DK 1230354 T3	22-03-2004
		EP 1230354 A2	14-08-2002
		ES 2211647 T3	16-07-2004
		HU 0203387 A2	28-12-2002
		IL 149291 A	26-11-2008
		JP 4456790 B2	28-04-2010
		JP 2003514526 A	22-04-2003
		PL 357495 A1	26-07-2004
		PT 1230354 E	30-04-2004
		TR 200400402 T4	22-03-2004
		WO 0136615 A2	25-05-2001

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C12N5/073 C12N5/0797
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 C12N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LEI K J ET AL: "Immortalization of virus-free human placental cells that express tissue-specific functions", REGENERATIVE MEDICINE, FUTURE MEDICINE LTD, GB, Bd. 6, Nr. 5, 1. März 2009 (2009-03-01), Seiten 265-273, XP009179714, ISSN: 1746-0751 Seite 704, rechte Spalte, Absatz 2 Seite 709, rechte Spalte, letzter Absatz ----- -/--	1-27



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. August 2014

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/09/2014

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Petri, Bernhard

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	OLGA GENBACEV ET AL: "Establishment of Human Trophoblast Progenitor Cell Lines from the Chorion", STEM CELLS, 1. Januar 2011 (2011-01-01), Seiten N/A-N/A, XP055135246, ISSN: 1066-5099, DOI: 10.1002/stem.686	1
A	Seite 1428, rechte Spalte, Absatz 1-2 -----	2-27
A	K Van Doren ET AL: "Efficient transformation of human fibroblasts by adenovirus-simian virus 40 recombinants", Molecular and Cellular Biology, 1. August 1984 (1984-08-01), Seiten 1653-1656, XP55135994, UNITED STATES DOI: 10.1128/MCB.4.8.1653 Gefunden im Internet: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6092928 Seite 1653, linke Spalte, Absatz 2 -----	1-27
A	SCHIEDNER GUDRUN ET AL: "Efficient and reproducible generation of high-expressing, stable human cell lines without need for antibiotic selection", BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB, Bd. 8, Nr. 1, 12. Februar 2008 (2008-02-12), Seite 13, XP021035682, ISSN: 1472-6750 Seite 2, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz first Seite 6, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz first -----	1-27
A	WO 01/36615 A2 (KOCHANNEK STEFAN [DE]; SCHIEDNER GUDRUN [DE]) 25. Mai 2001 (2001-05-25) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeilen 2-3 Seite 3, Zeilen 13-15 Seite 9, Zeile 9 - Seite 16, Zeile 2 -----	1-27
A	MUHAMMAD IRFAN MAQSOOD ET AL: "Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment", CELL BIOLOGY INTERNATIONAL, Bd. 37, Nr. 10, 24. Juni 2013 (2013-06-24) , Seiten 1038-1045, XP55135713, ISSN: 1065-6995, DOI: 10.1002/cbin.10137 das ganze Dokument -----	1-27

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/063866

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0136615	A2	25-05-2001	AT 257512 T 15-01-2004
		AU 784003 B2 12-01-2006	
		AU 1699001 A 30-05-2001	
		CA 2391591 A1 25-05-2001	
		CN 1433476 A 30-07-2003	
		CZ 20021709 A3 14-08-2002	
		DE 19955558 A1 07-06-2001	
		DK 1230354 T3 22-03-2004	
		EP 1230354 A2 14-08-2002	
		ES 2211647 T3 16-07-2004	
		HU 0203387 A2 28-12-2002	
		IL 149291 A 26-11-2008	
		JP 4456790 B2 28-04-2010	
		JP 2003514526 A 22-04-2003	
		PL 357495 A1 26-07-2004	
		PT 1230354 E 30-04-2004	
		TR 200400402 T4 22-03-2004	
		WO 0136615 A2 25-05-2001	
