



(12) Wirtschaftspatent

Ertollt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 259 635 A1

4(51) C 12 N 5/02  
A 61 K 39/395

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WPC 12 N / 301 810 7	(22)	14.04.87	(44)	31.08.88
------	----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschko-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Kopp, Joachim, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Körner, Ida, Dr. sc. nat.; Lange, Claudia, Dr. rer. nat. Dipl.-Biochem.; Lottmer, Rudolf, Dipl.-Chem., DD

(54)	Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes Interleukin-2
------	---

(55) Monoklonale Antikörper, humanes Interleukin-2, Affinitätskonstante, Spezifität, Immunisierung, Maus-Myelomzellen, Fusionierung, Zellkultur, Selektionierung, Klonierung, Hybridomklon

(57) Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden monoklonale Antikörper gegen humanes Interleukin-2 mit hoher Affinitätskonstante und hoher Spezifität hergestellt. Milzzellen von Mäusen, die mit humanem Interleukin-2 immunisiert wurden, werden mit Maus-Myelomzellen fusioniert. Die Hybridomzellen werden mit Hilfe immunchemischer Screeningverfahren selektiert und kloniert. Hinsichtlich ihrer Reaktivität mit dem Interleukin-2 werden die Eigenschaften der erhaltenen monoklonalen Antikörper bestimmt. Die Produktion der Antikörper durch die Hybridomklone wird entweder in vitro mit biotechnologischen Verfahren der Zellkultur oder in vivo in Ascitesform in Mäusen durchgeführt. Die spezifischen Hybridome wurden im ZI für Molekularbiologie (Liste 1987) unter den Nummern 0173 bis 0192 hinterlegt. Anwendungsgebiete sind die Medizin und Immunologie.

## Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen humanes IL-2 durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit humanem Interleukin-2, Fusion ihrer Milzzellen mit Myelomzellen, Selektion der erhaltenen Hybridome, Auswahl der spezifischen Hybridome und ihre Kultivierung bzw. Transplantation auf Mäuse in der Ascitesform, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Kultivierung bzw. Transplantation die Hybridome (ZIM-Liste 87) 0173 bis 0192 eingesetzt werden.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes Interleukin-2. Anwendungsgebiete sind die medizinische Diagnostik und die Immunologie.

## Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Humanes Interleukin-2 ist von essentieller Bedeutung für die Aktivierung, den Verlauf und Effekt einer immunologischen Reaktion. Es gewinnt zunehmend an Bedeutung für die Aufklärung immunregulatorischer Zusammenhänge und als immuntherapeutisches Agens. Diese Entwicklung geht einher mit der Notwendigkeit der Bestimmung von Interleukin-2 (IL-2) in einer zunehmenden Zahl von Proben sowohl bei der IL-2-Produktion als auch in Diagnostik und Therapie. Das fordert die Ablösung des z. Z. überwiegend praktizierten, sehr zeitaufwendigen und komplizierten biologischen Nachweissystems durch ein einfaches und schnelles Testsystem. Die Anwendung monoklonaler IL-2-Antikörper in einem quantitativen IL-2-Test, z. B. in einem Sandwich-ELISA-System, ist dabei die Methode der Wahl.

Bisher gibt es international 4 Gruppen, die monoklonale Antikörper (mAK) gegen humanes IL-2 produziert haben (K. A. Smith et al., J. Immunol. 131, 1808-1815 [1983], M. A. Cousin et al., Lymphokine Res. 4, 319-329 [1985], E. Brandt et al., Immunbiol. 172, 33-53 [1986] und A. Altmann et al., PNAS 81, [1984]). Fast alle Gruppen haben jeweils nur einen oder sehr wenig mAK erhalten und die Qualität der erhaltenen Antikörper sowie ihre Anwendbarkeit für verschiedene immunologische Methoden sind sehr unterschiedlich.

## Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, eine möglichst große Gruppe von mAK gegen humanes IL-2 mit geeigneten Affinitätskonstanten und hoher Spezifität herzustellen.

Zum Beispiel sollen die Antikörper sowohl zur Entwicklung rationeller, quantitativer IL-2-Testsysteme genutzt werden, die in der IL-2-Produktion, der medizinischen Diagnostik und immunologischen Forschung eingesetzt werden können, als auch zur Herstellung von effektiven Immunosorbentien für die immunaffinitätschromatografische Reinigung von IL-2. Die jeweils günstigste Kombination ergibt sich aus der spezifischen Aufgabenstellung.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlichen Eigenschaften gegen humanes IL-2 ist dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst in an sich bekannter Weise Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die — wegen der Aufgabe, möglichst viele verschiedene mAK zu erhalten — in verschiedenen Kombinationen mit gereinigtem humanem rekombinantem oder natürlichem IL-2, sowohl in löslicher Form als auch RP-18-Gebunden (Patent KÖRNER, I., DETTMER, R., KOPP, J., DD 235 027 A 1) und auf verschiedener Route appliziert (sowohl subkutan als auch intraperitoneal, direkt in die Milz oder als in vitro-Immunisierung), immunisiert wurden, mit entweder X63-Ag 8.653 oder P<sub>3</sub>O<sub>1</sub> Myelomzellen in der Zellkultur unter Zusatz von PEG 4000 fusioniert und die erhaltenen Hybridome in Mikrottestplatten aussät. Die Antikörperproduzierenden Hybridome werden mit einem Festphasen-ELISA-Testsystem nachgewiesen, der folgendermaßen durchgeführt wird: Hochgereinigtes Antigen (entweder rekombinantes bzw. natürliches humanes IL-2 oder natürliches Maus-IL-2) wird an Nitrozellulose- oder Mikrottestplatten adsorbiert, danach erfolgt eine Inkubation mit dem Kulturüberstand der Hybridome und anschließend mit Peroxydase-markierten affinitätschromatographisch gereinigten Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörpern. Die im ELISA reaktiven Hybridome werden kloniert, weiter vermehrt und ggf. nach Lagerung in flüssigem Stickstoff erfindungsgemäß zur Produktion der mAK durch Kultivierung oder Transplantation eingesetzt. Aus dem gewonnenen Ascites werden die mAK über Hydroxylapatit gereinigt und ihre Eigenschaften in verschiedenen Testsystemen bestimmt. Die für die erfindungsgemäße Antikörperproduktion eingesetzten Hybridome wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie (Liste 1987) unter folgenden Nummern hinterlegt: 0173 bis 0192 (siehe Tabelle)

Durch die Erfindung wird die Herstellung von vielen mAK mit unterschiedlichen Eigenschaften gegen humanes IL-2 ermöglicht. Eine solche Palette von Antikörpern hat bisher noch nicht zur Verfügung gestanden. Alle mAK erkennen spezifisch humanes IL-2 und reagieren nicht mit Maus-IL-2. Die meisten reagieren sowohl mit rekombinantem als auch mit natürlichem IL-2, einige jedoch nur mit natürlichem IL-2. Die mAK gehören den Immunglobulinklassen IgM, IgG 1 und IgG 2b an, haben teilweise neutralisierende Aktivität und unterschiedliche Affinität (höchste Affinität  $9 \times 10^9$  l/Mol), die meisten reagieren mit IL-2 nach SDS-Gel-Elektrophorese und anschließendem Blotting auf Nitrozellulose sowie in verschiedenen immunologischen Tests.

## Ausführungsbeispiel

1. Herstellung der Hybridome aus den Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit rekombinanten und natürlichem IL-2 auf verschiedenen Wegen unter Nutzung des Patentes DD 235027 A 1 immunisiert wurden und X63-Ag 8.653 bzw. P<sub>3</sub>O<sub>1</sub>-Myelomzellen.  
Fusion, Kultivierung, Klonierung usw. modifiziert nach der Originalarbeit KÖHLER, G. u. C. MILSTEIN, Nature 1975, 256, 435-437.
2. Die Selektion antikörperproduzierender Hybridome wurde nach DD 221 884 A 1 durchgeführt.
3. Die Eigenschaften der erhaltenen monoklonalen Antikörper werden durch Beispiele näher belegt.

Tabelle

Hinterlegungs- nr.	Bezeichnung	Reaktivität mit hu- manem IL-2		mit na- türlichem Maus-IL-2	Antikörper- klasse
		recomb.	natürlich		
173	ZI-HI A4C8	+	+	-	n.b.
174	ZI-HI A4G8	+	+	-	n.b.
175	ZI-HI	+	+	-	n.b.
176	ZI-HI A6	+	+	-	n.b.
177	ZI-HI A7	+	+	-	n.b.
178	ZI-HII 1	+	+	-	n.b.
179	ZI-K13H8	+	+	-	IgG1
180	ZI-K13E4	+	+	-	IgG1
181	ZI-12.1.	(+)	+	-	n.b.
182	ZI-10.2.	-	+	-	n.b.
183	ZI- 9.2.	-	+	-	n.b.
184	ZI-K15F7	+	+	-	Ig2b
185	ZI-K14H9	+	+	-	IgG1
186	ZI-K14A1	+	+	-	IgG1
187	ZI-K15B10	+	+	-	Ig2b
188	ZI-K15F12 <sup>†</sup>	+	+	-	Ig2b
189	ZI-HIA3A5	+	+	-	n.b.
190	ZI-HI A3B7	+	+	-	n.b.
191	ZI-HI A3B1	+	+	-	n.b.
192	ZI-HI A4H7	+	+	-	n.b.

<sup>†</sup> Affinitätskonstante  $9 \cdot 10^9$  l/Mol