

Brevet N° **83978**
 du 25 février 1982
 Titre délivré : **-7 JUIN 1983**

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Intellectuelle
 LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite: F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT (1)
 à 4002 BALE, Suisse, représentée par Monsieur Jacques de Muyser,
 agissant en qualité de mandataire (2)

dépose(nt) ce vingt-cinq février 1982 quatre-vingt-deux (3)
 à 15 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
"Antikörper gegen Proteine". (4)

2. la délégation de pouvoir, datée de BALE le 6 janvier 1982
 3. la description en langue allemande de l'invention en deux exemplaires;
 4. 11 planches de dessin, en deux exemplaires;
 5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,
 le 25 février 1982

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
voir au verso (5)

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
 (6) brevet déposée(s) en (7) Suisse
 le 27 février 1981 (No. 1343/81) et le 4 décembre 1981 (8)
 (No. 7773/81)

au nom de la déposante (9)
domicile
élu(élisent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
35, bld. Royal (10)

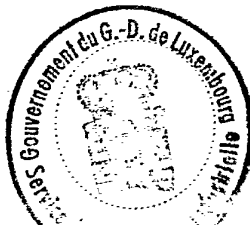
solicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les
 annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à 12 mois. (11)
 Le mandataire

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des
 Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

25 février 1982

à 15 heures



Pr. le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes,
 p. d.

1.- Theophil STAEBELIN, 34 Hangstrasse, à ARLESHEIM, Suisse

2.- Christian STÄHLI, 244 Giornicostrasse, à 4059 BÂLE, Suisse

3.- Vincenzo MIGGIANO, 18 Unterer Rheinweg, à BÂLE, Suisse

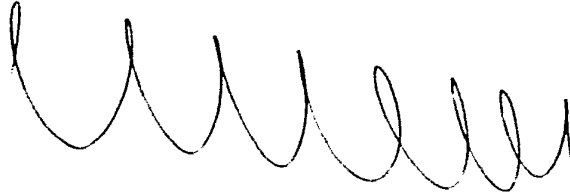
BEANSPRUCHUNG DER PRIORITÄT

der Patent/~~GB~~/ - Anmeldung

In: DER SCHWEIZ

Vom: 27. Februar 1981

Vom: 4. Dezember 1981



PATENTANMELDUNG

in

Luxemburg

Anmelder: F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT

Betr.: "Antikörper gegen Proteine".



RAN 4090/131

Antikörper gegen Proteine

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper gegen Proteine, und zwar gegen natürliche oder durch re-kombinierte DNS-Technik erhaltene humane Leukozyten-Interferone (HLI).

- 5 HLI ist möglicherweise ein wertvolles Therapeutikum zur Behandlung von neoplastischen und viralen Krankheiten. Die Evaluation dieser Substanz und ihre mögliche Entwicklung zu einem weitverbreiteten Medikament wird durch die Schwierigkeit, den Wirkstoff in der erforderlichen Weise
10 zu reinigen und zu charakterisieren, beeinträchtigt. Für die gewünschte Reinigung und die erforderliche Charakterisierung von HLI wäre ein Test, der sich in weniger als 24 Stunden durchführen lässt, eine wertvolle Hilfe.

- 15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde nun gefunden, dass sich zum Reinigen und Bestimmen von HLI in vorzüglicher Weise eine Kollektion von monoklonalen Antikörpern eignet, die gegen natürliche oder durch re-kombinierte DNS-Technik erhaltene Leukozyten-Interferone gerichtet sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft demnach eine Kollektion von monoklonalen Antikörpern, die dadurch gekennzeichnet ist, dass ihre Glieder gegen natürliche oder durch rekombinierte DNS-Technik erhaltene humane Leukozyten-
5 Interferone (HLI) gerichtet sind. | Unter einer Kollektion sind hierbei sowohl die Gesamtheit der Antikörper, sowie auch deren einzelne Glieder zu verstehen.

Nach einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden die monoklonalen Antikörper von verschiedenen
10 Hybridomen sezerniert.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung hat sich gezeigt, dass sich einzelne monoklonale Antikörper gegenseitig nicht inhibieren, d.h. gemeinsam an HLI binden, während sich andere gegenseitig inhibieren, d.h. nicht gleichzeitig an
15 HLI binden. Weiterhin hat sich gezeigt, dass die Kollektion aus Gruppen von monoklonalen Antikörpern besteht, deren Glieder verschiedene Epitope (antigenische Determinanten) von HLI erkennen.

Eine Eigenheit der Kollektion von monoklonalen Antikörpern gemäss vorliegender Erfindung besteht darin, dass
20 mindestens ein Antikörper HLI γ_3 nicht erkennt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung hat sich weiter gezeigt, dass die vorerwähnte Kollektion aus einer Gruppe von Antikörpern besteht, welche sich voneinander in ihren
25 Isotypen unterscheiden. 8 Antikörper zeigen IgG-Struktur, wogegen einer IgM-Struktur zeigt. Von den 8 Antikörpern mit IgG-Struktur haben 7 eine γ_1 schwere Kette und einer eine γ_{2b} schwere Kette.

Eine weitere Besonderheit der Kollektion von monoklonalen Antikörpern gemäss vorliegender Erfindung besteht darin, dass ein Antikörper (IgM) die antivirale Aktivität von humanem Leukozyten-Interferon nicht neutralisiert.
30

Wie bereits erwähnt, ist die Kollektion dieser monoklonalen Antikörper u.a. dadurch gekennzeichnet, dass sie aus Gruppen von Antikörpern besteht, deren Glieder verschiedene Epitope von HLI erkennen. Ein weiterer Aspekt
5 der vorliegenden Erfindung betrifft demnach die Verwendung von je einem Glied dieser Gruppe von Antikörpern für einen Festphasen-Sandwich-Test für HLI. Beim vorerwähnten Sandwich-Test wird ein Antikörper mit einem geeigneten Label versehen. Hierzu kommt jeder hierfür geeignete Label in
10 Betracht, doch wird ein radioaktiver oder ein Enzym-Label bevorzugt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von einem Antikörper aus der oben
15 erwähnten Kollektion zur Reinigung von HLI. Die Reinigung von HLI mittels des monoklonalen Antikörpers erfolgt vorzugsweise durch Affinitätschromatographie. Hierbei muss für eine Reinigung in kommerziellem Massstab die Affinität genügend hoch sein, damit das Interferon
20 auch bei grossen Volumina, die mit nicht zu kleiner Geschwindigkeit durch die Säulen fliessen, praktisch quantitativ zurückgehalten wird. Mit einem einzigen Antikörper ist dies nicht für alle Arten (Subklassen) von Interferon möglich. Hierzu eignet sich besonders eine
25 Kollektion von monoklonalen Antikörpern, deren einzelne Glieder gegen einzelne Subklassen von Interferon hohe Affinitäten aufweisen.

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper erfolgt
30 nach der an sich bekannten Zellfusionstechnik, bei der Myelomzellen mit Milz-Zellen von Mäusen, die mit HLI immunisiert wurden, fusioniert werden. Die erhaltenen Hybridome sezernieren monoklonale Antikörper gegen natürliche oder durch rekombinierte DNS-Technik erhaltene
35 Leukozyten-Interferone.

h

Die Durchführung des Festphasen-Sandwich-Tests zur Bestimmung von HLI kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen, doch konnte eine wesentliche Vereinfachung gefunden werden, indem im Gegensatz zu den bekannten Festphasen-Sandwich-Verfahren, unmarkierter und markierter Antikörper von Anfang an gemeinsam und nur einmal inkubiert werden.

Die Reinigung von HLI mittels eines monoklonalen Antikörpers kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen, wobei sich die Affinitätschromatographie als besonders geeignet erwiesen hat. Bei dieser Affinitätschromatographie wird vorzugsweise Affi-Gel 10 (BioRad Laboratories, Richmond, California) als Träger verwendet.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass nach dem Festphasen-Sandwich-Verfahren gemäss vorliegender Erfindung humanes Leukozyten-Interferon bis zu einer Konzentration von 2 U/ml im Serum nachweisbar ist.

Andererseits hat sich gezeigt, dass mit einem monoklonalen Antikörper gemäss vorliegender Erfindung durch rekombinierte DNS-Technik erhaltenes humanes Leukozyten-Interferon auf einfache Art und Weise derart gereinigt werden kann, dass es für klinische Versuche verwendbar ist.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

30

35

Beispiel 1

Herstellung der monoklonalen Antikörper

A) Interferon-Präparate

Teilweise gereinigtes humanes Leukozyten-Interferon
5 (IFL) war in genügender Menge zur Immunisierung der Mäuse
vorhanden. 5 IFL-Präparate werden verwendet:

a) IFL γ (a) Hauptpeak der Fraktion gemäss Stufe 8
von Tabelle 3 der DOS No. 29 47 134 mit einer ungefähren
Reinheit von 10-15% (abgeschätzt durch Natriumdodecyl-
10 sulfat-polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) und spezifischer
Aktivität im antiviralen Test;

b) IFL α ; c) IFL β ; d) IFL γ ; und e) IFL δ .

Die IFL α , β und γ Fraktionen bestehen je aus Gemischen
der individuellen (α_1 , α_2), (β_1 , β_2 , β_3) und (γ_1 , γ_2 , γ_3 ,
15 γ_4 , γ_5) Spezies. Dies sind Schulterfraktionen der ent-
sprechend gereinigten Spezies, welche von verschiedenen
Präparaten gepoolt werden (vgl. Stufe 9 von Tabelle 3 der
vorerwähnten DOS). Die IFL δ Fraktion stellt die Schulter
der δ -Spezies dar. Neben den Spezies α , β und γ an der
20 Lichosorb-Diolsäule (vgl. Stufe 8 von Tabelle 3 der vor-
erwähnten DOS) zeigt sich gelegentlich eine δ -Fraktion.
Diese wird wie in Stufe 9 gemäss Tabelle 3 der vorerwähnten
DOS gereinigt, wobei sich zeigt, dass die Spezies δ keine
Unterspecies zeigt und einheitlich ist. Die Reinheit von
25 b), c) und d) ist zwischen 20 und 40% gemäss spezifischer
biologischer Aktivität und gemäss Natriumdodecylsulfat-
polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Die Reinheit von e) ist
höchstens 5%.



Bestimmung von Interferon-Aktivität

Die Interferon-Aktivität wird mittels des "cytopathic-effect-inhibition" (CPE) Test gemäss U.S. Patentschrift No. 4 241 174 (Serial No. 963,256) bestimmt.

5 B) Immunisierung der Mäuse

3 Acht Wochen alte Balb c/J weibliche Mäuse werden
zuerst mit IFL $\gamma(a)$ in Freund's vollständigem Adjuvans
immunisiert. Jede Maus erhält ungefähr 150 μ g Gesamt-
protein enthaltend 20-25 μ g von Interferon in 0,25 ml
10 an 5 verschiedenen Stellen (0,05 ml in jede Stelle):
Subkutan in die linke und rechte Leistengegend und in die
linke und rechte Achselgegend sowie eine intraperitoneale
Injektion.

53 Tage später wird eine Zweitimmunisierung wie folgt
15 durchgeführt: Interferon IFL $\gamma(a)$ wird durch präparative
Natriumdodecylsulfat-polyacrylamid (15%) Gel-Elektrophorese
in drei 0,6x11 cm zylindrischen Gelen aufgetrennt.
Ungefähr 300 μ g Gesamtprotein in 0,3 ml (dialysiert gegen
Probenpuffer) enthaltend ungefähr 40-50 μ g von Interferon
20 werden pro Gel geladen. [Diese Reinigung erfolgt im
wesentlichen nach der Methode von Laemmli, U.K. (1970)
Nature 227, 680-685]. Nach der Elektrophorese werden die Gele
in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Diese werden während 10
Minuten in 0,5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (0,01 M
25 Kaliumphosphatpuffer, pH 7,3; 0,14 M Natriumchlorid)
enthaltend 0,1% Triton X-100 in Propylen-Röhrchen ein-
getaucht. Der Puffer wird in serienmässiger Verdünnung
nach dem CPE-Inhibitionstest nach Interferon-Aktivität
untersucht. Die Scheiben 6 und 7 (numeriert vom unteren Ende
30 jedes Gels) zeigen die höchste Interferon-Aktivität (je
ungefähr 25% der Aktivität des gesamten Gels). Je eine Scheibe
mit Höchstaktivität wird mit einer Rasierklinge auf einer

Glasplatte kleingeschnitten, in eine 1 ml Spritze enthaltend 0,2 ml 0,15 M Natriumchlorid transferiert und in jede Maus eingespritzt. Die Gelsuspension wird intraperitoneal injiziert, worauf 0,2 ml BCG (Bacillus Calmette-Guérin; 5 Serum Institut Bern) injiziert werden.

Nach 12 Tagen wird das Serum jeder Maus auf Interferon-Neutralisationsaktivität untersucht. Das Serum von Maus Nr. 3 zeigt eine 50%ige Neutralisation von 10 Einheiten/ml von IFL $\gamma(a)$ bei einer Verdünnung von 1:72 000, neutrali- 10 siert jedoch dieselbe Konzentration, von rohem IFL ($< 0,1\%$ Reinheit) sogar bei einer Verdünnung von 1:100 nicht. Die Mäuse Nr. 1 und Nr. 2 zeigen Neutralisationstiter von weniger als 1:1000 gegen IFL $\gamma(a)$.

70 Tage nach der zweiten Immunisierung erhält Maus 15 Nr. 3 an drei nacheinanderfolgenden Tagen eine intraperitoneale Booster-Injektion mit einem Gemisch von IFL α , β und γ enthaltend ungefähr 50 μg Interferon und 15 μl normales Mausserum als Trägerprotein (in 0,2 ml 0,15 M Natriumchlorid). 48 Stunden nach der letzten Injektion 20 wird die Maus getötet und die Milz zur Herstellung der monoklonalen Antikörper entfernt.

C) Zellkulturen und Zellfusionen

Die folgenden Materialien und Medien werden verwendet. Iscove's Modifikation von Dulbecco's modifiziertem 25 Eagle-Medium (IMDMEM) ist von Gibco erhältlich. Es wird frisch ergänzt mit Natriumpyruvat (1 mM), Glutamin (1,5 mM), 2-Mercaptoäthanol ($5 \times 10^{-5}\text{M}$), Penicillin (100 Einheiten/ml) und Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$). Vollständiges HAT Medium besteht aus so vervollständigtem IMDMEM sowie Hypoxanthin 30 (10^{-4}M), Aminopterin ($4 \times 10^{-7}\text{M}$), Thymidin ($1,5 \times 10^{-5}\text{M}$) und 15% foetales Kälberserum. Eine 50%ige (w/v) Lösung von



Polyäthylenglykol 4000 (PEG 4000, Merck) wird in IMDMEM hergestellt.

Die Fusion mit einer nicht-produzierenden Azaguan-
resistenten Myelomzell-Linie wird unter kleinen Modifi-
kationen nach der Methode von Stähli et al. in J. Immunol
Methods 32, 297-304 durchgeführt. In dieser Fusion wer-
den 48×10^6 kernhaltige Milzzellen mit 25×10^6 Myelomzellen
der Linie FO (Fazekas de St. Groth und Scheidegger in
J. Immunol. Methods 35, 1-25 (1980)) fusioniert. Die Milz-
zellen und Myelomzellen werden in serumfreien IMDMEM ge-
waschen. Sie werden dann im selben Medium resuspendiert
oben erwähnten Verhältnis für die Fusion gemischt und in
40 ml serumfreien IMDMEM in einem 50 ml konischen Poly-
propylen-Röhrchen bei 200 x g während 15 Minuten sedi-
mentiert gefolgt durch vollständiges Absaugen des Ueberstandes.
Zellsediment werden unter ständigem Rühren tropfweise (50%iges
PEG 4000 zugesetzt, um die Zellen zu resuspendieren
und zu verteilen. Nach ungefähr 90 Sekunden werden bei
Raumtemperatur unter ständigem Rühren während 4-5 Minuten
10 ml serumfreies IMDMEM tropfenweise zugegeben. Nach
weiteren 15 Minuten ohne Rühren werden grosse Zellklumpen
durch vorsichtiges Pipettieren mit einer 10 ml Pipette
getrennt. Das Fusionsgemisch wird mit vollständigem HAT
Medium auf 250 ml verdünnt und dann in 240 "Costar cluster
wells (1 ml/well)" gegeben, die bereits 1 ml komplettes
HAT Medium und 10^5 peritoneale Maus-Zellen als Nährschicht
enthalten. Die Kulturen werden in einer 5%igen $\text{CO}_2/95\%$
Atmosphäre bei 85% Feuchtigkeit inkubiert. Die Kulturen
werden zweimal in der Woche durch Ersetzen des halben
Mediums (1 ml) mit frischem HAT Medium gefüttert.

L

D) Auffinden von Interferon-spezifischen Hybridomen
durch einen Festphasen-Antikörperbindungstest (SABA)

Diese Methode ist adaptiert von dem von Catt and
Tregear [Science 158, 1570-1572 (1967)] beschriebenen
5 Prinzip und ist geeignet für das Auffinden von Hybridom-
Antikörpern (vgl. auch Stähli et al in J. Immunol.Methods
32, 297-304 (1980) sowie Kennet, R.H. in Current Topics in
Microbiology and Immunology, Vol. 81, S. 77-91 (1978)). Inter-
feronpräparate von IFL α , β , γ und δ werden individuell
10 in Polypropylen-Röhrchen mit phosphatgepufferter Kochsalz-
lösung (PBS) zu einer Endkonzentration von ungefähr 0,2 bis
0,5 μg Interferon/ml (ungefähr 1-3 μg Gesamtprotein per ml;
ausgenommen für IFL δ , wo ungefähr 10-15 μg von Gesamt-
protein per ml enthalten sind) verdünnt, um damit Poly-
15 vinyl-Chlorid Mikrotiter Platten (Cooke Laboratory Products
Division, Dynatech Laboratories, Inc.) wie bei Stähli et
al. loc.cit. zu beschichten. 50 μl der Interferonlösung
wird in jede Vertiefung gegeben und während mindestens
4 Stunden bei Raumtemperatur in einer befeuchteten Kammer
20 gelassen oder während 4°C während mehreren Wochen gehalten.
Vor dem Gebrauch werden die Vertiefungen mit 3%igem
Rinderserumalbumin (BSA) in PBS gefüllt und während 30 bis
60 Minuten so belassen, um alle Proteinbindungsstellen zu
blockieren. Die Platten werden dann viermal mit PBS ge-
25 waschen. 50 μl Ueberstand der Hybridomkulturen werden in je
zwei Vertiefungen während mindestens 4 Stunden bei Raum-
temperatur inkubiert. Kontrollversuche (unspezifische
Bindung) werden an Platten durchgeführt, die nur mit 3%igem
BSA beschichtet sind. Nach viermaligem Waschen mit PBS
30 wird zu jeder Vertiefung 50 μl Schaf-Anti-Maus Ig-Antikörper
(durch Affinitätschromatographie gereinigt und mit ^{125}I
markiert; 50 000 bis 100 000 cpm pro 20 bis 30 ng Antikörper
in PBS enthaltend 1% BSA) gegeben und während mindestens
4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten werden
35 vier- bis fünfmal mit PBS gewaschen und dann in die



einzelnen Vertiefungen geschnitten, welche dann in einem Gamma-Scintillations-Spektrometer auf Radioaktivität getestet werden.

E) Ergebnisse

5 a) Initialscreening durch Antikörperbindung (SABA)
gegen teilweise gereinigte IFL Fraktionen

152 der 240 Kulturen zeigen Wachstum von Hybridomen. Die Ueberstände werden auf Interferon-spezifische Antikörper im SABA Test geprüft, wenn die Kulturen ungefähr
10 20-30% konfluent sind (12-29 Tage nach der Fusion). Antikörperbindung wird parallel geprüft mit IFL α , IFL β , IFL γ und IFL δ . Von den 152 Kulturen zeigen 13 Ueberstände hohe Antikörperbindung gegen alle vier teilweise gereinigten Interferonpräparate. Das Medium von vier weiteren
15 Hybridomen zeigt niedrige Bindungsaktivität (3-4 mal grösser als unspezifische Bindung) gegen alle vier Interferonpräparate. Diese Kulturen werden verworfen. Die Medien aller anderen Hybridome (135 wachsende Kulturen) liefern unspezifische Bindungen gegen alle vier IFL Präparate. Von
20 den 13 spezifischen Hybridomen werden für die vorliegende Erfindung 9 repräsentative charakterisiert. Ihre Bezeichnung ist LI-1, LI-2, LI-3, LI-5, LI-6, LI-7, LI-8, LI-9 und LI-12.

Wie aus Figur 1 ersichtlich ist, zeigt die Antikörperbindung der 9 spezifischen Hybridome zu den 4 teilweise
25 gereinigten Interferonpräparaten ein unterschiedliches Verhalten. LI-1, LI-2, LI-3, LI-5, LI-6, LI-7 und LI-8 zeigen eine identische Charakteristik mit der folgenden Bindungsreihenfolge: IFL α < IFL δ < IFL γ < IFL β . Für LI-9 ist die Bindungsordnung IFL δ < IFL γ < IFL β . LI-12
30 ist verschieden von allen übrigen.

h

b) Antikörperbindung (SABA) gegen hoch gereinigtes Leukozyten-Interferon

Sechs gereinigte ($\geq 80\%$ rein) Interferonspezies (vgl. Stufe 9 von Tabelle 3 der DOS 29 47 134) werden durch
5 Adsorption an Polyvinylchlorid Mikrotiterplatten immobilisiert. Es handelt sich dabei um IFL α_1 , α_2 , β_2 , γ_2 und γ_3 sowie um IFL-K der Zell-Linie KG-1 [Koeffler, H.P. et al. Science 200, 1153-1154 (1978)], welches in Analogie zu den
10 Stufen 1 bis 9 von Tabelle 3 der erwähnten DOS gereinigt wird. Da in den Stufen 8 und 9 keine klare Trennung in individuelle Spezies zu beobachten war, wurde die Hauptfraktion mit der Interferonaktivität gepoolt. Sie stellt
15 deshalb ein Gemisch verschiedener Spezies dar. Die Adsorption von Interferon (50 μ l/pro Vertiefung) wird über Nacht bei ungefähr 0,5 μ g Interferon und 2 μ g BSA pro ml PBS gefolgt durch Abblocken der Proteinbindungsstellen mit 3%igem BSA wie vorhergehend beschrieben, durchgeführt.

Die Antikörperbindung mit Kulturmedium der 9 spezifischen Hybridome gegen die 6 verschiedenen,
20 gereinigten Interferone wird in Figur 2 gezeigt. Es können wiederum verschiedene Gruppen von Antikörpern mit unterschiedlichem charakteristischem Bindungsverhalten unterschieden werden. Die Gruppe 1 umfasst die Antikörper LI-1 und LI-2, die identische Bindungscharakteristik haben, die
25 jedoch IFL γ_3 nicht erkennen. Die Gruppe 2 umfasst die Antikörper LI-3, LI-5, LI-6, LI-7 und LI-8 mit einer möglichen Unterscheidung von zwei Subgruppen. Subgruppe 2a (LI-3, LI-5 und LI-6) zeigt überall höhere Bindung (Figur 1 und Figur 2), als Subgruppe 2 b (LI-7 und LI-8), wobei die letztere Sub-
30 gruppe relativ stärker an gereinigtes IFL α_1 und IFL-K bindet als die erstere. Nach dem Interferonbindungsverhalten der verbleibenden Antikörper gemäss Figur 2 und Figur 3 hat LI-9 die meisten Charakteristika der Subgruppe 2b. LI-12 scheint wiederum für sich einzigartig zu sein.

h

Im Hinblick auf die Tatsache der hohen Antikörperbindung zu unterschiedlich gereinigten Interferonen sehr unwahrscheinlich, dass irgendeiner dieser Antikörper nicht gegen Interferon, sondern gegen Kontaminanten gerichtet wäre. Dies wird für die meisten dieser Antikörper auch durch die Fähigkeit gezeigt, die biologische Aktivität von Interferon zu neutralisieren. LI-1, LI-3, LI-5, LI-6, LI-7, LI-8 und LI-9 heben die durch Interferon induzierte Inhibition des viralen CPE an Zellen auf. Die Interferonneutralisierung wird mit teilweise gereinigtem IFL $\gamma(a)$ und/oder gereinigtem IFL γ_1 , IFL α_2 und rohem Leukozyten-Interferon getestet. Keiner der Antikörper war in der Lage, rohes Leukozyten-Interferon zu neutralisieren. LI-12 neutralisiert 15 der getesteten Interferone (vgl. hierzu Tabelle 1). Die Fähigkeit der erfindungsgemässen Antikörper, durch kombinierte DNS-Technik erhaltene Interferone mit hoher Affinität zu binden, geht aus der Tabelle 6 hervor.

2) Isotypen der schweren und leichten Ketten
20 monoklonalen Interferon-Antikörper

Monoklonale Antikörper von Hybridom-Kulturbedingungen werden zuerst an Interferon-beschichtete Mikrotiterplatten gebunden, wie dies vorgängig für den SABA Test beschrieben wurde. Nach dem Waschen werden sie mit Isotyp-spezifischen Kaninchen Anti-Maus Ig Antiserum (Nordic) inkubiert. Nachweis wird Ziegen Antikaninchen IgG verwendet, welches mit Meerrettich-Peroxidase markiert ist. Als Enzymsubstrat werden 2,2'-Azino-di-(3-äthyl-benzothiazolin-sulfat) und Wasserstoffperoxid verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1, zweite Kolonne, zusammengefasst. Sieben 30 geprüften Antikörper haben die Immunglobulinketten einer γ_{2b}/k und einer μ/k . Alle sieben γ_1/k Antikörper wie auch der γ_{2b}/k neutralisieren Interferon, wogegen μ/k Interferon nicht neutralisiert, wie ebenfalls in Tabelle 1 ersichtlich.

3) Klonieren und Stabilisieren der Interferon-spezifischen Hybridome

Zur Herstellung stabiler Hybridom-Linien werden alle 9 spezifischen Hybridome durch limitierende Verdünnung in Mikrotiterplatten mit Maus-peritonealen Zellen als Nährschicht kloniert [Hengartner H. et al. in Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 81, 92-99 (1978)]. Das Klonieren wurde zum Zeitpunkt des Transfers der Originalkulturen in Flaschen oder kurz danach begonnen. Die Klone wurden mit dem SABA Test gegen IFL β getestet. Die Ergebnisse dieses ersten Klonierens der 9 Hybridome wird in Tabelle 2 gezeigt.

Von jedem Hybridom werden zwei bis vier stark positive Klone hochgezüchtet und sowohl i.p. in Mäuse injiziert für Ascites Produktion als auch gefroren. In den meisten Fällen werden die ausgewählten Klone eines Hybridoms zur Vereinfachung und Reduktion der Arbeit gepoolt. Von allen 9 Hybridomen erhält man Ascites Flüssigkeit für die Produktion von Antikörpern im grossen Masstab. Ascites-Zellen werden ebenfalls in Kulturen transferiert und gefroren.

4) Gruppierung der Antikörper nach ihrer Interaktion mit HLI

Die Hauptgruppe der sieben Hybridome, die γ_1/k Immunglobuline produzieren, kann in zwei Gruppen unterteilt werden aufgrund ihrer Antikörper-Interaktion mit gereinigten Interferonen. Die erste Gruppe (LI-1 und LI-2) erkennt gereinigtes IFL γ_3 nicht, wogegen die zweite Gruppe (LI-3 und LI-5 bis LI-8) IFL γ_3 erkennt. Die relative, quantitative Bindung der monoklonalen Antikörper an sechs



unterschiedliche, gereinigte Interferone (vgl. Figur 2) und die Unterscheidung zwischen neutralisierenden und nicht-neutralisierenden Antikörpern liefert Information zur Unterscheidung unterschiedlicher Epitope (antigenische Determinanten) von HLI und zur Aufzeigung von strukturellen Unterschieden zwischen unterschiedlich gereinigten Interferonen. Vom Bindungsverhalten der Antikörper (vgl. Figur 2) ist klar, dass LI-1 und LI-2 eine andere Struktur als alle anderen Antikörper erkennen und dass IFL γ_3 strukturell verschieden ist von allen anderen getesteten Interferonen, da es das von LI-1 und LI-2 erkannte Epitop nicht aufweist. LI-12, ein nicht-neutralisierender Antikörper, erkennt mit ungefähr gleicher, obwohl vielleicht geringerer Affinität, eine weniger variable Determinante, welche in allen getesteten Interferonen vorhanden ist. Die Ergebnisse hinsichtlich der Antikörperbindung und der Interferonneutralisation lassen erkennen, dass mindestens drei verschiedene Epitope von HLI durch die Kollektion der monoklonalen Antikörper erkannt und definiert werden können.

Beispiel 2

Bestimmung von Interferon

1) Auswahl eines geeigneten Paares von monoklonalen Antikörpern

Zur Unterscheidung zwischen kompetitiver Bindung von zwei Antikörpern an dasselbe Epitop und additiver Bindung an verschiedene Epitope wird die Bindung der Antikörper allein und in Paaren und in allen möglichen Kombinationen an immobilisiertem Interferon getestet. Ueberstände von konfluenten Hybridom-Kulturen werden ohne weitere Reinigung als Antikörperquelle verwendet. Teilweise gereinigtes

- Leukozyten-Interferon (20-30% reines IFL β) wird in begrenzten Mengen (0,1 bis 0,2 μg Interferon/ml) auf Polyvinylchlorid Mikrotiterplatten gegeben, wie dies in Beispiel 1 für den SABA beschrieben wird. Es folgt das
- 5 Abblocken aller Proteinbindungsstellen mit 3%igem BSA. 50 μl Antikörperlösung bestehend aus je 25 μl zweier Kulturüberstände oder 2x25 μl desselben Antikörpers werden während 7 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten werden mit PBS (0,01 M Kaliumphosphat, pH 7,3; 0,14 M
- 10 Natriumchlorid) gewaschen und während 5 Stunden mit einem Ueberschuss von ^{125}I markiertem Schaf-Anti-Maus-Ig Immunglobulin in einem Volumen von 50 μl pro Vertiefung inkubiert, um die Menge von monoklonalen Antikörpern, die an Interferon gebunden sind, zu messen (Tabelle 3). Die Bindung zweier
- 15 Antikörper wird als additiv betrachtet, wenn die Bindung dieser Antikörper diejenige mit 50 μl des höher bindenden einzelnen Antikörpers übersteigt. Aufgrund dieses Kriteriums wurde gefunden, dass LI-1 mit fast allen anderen Antikörpern additiv bindet und dass LI-9 die beste additive Bindung
- 20 mit LI-1 gibt.

- LI-1 und LI-9 von Ascites-Flüssigkeit werden nach Standardmethoden, d.h. durch Ammoniumsulfatfällung (50%ige Sättigung) und DEAE-Zellulosechromatographie bis
- 25 mindestens zu 90% gereinigt, wie dies durch Natriumdodecylsulfat-polyacrylamid Gel Elektrophorese beurteilt wird. 20 μg jedes Antikörpers werden mit ^{125}I nach der Chloramin-T-Methode zu einer spezifischen Aktivität von ungefähr 20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ markiert. Freies Jod wird von markiertem Antikörper durch Gelfiltration an Sephadex G-25
- 30 in Gegenwart von PBS und 1% BSA getrennt.
- 

Unmarkierte Antikörper LI-1 und LI-9 zu ungefähr 20 µg pro ml PBS werden über Nacht an PVC-Mikrotiterplatten (Cooke Laboratory, Products Division, Dynatech Laboratories Inc.) adsorbiert (100 µl/Vertiefung). Während 30 bis 5 60 Minuten werden alle Proteinbindungsstellen mit 3%ige BSA in PBS blockiert. Gereinigtes Leukozyten-Interferon der KG-1 myeloiden Zell-Linie bei einer Konzentration von 10 Einheiten/100 µl PBS und 1%iges BSA werden zusammen mit einem der ¹²⁵I markierten Antikörper ($1,3 \times 10^5$ cpm) in 10 Antikörper-beschichteten Vertiefungen inkubiert. Kontroll-vertiefungen enthalten markierten Antikörper, aber kein Interferon. Nach Inkubation während 3 Stunden bei Raumtemperatur wird die Flüssigkeit entfernt und die Vertiefungen der Platten viermal mit PBS gewaschen und dann 15 in einem Gamma-Scintillations-Spektrometer auf Radioaktivität getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt. Kombination von LI-1 mit LI-9 gibt Interferon-abhängige sandwich-artige Antikörperbindung. Die bessere Kombination ist immobilisierter LI-9 mit markiertem LI-1 in Lösung. 20 Aus diesem Grunde sind die weiteren Experimente mit immobilisiertem LI-9 und markiertem LI-1 durchgeführt.

a) Einstufeninkubationsverfahren

Jede Vertiefung einer PVC-Mikrotiterplatte wird 100 µl LI-9 (15 µg/ml in PBS) bei Raumtemperatur über 25 oder bei 4°C während Tagen oder Wochen in einer befeuchteten Kammer beschichtet. Vor Gebrauch wird die Lösung von LI-9 entfernt und die Vertiefungen werden mit 3%igem BSA wässert. 30 bis 60 Minuten gefüllt und dann viermal mit PBS gewaschen. Ungefähr 140 000 cpm ¹²⁵I markierter LI-1 (ungefähr 4 ng, spezifische Aktivität ungefähr 20 µCi/µg) in 30 0,1 ml PBS enthaltend 1%iges BSA und 100 bis 150 µg humanes IgG pro ml werden in jede Vertiefung gegeben. Entsprechend verdünnte Interferonlösungen (1-20 µl) werden in die Vertiefungen gegeben und durch kurzes Schütteln gemischt. 35 bis 3 stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die

keit auf Absorptionpapier abgegossen. Die Platte wird vier- bis fünfmal mit PBS gewaschen und die einzelnen Vertiefungen werden in einem Gamma-Scintillations-Spektrometer auf Radioaktivität getestet. Bei höheren Interferonkonzentrationen (> ca. 5000-6000 U/ml) tritt eine partielle Inhibition auf. Die erhaltenen Resultate sind in Figur 3 und Tabelle 5 wiedergegeben.

b) Zweistufeninkubationsverfahren

LI-9 beschichtete und BSA-gesättigte PVC-Mikrotiterplatten werden wie vorgehend beschrieben hergestellt. 50 µl pro Vertiefung einer Interferonlösung in PBS enthaltend 1%iges BSA werden während 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, worauf die Platten viermal mit PBS gewaschen werden. Darauf werden 50 µl ^{125}I LI-1 (ungefähr 150 000 cpm/4 ng) PBS enthaltend 1%iges BSA und 150 µg humanes IgG per ml in jede Vertiefung gegeben, worauf die Platten während 2 Stunden bei Raumtemperatur gehalten werden und dann viermal mit PBS gewaschen und wie oben erwähnt auf Radioaktivität getestet werden. Die erhaltenen Resultate sind in Figur 4 wiedergegeben. Im Gegensatz zum Einstufenverfahren zeigt sich keine partielle Inhibition bei hoher Interferonkonzentration.

h

c) Bestimmung von antiviral inaktiviertem Interferon

Hitzeinaktivierung von Interferon

Eine Lösung (2,4 µg/ml) von Interferon A (Goeddel et al., Nature Vol. 290, März 1981) in "Eagle's minimal essential medium" enthaltend 10% foetales Rinderserum und 1 mg/ml Rinderserumalbumin wird mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (0,14 M NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl, 0,9 mM CaCl₂ und 0,5 mM MgCl₂) 1:480 verdünnt. Die verdünnte Lösung enthält Interferon A in einer Konzentration von 5 ng/ml. Nach Erhitzen auf 65°C während einer bestimmten Zeit werden 0,14 ml Proben bis zur Bestimmung in einem Eisbad gehalten. Sowohl die antivirale wie die immunologische Bestimmung werden am selben Tag durchgeführt. Von den 0,14 ml Proben werden 0,1 ml für das Radioimmunverfahren und 10 µl für die antivirale Bestimmung (im Doppel) verwendet. Das Radioimmunverfahren erfolgt nach dem unter B. beschriebenen 2-Stufen-Inkubationsverfahren. Die antivirale Bestimmung erfolgt nach dem CPE-Inhibitionstest. Die erhaltenen Resultate sind in Figur 6 wiedergegeben. Aus diesem Beispiel geht hervor, dass das Antikörperpaar Li 1/Li 9 antiviral aktives und antiviral inaktives Interferon unterscheiden kann. Aus der Figur geht weiterhin hervor, dass die antivirale Aktivität und die Immunreaktivität gleichzeitig abnehmen.

d) Hochempfindliche Interferonbestimmung in Humanplasma oder Serum (Radioimmunverfahren)

Es wird eine einzige Inkubation von 0,1 ml 40%igem Humanplasma oder Serum (neutraler pH) enthaltend ungefähr 250 000 cpm (1,5 ng) ¹²⁵I LI-1 (spezifische Aktivität 100 bis 110 µCi/µg LI-1) bei Raumtemperatur während 14 bis 16 Stunden in PVC-Mikrotiterplatten durchgeführt, welche wie vorgehend beschrieben mit LI-9 beschichtet sind. Nach viermaligem Waschen mit PBS werden die Vertiefungen wie vorhergehend erwähnt gezählt. Es wird ein Experiment mit



Interferon durchgeführt, das zu Citratplasma eines gesunden Probanden zugegeben wird. Jede 0,1 ml PBS-Testmischung enthält 40 µl Plasma, 1,3 ng ^{125}I LI-1 (256 000 cpm) und verschiedene Mengen von rohem humanem Leukozyten-Interferon (ungefähr 0,1% rein) von chronisch myelogenen Leukämiezellen. Die Resultate sind in Figur 5 wiedergegeben, wo der Anteil an Interferon als Abszisse aufgetragen ist. Als rohes Leukozyten-Interferon wird Inkubationsmedium gemäss Stufe 1 von Tabelle 3 der DOS No. 29 47 134 verwendet.

10

Beispiel 3

Hochempfindliche Bestimmung von Interferon in Patientenserum (Enzym-Immunverfahren)

In die entsprechende Anzahl Teströhrchen (10 x 75 mm) werden je 0,05 ml Testlösung (0,1 mol/l Natriumphosphat, pH 6,5 mit 10 g/l BSA und 0,5 µg/ml monoklonales LI-1 Anti-Interferon-Peroxidase-Konjugat in Interferon-freiem Humanserum) pipettiert, 0,2 ml der zu analysierenden Patientenplasmen respektive der Interferon-Standards (0 U/ml, 12,5 U/ml, 25 U/ml und 50 U/ml Interferon) und des Interferon-Kontrollserums (z.B. 30 U/ml Interferon) zugemischt, je eine mit monoklonalem LI-9 Anti-Interferon-beschichtete Polystyrolkugel ($\varnothing = 6,5$ mm) zugefügt und bei Raumtemperatur (18-26°C) während 16 Stunden inkubiert. Anschliessend werden die Polystyrolkugeln dreimal mit je 2 bis 5 ml destilliertem Wasser gewaschen, in je 0,5 ml Substratpuffer für die Aktivitätsbestimmung der Peroxidase (0,1 mol/l Kaliumcitratpuffer vom pH 5,0 mit 6 mmol/l H_2O_2 und 20 mmol/l o-Phenylendiamin) transferiert und während 30 Minuten bei Raumtemperatur (18 - 26°C) inkubiert. Zum Abstoppen der peroxidatischen Aktivität sowie zur Intensivierung der Lichtabsorption werden 0,5 ml 4 N HCl zugemischt und innerhalb von 30 Minuten die Extinktion bei der Wellenlänge 492 nm photometrisch gemessen. In der Tabelle sind die Werte einer Interferon-Bestimmung aufgeführt und mit den Werten verglichen, wie sie mit den Interferon-Standards

erhalten wurden. Als Interferon-Standard wird rohes Leukozyten-Interferon (Inkubationsmedium gemäss Stufe 1 von Tabelle 3 der DOS 29 47 134) verwendet.

Tabelle

5	Probenmaterial	$\Delta E_{492 \text{ nm/RT/30 Min.}}$
	Interferon-Standard	
	0 U/ml Interferon	0,065 / 0,070
	12,5 U/ml "	0,245 / 0,235
	25 U/ml "	0,425 / 0,430
10	50 U/ml "	0,775 0,790
	Kontrollserum (30 U/ml Interferon)	0,505 / 0,490
	Patientenplasmen	
	No 8327	0 U/ml Interferon
	No 8328	0 U/ml Interferon
15	No 8336	9 U/ml Interferon
	No 8338	0 U/ml Interferon
	No 8339	5 U/ml Interferon
	No 8363	0 U/ml Interferon
	No 8341	2 U/ml Interferon
20	No 8344	16 U/ml Interferon

h

Beispiel 4

Reinigung von durch rekombinierte DNS-Technik erhaltenem
Leukozyten-Interferon (Interferon A; vgl. Goeddel et al. Nature,
vol. 290, März 1981)

5 a) Vorreinigung des durch rekombinierte DNS-Technik
erhaltenen Human-Leukozyten-Interferons

Alle Schritte werden bei 4°C durchgeführt. Gefrorene
Bakterien-Zellen (1 kg) werden durch Druckzertrümmerung
zerstört. Der Extrakt wird nach Standardverfahren
aufgearbeitet, d.h. durch Polyäthylenimin (Polymine P)- und
10 Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von einer Dialyse des 65%igen
Ammoniumsulfatniederschlags gegen 25 mM Tris HCl, pH 7,8;
0,01% Thiodiglykol; 0,1% Triton X-100; 10 µM Phenylfluorid.
Es folgt eine Zentrifugation zur Entfernung unlöslicher
Anteile.

15 b) Herstellung des Immunoadsorbens

In Analogie zu Beispiel 2 gereinigte Antikörperlösung
enthaltend LI-8 wird gegen 0,2 M Natriumcarbonat/0,3 M
Natriumchlorid Puffer bei Raumtemperatur dialysiert. Die
dialysierte Lösung wird bei 20 000 x g während 15 Minuten
20 zentrifugiert, um unlösliches Material zu
entfernen. Die Proteinkonzentration wird auf ca. 25 mg/ml mit
dem obenerwähnten Puffer eingestellt. Affi-gel 10 (BioRad
Laboratories, Richmond, California) wird dreimal mit eis-
kaltem Isopropanol an einem gesinterten Glasfilter gewaschen
25 und dann dreimal mit eiskaltem destilliertem Wasser ge-
waschen. Das Gel wird in Plastikröhrchen übergeführt und
durch kurze Zentrifugation sedimentiert. Der Ueberstand
wird abgesaugt. Das Gel wird mit einem gleichen Volumen
gereinigter Antikörperlösung gemischt und Kopf über Fuss
30 während 5 Stunden bei 4°C rotiert. Nach der Reaktion wird



das Gel zentrifugiert und dann zweimal mit Puffer (0,1 M NaHCO_3 /0,15 M NaCl) gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Proteinbestimmung der vereinigten Waschwasser zeigt, dass ca. 24 mg an Antikörper pro ml Gel
5 gebunden wurde.

c) Affinitätschromatographische Reinigung des
vorgereinigten, durch rekombinierte DNS-Technik erhaltenen
Leukozyten-Interferons

Die in Schritt a) erhaltene Lösung (700 ml enthaltend
10 37 g Protein) wird mit 50 ml/h auf die mit PBS äquilibrierte
Immunoabsorbens Säule (2,5 x 3,5 cm; 17 ml Bettvolumen
enthaltend ca. 400 mg gereinigter monoklonaler Antikörper
LI-8); aufgetragen. Man wäscht mit 20 Säulen-Volumen an Puffer
(0,5 M NaCl; 0,02 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,2% Triton X-100),
15 dann wird die Säule mit 5 Säulen-Volumen von 0,15 M NaCl,
0,1% Triton X-100 gewaschen und dann mit 0,2 M Essigsäure,
0,15 M NaCl, 0,1% Triton X-100 (pH 2,5) eluiert. Die
Interferon-Aktivität wird in ca. 30 ml in einer durch-
schnittlichen Konzentration von ungefähr 1 mg Protein/ml
20 eluiert. Diese Lösung wird mit 1 M Tris Base auf pH 4,5
eingestellt und vierfach mit Wasser verdünnt. Die Probe
wird auf eine Carboxymethylcellulose (CM 52 Whatman) Säule
(1,3 x 3 cm) geladen, die mit 0,1 M Ammoniumacetat (pH 5,0)
äquilibriert ist. Die Säule wird mit 20 ml 0,1 M Ammonium-
25 acetat (pH 5,0) gewaschen und das Interferon mit 20 ml
0,5 M Ammoniumacetat (pH 5,0) eluiert. Das Ergebnis der
Reinigung ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

In ähnlicher Weise und mit vergleichbarer Ausbeute
lässt sich Interferon A auch mit den Antikörpern LI-3,
30 LI-5, LI-6, LI-7 und LI-9 reinigen.



Tabelle 1

Epitop	Monoklonale Antikörper	Isotypen	Ketten	Neutralisation
I {	LI-1	↑	γ_1/k	Ja
	LI-2		γ_1/k	Ja
II {	LI-3		γ_1/k	Ja
	LI-5		γ_1/k	Ja
	LI-6		γ_1/k	Ja
	LI-7	IgG ↓	γ_1/k	Ja
	LI-8		γ_1/k	Ja
III {	LI-9		γ_{2b}/k	Ja
	LI-12	IgM	μ/k	Nein

h

Tabelle 2

Kultur	Zellen pro 96 "wells"	geprüfte Klone oder "wells"	Anzahl Positive	Anzahl Negative
LI-1	100	6	6	0
LI-2	100	11	6	5
LI-3	100	7	7	0
LI-5	100	13	13	0
LI-6	100	12	12	0
LI-7	100	10	8	2
LI-8	100	9	8	1
LI-9	100	10	8	2
LI-12	100	4	0	4
LI-12	300	48	6	42

4

Tabelle 3

	LI-1	LI-2	LI-3	LI-5	LI-6	LI-7	LI-8	LI-9	LI-12
LI-1	15800	14980	17620	17730	15950	17670	17970	19550	18260
LI-2		11880	15120	16750	14570	16440	16150	16250	15460
LI-3			11600	13440	10320	11900	13270	9710	15490
LI-5				13640	11690	13230	14720	11820	16710
LI-6					7300	10290	10860	6540	12240
LI-7						12090	13480	8630	14610
LI-8							14700	10270	17680
LI-9								4900	10870
LI-12									9940

cpm/well

Tabelle 4

<u>Antikörper Kombination</u>		<u>¹²⁵I markierte Antikörper Bindung (cpm)</u>		
Festphasen Antikörper	¹²⁵ I markierter Antikörper	mit Interferon (10 U)	ohne Interferon	spezifische Bindung
LI-1	LI-9	922	440	482
LI-9	LI-1	2465	251	2208

51

Tabelle 5

Interferon Spezies	Interferon Einheiten pro Bestimmung	CPM [^{125}I] LI-1 Bindung
α_1	100	2'202
α_2	100	1'633
β_1	100	822
β_2	100	8'135
β_3	100	70
γ_1	100	7'036
γ_2	100	4'804
γ_3	100	101
γ_4	100	198
γ_5	100	121
δ	100	5'498

h

Tabelle 6

Antikörper

<u>Interferon</u>	Li-1	Li-3	Li-5	Li-6	Li-7	Li-8	Li-9
A	+	+	+	+	+	+	+
B	+	-	-	-	-	-	-
D	-	+	+	+	+	+	+
F	-	-	-	-	+	-	-

Legende:

Die mit A bis F gekennzeichneten Interferone sind die durch rekombinierte DNS-Technik erhaltenen und in der Arbeit von David V. Goeddel et al. in Nature Vol. 290, März 1981, beschriebenen Interferone. Ein + bedeutet, dass das entsprechende Interferon durch eine mit dem jeweiligen Antikörper beladenen Säule vollständig adsorbiert wird, wogegen ein - keine Adsorption bedeutet. Ein + bedeutet partielle Adsorption.

6

Tabelle 7

Stufe	Volumen (ml)	Total Protein (mg)	Total Aktivität (units)	spezifische Aktivität (units/mg)	Reinigungs- faktor	Ausbeute (%)
Ammoniumsulfat- fällung	700	37,100	7.4×10^9	2×10^5	.1.0	100
Antikörper-Säule Pool	30	30	7×10^9	2.3×10^8	1150	95
CM-52	20	20	6×10^9	3×10^8	1500	81

Die spezifische Aktivität wurde nach dem früher erwähnten CPE-Inhibitions-Verfahren bestimmt. Gemäss Natriumodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist das Interferon nach dem Immunadsorptionsschritt über 90% rein. Nach der CM-52 Säule erschien es praktisch homogen.

Patentansprüche

1. Kollektion von monoklonalen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, dass ihre Glieder gegen natürliche oder durch rekombinierte DNS-Technik erhaltene humane Leukozyten-
5 Interferone (HLI) gerichtet sind.
 2. Kollektion nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die monoklonalen Antikörper von verschiedenen Hybriden sezerniert werden.
 3. Kollektion nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
10 dass sie aus Gruppen von Antikörpern besteht, welche sich voneinander in ihren Isotypen unterscheiden.
 4. Kollektion nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass 8 Antikörper vom IgG und ein Antikörper von IgM Isotyp sind.
 - 15 5. Kollektion nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass von den 8 Antikörpern mit IgG Typ 7 eine γ_1 schwere und einer eine γ_{2b} schwere Kette aufweist.
 6. Kollektion nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sich einzelne monoklonale Antikörper gegenseitig nicht
20 inhibieren, d.h. gemeinsam an HLI binden, andere sich gegenseitig inhibieren, d.h. nicht gemeinsam an HLI binden.
 7. Kollektion nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus Gruppen von Antikörpern besteht, deren Glieder verschiedene Epitope (antigenische Determinanten) von
25 HLI erkennen.
- 

8. Kollektion nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Antikörper aus der Kollektion HLI γ_3 nicht erkennt.

9. Kollektion nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
5 dass ein Antikörper (IgM) die antivirale Aktivität von HLI nicht neutralisiert.

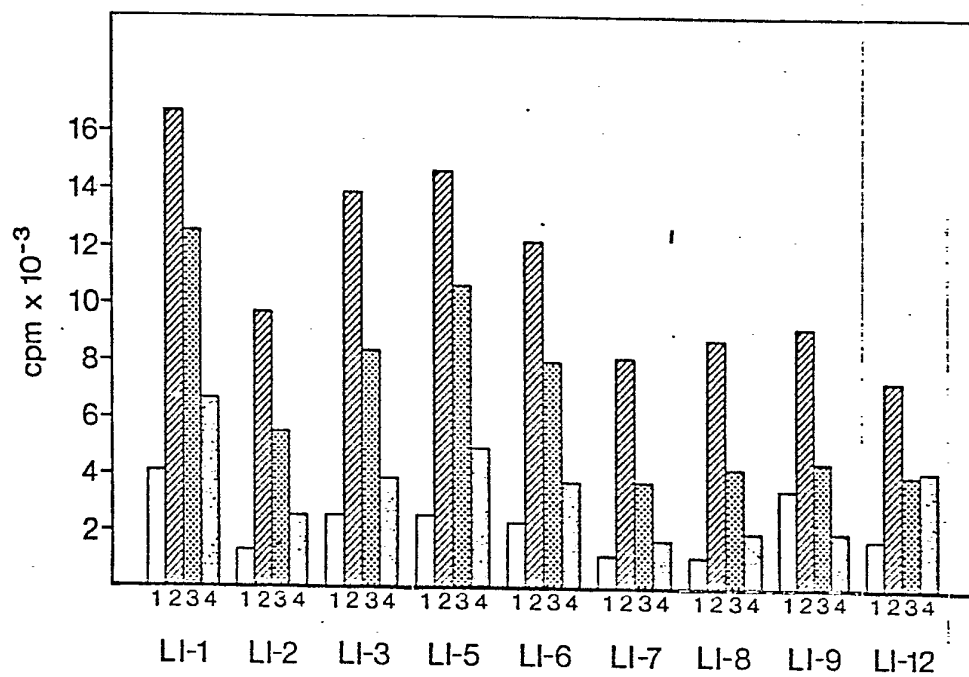
10. Verwendung von je einem Glied von verschiedenen Gruppen von Antikörpern gemäss Anspruch 7 für einen Festphasen-Sandwich-Test für HLI.

10 11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der nicht immobilisierte Antikörper mit Radioaktivität oder einem Enzym markiert ist.

12. Verwendung von einem Antikörper gemäss Kollektion von Anspruch 1 zur Reinigung von natürlichem oder durch
15 rekombinierte DNS-Technik erhaltenem HLI.

13. Verfahren zur Reinigung von natürlichem oder durch rekombinierte DNS-Technik erhaltenem HLI, dadurch gekennzeichnet, dass man ein HLI enthaltendes Rohprodukt durch Affinitätschromatographie unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers der Kollektion gemäss einem der Ansprüche 1-9 reinigt.



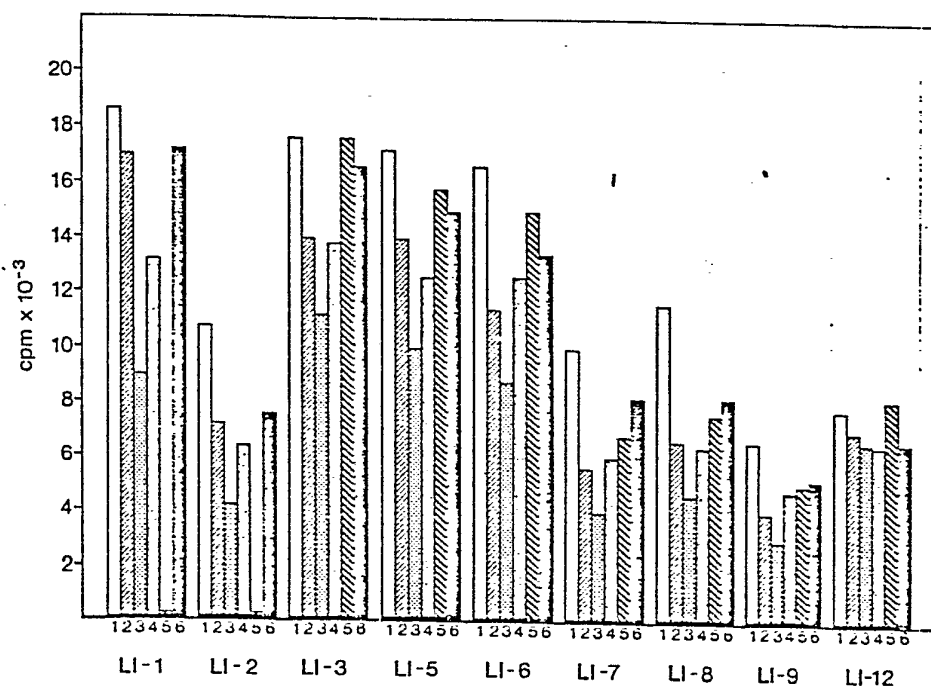


1 = IFL α
 2 = IFL β
 3 = IFL γ
 4 = IFL δ

cpm = spezifische Bindung pro Test
 (nach Abzug von 300-400 cpm
 von unspezifischer Bindung
 gegen BSA; LI-12 unspezifische
 Bindung ca. 1200 cpm)

Figur 1

Handwritten signature



1 = IFL α_1

4 = IFL γ_2

2 = IFL α_2

5 = IFL γ_3

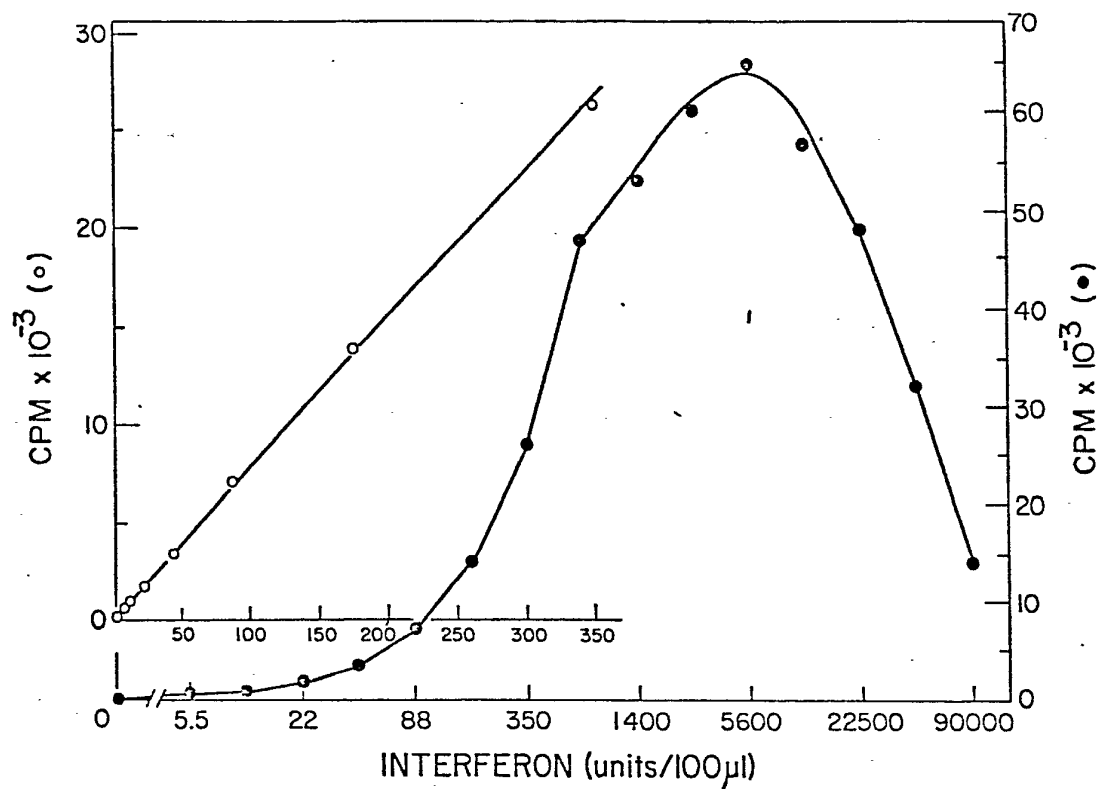
3 = IFL β_2

6 = IFL K

cpm (vgl. Figur 1)

Figur 2

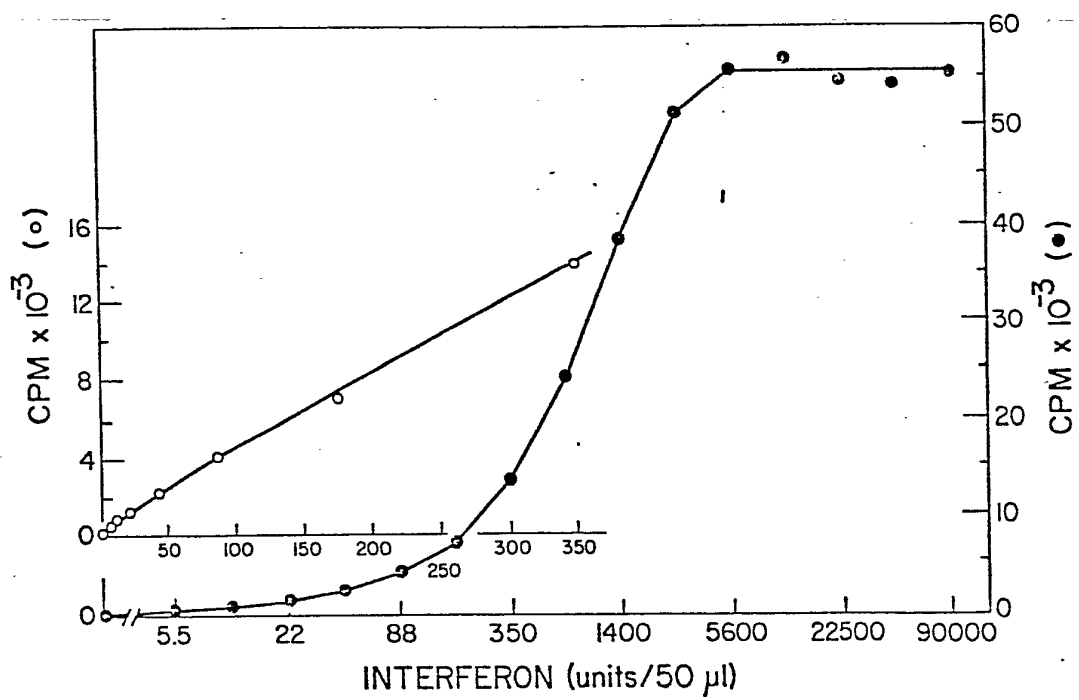
[Handwritten signature]



cpm: ^{125}I -LI-1 gebunden pro Test; Interferonkonzentration (Abszisse) ist für die Hauptkurve (●—●) logarithmisch und für die links eingeschobene Kurve (○—○) linear eingetragen.

Figur 3

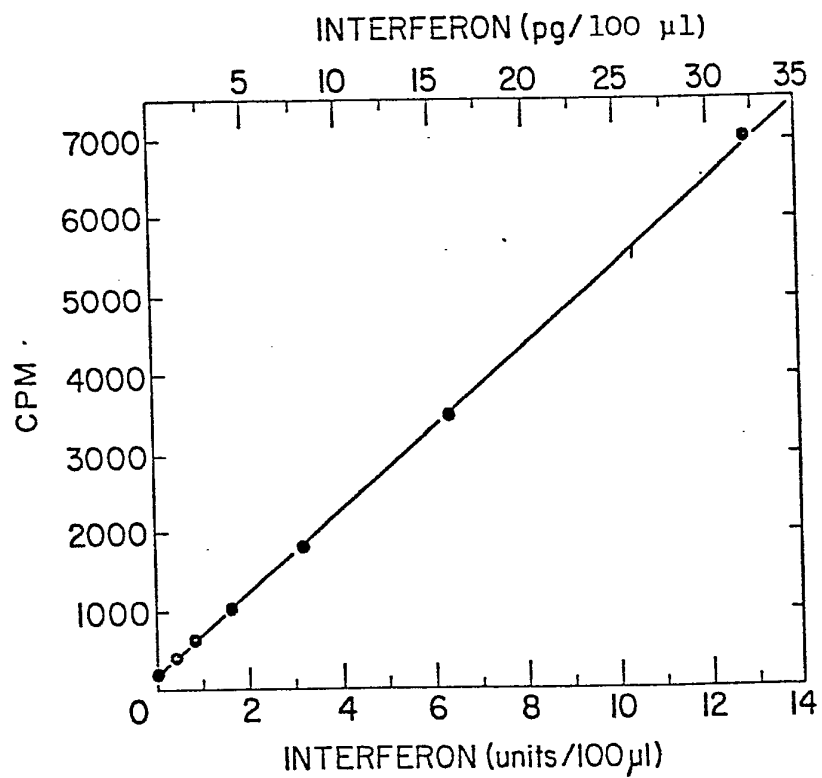
Handwritten signature



cpm: vgl. Figur 3

Figur 4

Handwritten signature

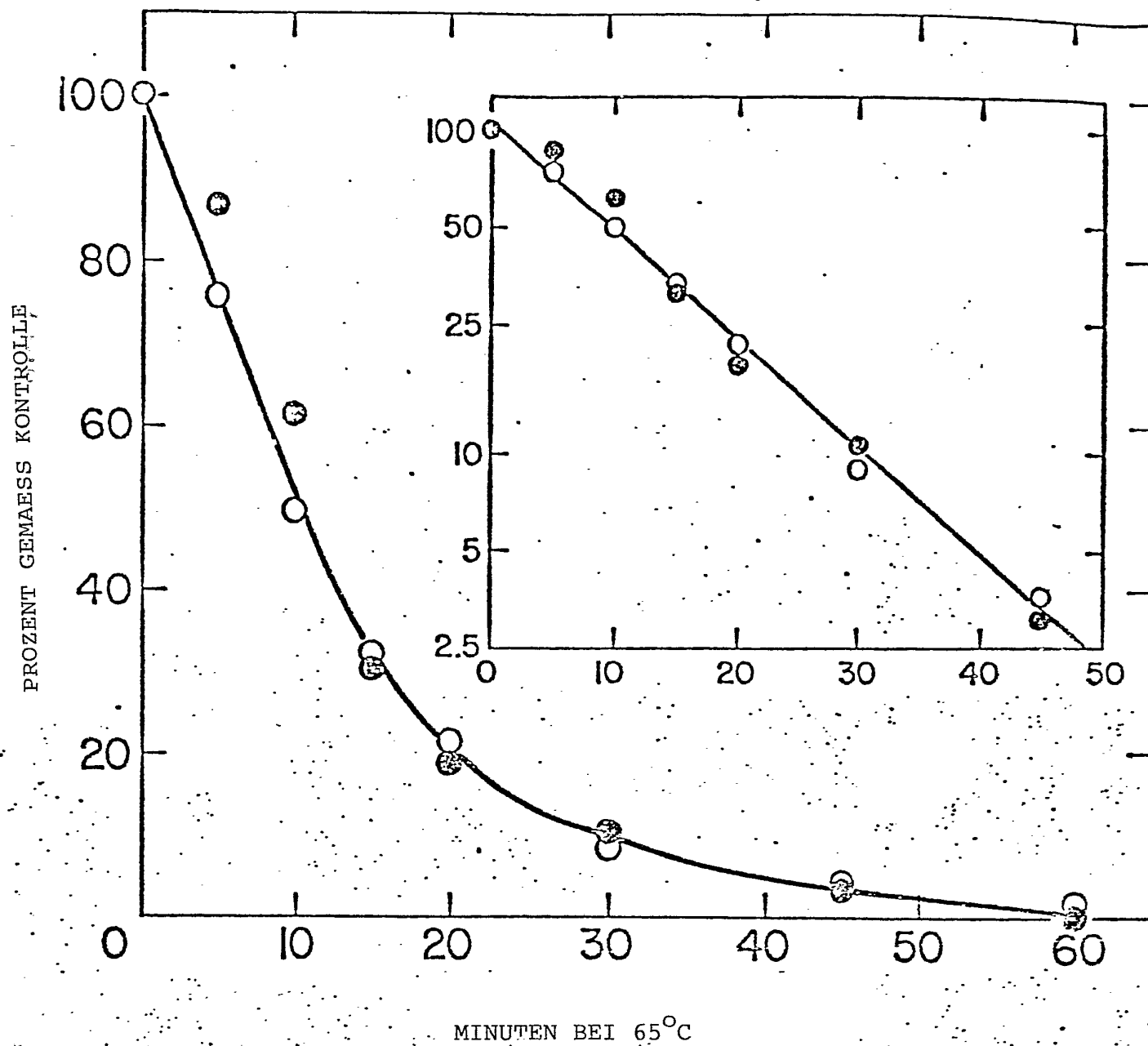


cpm: vgl. Figur 3, eingeschobene Kurve

Figur 5

WWS

Figur 6



Legende: ○ = Radioimmunverfahren

● = CPE-Inhibitionstest

Handwritten signature