



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 396 936 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1358/86

(51) Int.Cl.⁵ : **C12N 5/12**
C12P 21/08

(22) Anmeldetag: 22. 5.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 5.1993

(45) Ausgabetag: 27.12.1993

(30) Priorität:

23. 5.1985 US 737196 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A2 0068763 GB-PS 2113715

(73) Patentinhaber:

SANDOZ-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H.
A-1235 WIEN (AT).

(54) HYBRIDOMA ZELL-LINIEN UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG SOWIE DIE VERWENDUNG DER GENANNTEN ZELL-LINIEN ZUR HERSTELLUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

(57) Nicht-humane Primaten-monoklonale Antikörper werden hergestellt aus Zell-Linien, die hergestellt werden aus einem xenogenetischen Hybridoma und einem Lymphozyten.

AT 396 936 B

Die vorliegende Erfindung betrifft Hybridoma Zell-Linien und Verfahren zu ihrer Herstellung sowie die Verwendung der genannten Zell-Linien zur Herstellung von nicht-menschlichen Primaten monoklonalen Antikörpern.

Hybridomas werden Zellen genannt, die durch Fusionierung einer immortalisierten Zelle, insbesondere einer Myelomazelle, mit einer oft nicht transformierten Partner-Zelle entstehen. Letztere wird normalerweise ausgewählt wegen ihrer Fähigkeit, eine bestimmte Substanz zu produzieren (z. B. eine Lymphozytenzelle zur Herstellung von Antikörpern). Die resultierende Hybridzelle kann selektioniert und geklont werden, um so Zell-Linien zu erhalten, die Stoffe mit bestimmter Struktur und/oder Eigenschaft produzieren. Insbesondere können solche mit Lymphozyten gebildete Hybridomas zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet werden.

Die Entwicklung der Hybridoma-Technologie der letzten Jahre konzentrierte sich auf die Herstellung von Zell-Linien, die sowohl stabil sind als auch eine hohe und spezifische Produktionskapazität für eine bestimmte erwünschte Substanz besitzen. Es gab verschiedene Lösungsversuche, die hauptsächlich auf das Gebiet der Immunglobuline/Antikörper konzentriert waren.

Eine Studie der früheren Aktivitäten auf diesem Gebiet gibt einen Überblick über die dabei aufgetretenen Probleme und bisherigen Lösungsversuche.

Der ursprüngliche Anstoß zur Erforschung von Hybrid Zell-Linien, die monoklonale Produkte erzeugen, kam aus dem Gebiet der Immunbiologie. Bei den erhaltenen Produkten handelt es sich um monoklonale Antikörper. Konventionelle Antisera enthalten normalerweise eine sehr große Zahl von Antikörpern, die alle mit dem gleichen Antigen aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäuresequenz im Bereich der Bindungsstelle mit mehr oder weniger hoher Affinität reagieren. Darüber hinaus enthalten konventionelle Antisera auch eine große Menge von Antikörpern gegen Antigene, die frühere Defensivreaktionen des Individuums, in dem das Antiserum produziert wurde, wiedergeben. Für die meisten Verwendungszwecke sind solche "breite" Antisera ausreichend, aber neuere Entwicklungen der Wissenschaft machen höhere Anforderungen bezüglich Spezifität und Reproduzierbarkeit notwendig.

Eine erste, inzwischen bereits klassische Lösung wurde von Kohler und Milstein [NATURE, 256, 495 - 497 (1975)] beschrieben, denen es gelang pre-immunisierte Mäuse-Milzzellen mit "drug"-sensitiven Mäuse-Myeloma-Zellen zu fusionieren. Es gelang, die durch Fusion immortalisierten Zellen in vitro zu klonen und zu züchten, d. h. es wurde eine homogene Zellpopulation erhalten, die eine homogene Antikörperpopulation monoklonale Antikörperpopulation (monoklonale Antikörper) produzierte. Durch entsprechende Selektion dieser Zellklone aus den erhaltenen vielen Einzelklonen konnten diejenigen Zellen weitergezüchtet werden, welche Antikörper mit der gewünschten Antigenspezifität produzieren.

Die auf diese Weise hergestellten Mäuseantikörper sind in Forschungs- und Diagnostikanwendungen nützlich und einige wurden bereits therapeutisch am Menschen angewandt. Es würde jedoch einen wesentlichen Fortschritt für die humane Immunglobulin-Therapie bedeuten, wenn auch menschliche oder nicht-menschliche Primaten Antikörper mit ähnlich guter Reproduzierbarkeit und Spezifität in dieser Art erhalten werden könnten. Damit würde auch der Gefahr einer Sensibilisierung vorgebeugt. Einige Versuche, das Problem der Herstellung menschlicher Antikörper in vitro zu lösen, wurden bereits unternommen, bisher jedoch ohne Erfolg.

1. Die Transformation von normalen menschlichen Lymphozyten mit Epstein-Barr Virus (EBV) ist nicht sehr erfolgreich, da der Prozeß sehr langwierig ist und auch das Klonen und Selektionieren sich sehr schwierig gestaltet.

2. Fusionierung von normalen (menschlichen) Lymphozyten mit menschlichen Myelomazellen. Diese Methode scheint eine naheliegende Analogie zum Maus-Maus Hybridoma Verfahren darzustellen. Das Problem besteht jedoch darin, daß im menschlichen System nur eine einzige Myelomazell-Linie besteht und diese Zell-Linie mit Mykoplasma kontaminiert ist (Mykoplasmen verhindern eine erfolgreiche Fusionierung).

3. Die Fusionierung von normalen (menschlichen) Lymphozyten mit einer EBV-transformierten menschlichen Lymphoblastoid-B-Zell-Linie ist wahrscheinlich das zuverlässigste und reproduzierbarste Verfahren, das bisher beschrieben wurde. Es leidet jedoch an den grundlegenden in vitro-Charakteristika der Lymphoblastoid-Zellen. Sie sind äußerst schwer zu klonen und, da sie ein frühes Stadium in B-Zellendifferenzierung darstellen, ist ihre Kapazität Antikörper zu produzieren und zu sezernieren, etwa zehnmal geringer als die für richtige Myelomazellen.

4. Die Fusion von menschlichen Lymphozyten mit Mäuse-Myeloma bringt Zellen mit den gleichen ausgezeichneten in vitro-Charakteristika wie die Maus-Maus-Hybridomas hervor, jedoch mit dem großen Nachteil, daß solche Hybride eine inherente genetische Instabilität aufweisen. In diesem Zusammenhang ist es speziell nachteilig, daß sie das menschliche Chromosom, das die Information für die leichten Kappa-Ketten des Immunglobulin-Moleküls trägt, ausstoßen.

Es wurde in der Folge berichtet, daß bei der Verwendung einer xenogenetischen Hybridoma-Zelle als Ausgangszelle für eine weitere Fusion mit einer anderen Zelle es möglich ist eine Hybridoma mit stark verbesserter Stabilität zu erhalten (Ostberg, et al., HYBRIDOMA 2, No. 4, 361, 1983). Diese xenogenetischen Hybridomas stellen eine freundlichere Umgebung für eine verbesserte Stabilität hinsichtlich des Verlustes an Chromosomen dar.

Die Erfindung betrifft eine Hybridoma Zell-Linie, bestehend aus einer immortalisierten Ausgangszelle, die mit einer xenogenetischen Partnerzelle fusioniert wird, worauf die resultierende immortalisierte Zelle mit einer Zelle fusioniert wird, die fähig ist, einen nicht-menschlichen Primaten monoklonalen Antikörper zu produzieren. Letztere Zelle ist genetisch kompaktibel mit der genannten Partnerzelle im xenogenetischen Hybridoma. Mit genetisch kompaktibel ist das Charakteristikum gemeint, daß die Zelle der genannten Partnerzelle ähnlich ist was Spezies und Genus der Herkunft betrifft derart, daß ein signifikanter Verlust von Chromosomen vermieden wird und daher ein wünschbarer Stabilitätsgrad nach der Fusion erreicht wird.

Es zeigt sich nun, daß die Herstellung und Verwendung von nicht-menschlichen Primaten monoklonale Antikörpern, hergestellt durch xenogenetische Hybridoma Fusionstechnik, sich als nützlicher Lösungsversuch bei der Behandlung von Menschen, die monoklonale Antikörper benötigen, und bei diagnostischen Anwendungen erwies. Es ist kein früherer Bericht über die Herstellung oder Isolierung von nicht-menschlichen Primaten monoklonale Antikörpern bekannt.

Dementsprechend ist es ein Gegenstand dieser Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von stabilen Zell-Linien vorzusehen, die nicht-menschliche Primaten monoklonale Antikörper erzeugen, die nützlich sind bei der Behandlung von Menschen und als Diagnostika. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Beschaffung von Immunglobulinen, die von nicht-menschlichen Primaten Lymphozyten abstammen und sich für eine erfolgreiche Verwendung am Menschen eignen. Die nicht-menschlichen Primaten, die von diesem Aspekt der Erfindung eingeschlossen sind, umfassen im wesentlicheren die höheren Affen, z. B. Orang-Utans, Gorillas, oder Schimpansen und Affen wie "neue Welt"-Affen, z. B. Cebus-Affen, und "alte Welt"-Affen, z. B. Rhesus-Affen. Was die Verwendung von höheren Affen und Affen betrifft, so ist es klar, daß für praktische Zwecke die Verwendung von Tieren, die klein genug sind um unter Laborbedingungen leicht gehandhabt zu werden, vorgezogen wird. Der obige Aspekt soll aber alle nicht-menschlichen Primaten einschließen.

Unter einem besonderen Aspekt ist die als immortalisierte Zelle gewählte xenogenetische Hybridoma Zelle ein Myelomahybrid, das seine eigene Fähigkeit zur Produktion von Immunglobulin verloren hat. Ein Beispiel einer solchen xenogenetischen Hybridoma Zelle würde das zwischen einer Myeloma Zelle und einer Lymphozyten-Zelle sein. Geeignete Myeloma Zellen können von Mäusen und Ratten erhalten werden erzeugen vorzugsweise kein Immunglobulin. Diese Myelomas können ihrerseits Hybride sein (z. B. Mäusemyeloma x Mäuse-Lymphozyten). So eine Zelle ist z. B. die Mäuse SP-2 Myeloma Zell-Linie. Diese wird dann beispielsweise mit einem Affen-Lymphozyten fusioniert, wobei ein Affen monoklonaler Antikörper hergestellt wird.

Wie beschrieben in der vorgehend zitierten HYBRIDOMA 2-Literaturstelle (wie auch in den entsprechenden Patentanmeldungen, z. GB-A-2,113,715, werden die für die Immortalisierung verwendeten xenogenetischen Hybridomas vor der weiteren Fusionierung "drug"-resistent gemacht und vorzugsweise zur Verbesserung der Ausbeute der gewünschten Substanz mit einem Lymphozyten, der vorsensitiviert wurde, fusioniert. Die Methoden der "drug"-Resistenz und der vorsensitiven Behandlung wie auch das Verfahren der Fusionierung dieser Zellen sind konventionelle Methoden. Die Selektion der gewünschten Hybride und das Klonen werden nach an sich bekannten Methoden, wie früher beschrieben und veröffentlicht, durchgeführt (siehe z. B. obige Literaturzitate).

In einer besonderen Ausführungsform gemäß der vorliegenden Erfindung wird die SP-2-Zell-Linie verwendet. Diese war ursprünglich ein Hybridoma zwischen der P3-X63-Ag8-Linie und Mäuse-Milz-Zellen, die Antikörper gegen rote Schafblutzellen bilden. Sie hat die Fähigkeit zur Bildung von Antikörpern verloren (C. F. M.

Shulmann et al., NATURE 276, 269, 1978).

Die SP-2-Zell-Linie ist beispielsweise erhältlich durch das NIGMS Human Genetic Mutant Cell Depository Ref. GM 35669 A (siehe US DHHS 1982 Catalog of Cell Lines). Die Zell-Linie wird "drug"-resistent gemacht und hierauf mit normalen menschlichen peripheren Lymphozyten nach bekannten Verfahren fusioniert [C. F. G. Galfre et al., NATURE 266, 550 (1977) und R. Nowinski et al., SCIENCE 210, 537 (1980)].

Es wird eine große Anzahl Hybriden erhalten, und nach ungefähr fünf Wochen werden fünf Klone selektioniert, die rasches Wachstum ohne Antikörperproduktion zeigen. Diese Zellen werden dann auf Resistenz gegen 8-Azaguanin selektioniert, und mit drei dieser Linien ist es möglich, Mutanten zu erhalten, die gegen 20 µg/ml von 8-Azaguanin resistent sind. Diese Zellen sind gleichzeitig sensitiv gegen Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT)-Medium, was zeigt, daß sie ihre Fähigkeit zur Erzeugung von Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase verloren haben. Eine dieser Linien ist SPAZ 4. Sie kann genutzt werden für eine weitere Fusion, um das Antikörper produzierende Hybridoma zu erhalten.

Die einfachen Hybridoma Zell-Linien der vorliegenden Erfindung, welche nicht-menschliche Primaten monoklonale Antikörper produzieren können, falls dies gewünscht oder verlangt wird, weiter fusioniert werden, wie z. B. mit einer weiteren Lymphozytenzelle von einem Affen, um damit Zellen mit größerer Stabilität oder mit etwas verschieden gewünschten Eigenschaften zu erhalten.

Die erfindungsgemäß hergestellten Antikörper können am Menschen zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten, bösartigen Tumoren sowie Allergien eingesetzt werden. Sie können eingesetzt werden zur Behandlung von Abstoßungen bei Transplantationen sowie bei anderen bekannten Indikationen wie bei durch Pharmazeutika verursachte Toxizität, z. B. Digoxin. Sie können bei diagnostischen Anwendungen, z. B. in Behältern (kits) und ähnlichem verwendet werden.

Beispiele von Typen der Zell-Linien auf welche sich die vorliegende Erfindung bezieht, sind Zell-Linien, die Maus-Myeloma-Zellen und Menschen und nicht-Menschen Primaten Zellen umfassen, um so aus einer xenogenetischen Maus-Menschen Zelle eine (Maus x Menschen) x nicht-menschlichen Primaten Zell-Linie, z. B. eine (Maus x Menschen) x Affen Hybridoma Zell-Linie, oder (Maus x nicht menschlichen Primaten) x nicht-menschlichen Zell-Linie, wie eine (Maus x Affen) x Affen Zell-Linie. Weitere gemäß der vorliegenden Erfindung vorgesehene Zell-Linien schließen z. B. eine [(Maus x Menschen) x nicht-menschlichen Primaten] x nicht-menschlichen Primaten Zell-Linie, z. B. [(Maus x Menschen) x Cebus-Affe] x Cebus-Affe Zell-Linie, eine [(Maus x Menschen) x Rhesus-Affe] x Rhesus-Affe Zell-Linie, eine [(Maus x Menschen) x Schimpansen] x Schimpansen Zell-Linie, und eine [(Maus x Menschen) x Rhesus-Affe] x Schimpansen Zell-Linie ein.

Die nach der vorliegenden Erfindung hergestellten monoklonalen Antikörper werden für die therapeutische Anwendung nach an sich bekannten Methoden konfektioniert und verabreicht, sowie für die diagnostische Verwendung in konventionellen Behältern (kits) aufgehoben.

In den nachfolgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert.

BEISPIEL 1

Digoxin wird in 2 ml absolutem Äthanol gelöst, und 2 ml 0,1 molares Natriumperjodat wird tropfenweise hinzugefügt. Die Mischung wird während 48 Minuten inkubiert. Hierauf werden 60 Mikroliter Äthylenglykol zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation werden 50 mg "keyhole limpet" Hämocyanin (KLH) in 10 ml Wasser bei einem pH 9,5 hinzugefügt. Nachdem der pH sich bei 9,5 stabilisiert hat, werden 0,3 g NaBH₄ in 2 ml Wasser zugegeben. Das so erhaltene Präparat wird während der Nacht gegen eine Salzlösung dialysiert.

Ungefähr 4 mg KLH-Digoxin in einem Volumen von 0,5 ml wird zusammen mit 0,5 ml Freund's Komplet Adjuvant emulgiert. Die Emulsion wird intramuskulär in beide Oberschenkel eines Cebus-Affen injiziert. Folgend dieser ersten Injektion wird dem Tier 4 mal eine ähnliche Menge KLH-Digoxin, aber jetzt emulgiert in 0,5 ml Freund's Inkomplett Adjuvant, verabreicht. Nach dieser Immunisierung zeigt der Bluttest, daß das Tier Antikörper produziert hat, die bei einer Reaktion mit Digoxin in der Lage sind bei in vitro-Studien, die Toxizität von Digoxin zu inaktivieren. Dies kann gezeigt werden durch die Beobachtung, daß Verdünnungen von Affen-Serum den toxischen (letal) Effekt von Digoxin (oder seines Analogons Ouabain) auf sensitivierte menschliche Lymphoblastoid-Zellen in einer Zellkultur neutralisieren. Nachdem das Tier zwei Monate geruht hat, wurde eine weitere i. v. Injektion von 0,5 ml KLH-Digoxin in Salzlösung verabreicht.

Am dritten Tag nach der letzten intravenösen Injektion, werden dem Tier für die Fusionierung Zellen entnommen.

a. Blut wird einer peripheren Vene entnommen und in einer Spritze, enthaltend 50 µl Heparin-Lösung (10.000 USP Einheiten/ml), gegeben. Die Blut-Lymphozyten werden gereinigt durch stufenweises Zentrifugieren. Nach dem Zentrifugieren werden die Zellen in "Hank's balanced salt solution" (Gibco Laboratories, Grand Island, N. Y., Kalaog No. 310 - 4020, im Handel allgemein zugänglich) gewaschen.

b. Durch Anwendung von aseptischen chirurgischen Techniken werden Lymphknoten aus der Leistenengegend entfernt. Um einzelne Zell-Suspensionen zu präparieren, werden die Lymphknoten durch ein feinmaschiges Stahlnetz gedrückt. Die isolierten Zellen werden in "Hank's balanced salt solution" gewaschen.

c. Durch Anwendung von aseptischen chirurgischen Techniken wird am Tier eine teilweise Splenektomie durchgeführt. Eine Einzel-Zellsuspension wird aus dem Milzfragment hergestellt, indem man das Organ durch ein feinmaschiges Stahlnetz drückt. Die isolierte Einzel-Zellsuspension wird in "Hank's balanced salt solution" gewaschen.

Ungefähr 2×10^7 isolierte Lymphozyten werden mit einer annähernd gleichen Menge von SPAZ-4 Myeloma-Zellen (erhältlich nach an sich bekannten Methoden, wie z. B. im vorstehend zitierten HYBRIDOMA 2 aufgeführt) in serumfreiem Medium gemischt und in einer Zentrifuge mit niedriger Geschwindigkeit pelletiert. Das Zell-Pellet wird während einer Minute mit 1,0 ml von 50 % PEG-1500 in "Hank's balanced salt solution" bei einem pH von 8,0 behandelt. Nach einer Minute Inkubation bei 37 °C wird langsam ein ml "Hank's balanced salt solution" hinzugefügt. In der folgenden Minute werden weitere 10 ml von "Hank's solution" hinzugefügt. Die Zellen werden erhalten durch Zentrifugieren und Resuspendieren in 20 ml von Dulbecco's modifiziertem "Eagle Medium" (No. 430 - 2100, Gibco Laboratories) VIROLOGY 8, 396 (1959); VIROLOGY 12, 185 (1960); Gewebe-Kultur Standards Committee, IN VITRO, Vol. 6, No. 2, S. 93, enthaltend 20 % fötales Ochsen-Serum und unter Verwendung von HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) als Selektionssystem.

Nach ungefähr drei Wochen, wenn gutes Wachstum in den Kulturen-Näpfchen gesehen wird, wird der Überstand von den zu testenden Kulturen entfernt. Die Testierung wird mittels einer ELISA-Technik durchgeführt, indem mit Ochsen-Serum Albumin (BSA) gekuppeltes Digoxin als Antigen benutzt wird (das BSA-Digoxin wird in analoger Weise zum KLH-Digoxin hergestellt). Positive Klone werden festgestellt, indem man ein Kaninchen anti-menschliches oder anti-Affen Immunglobulin-Peroxydase System verwendet. Positive Klone werden zur Aufarbeitung ausgelesen und zur gleichen Zeit geklont durch Begrenzung der Verdünnung in Mikrotiter-Näpfchen, wobei Maus-Thymozyten als Füllstoff-Zellen verwendet werden. Sobald eine große Anzahl Zellen zur Verfügung stehen, werden die Klone in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren.

Antikörper werden hergestellt durch Wachsen von Hybridoma Zell-Linien entweder in einer stationären Kultur oder in einer Roller-Kultur, wobei Dulbecco's MEM mit einem Maximum von 10 % fötalen Ochsen-Serum verwendet wird. Die Antikörper, in einer Konzentration von 20 bis 50 Mikrogramm per Milliliter, werden durch Affinitäts-Chromatographie an Sepharose Protein A-Säulen (Pharmacia, Inc.) gereinigt. Hierbei wird das zu chromatographierende Material auf die Säule aufgetragen. Die Bindungskapazität der Säule wird gesättigt und die Säule mit Phosphat gepufferter Salzlösung gewaschen. Nachdem das ungebundene Material aus der Säule entfernt worden ist, wird die Säule mit 0,05 M Natriumzitrat, enthaltend 0,5 M Natriumchlorid (pH 3,0) eluiert. Das Eluat wird rasch neutralisiert durch Zugabe von 1 M Tris-HCl, pH 8,0).

BEISPIEL 2

Zellen, die gemäß den Zell-Produktions- und Selektionsverfahren von Beispiel 1 hergestellt wurden und die über längere Zeit ihre Fähigkeit, Immunglobulin zu erzeugen, verloren haben, werden "drug"-resistent gemacht durch Behandlung in Gegenwart von 20 µg/ml 8-Azaguanine, wodurch es möglich ist, HAT in bekannter Weise als Selektionssystem zu brauchen. Die resultierenden Zellen werden dann fusioniert mit immunisierten Cebus-Affen Lymphozyten und nach Behandlung wiederum mit HAT-Medium die positiven Zellkulturen selektioniert, wobei man die gleichen Verfahren wie im vorstehend beschriebenen Beispiel 1 verwendet.

Gemäß diesem Verfahren wurden bei der Fusion unter Verwendung von Zellen des Cebus-Affen drei Antikörper erhalten. Die Hybridomas wurden mit 7-1, 11-1 und 11-3 bezeichnet. Alle drei Antikörper wurden auf ihre Fähigkeit, die Toxizität von Digoxin an einer menschlichen Lymphoblastoid Zell-Linie, IM-9 zu hemmen, getestet. Wurden die Antikörper bei einer Endkonzentration von 100 µg/ml verwendet, so wurde das folgende Resultat erreicht:

<u>Zugabe</u>	<u>Digoxin, Dosis, die keinen Schaden verursacht</u>
Phosphat gepufferte Salzlösung	$2,9 \times 10^{-8} \text{ M}$
5 7-1	$4,7 \times 10^{-7} \text{ M}$
11-1	$9,4 \times 10^{-7} \text{ M}$
11-3	$2,3 \times 10^{-7} \text{ M}$

Der 7-1 Antikörper wurde auch wegen seiner Spezifität gegen andere Typen von Digitalis-Alkaloiden getestet. Das Resultat wird in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt:

<u>Wirkstoff</u>	<u>Wirkstoff, Dosis, die keinen Schaden verursacht</u>
Phosphat gepufferte Salzlösung	7-1
Ouabain	$2 \times 10^{-8} \text{ M}$
Digitoxin	$5,9 \times 10^{-9} \text{ M}$
Deslanosid	$2,3 \times 10^{-8} \text{ M}$

Zusammengefaßt zeigen diese Daten, daß die nach obiger Methode hergestellten Antikörper gegen den toxischen Effekt von Wirkstoffen protektiv wirken können. Im Falle der Digitalis-Alkaloide kann ein Antikörper gegen zwei der Wirkstoffe, die vom Patienten außerhalb der Klinik verwendet werden (Digoxin und Digitoxin) und gegen einen parenteral verwendeten Wirkstoff (Deslanosid) schützen. Er hat keine Wirkung gegen einen anderen parenteralen Wirkstoff (Ouabain).

BEISPIEL 3

In ähnlicher Weise wie in Beispiel 1 beschrieben, wird beim erwachsenen männlichen Schimpanse KLH-Digoxin als Immunogen verwendet. Nach insgesamt fünf Injektionen dieses Antigens, welches getrennt im Abstand von zwei Wochen verabreicht wird, wird mit 0,5 ml KLH-Digoxin intravenös verabreicht (ungefähr 4 mg Protein) ein letztes Mal stimuliert. Am sechsten Tag nach der letzten i. v. Injektion wird dem Tier eine Blutprobe entnommen und einen Tag nach der Blutung für die Zellfusion mit der SPAZ-4 Myeloma Zell-Linie verwendet, wobei das vorstehend umrissene Verfahren angewandt wird. Von der am sechsten Tag erhaltenen Probe werden IgG-Antikörper produzierende Hybridoma, die mit CH 4-14 und CH 4-25 bezeichnet werden, erhalten. Letztere haben eine Lambda-resp. leichte Kappa-Kette. Die Charakterisierung der leichten Ketten erfolgt auf an sich bekannte Weise, indem man Reagentien gegen humane Immunglobuline verwendet. Solche Reagentien geben unzweideutige Resultate und die Reaktivität ist stärker gegenüber anti-human Reagentien als gegenüber anti-Affen Reagentien wie sie gegen den Cynomolgus-Affen hergestellt wurden. Beide von ihnen (Maus x Menschen) x Schimpansen-Antikörper haben Affinitäten für Digoxin, die deutlich höher sind als der im vorstehenden Beispiel 2 erwähnte Cebus-Antikörper 11-1.

PATENTANSPRÜCHE

1. Hybridoma Zell-Linie, umfassend eine immortalisierte Zelle, die mit einer Zelle fusioniert wird, die fähig ist, einen nicht-humanen Primaten-monoklonalen Antikörper zu produzieren, wobei die immortalisierte Zelle eine xenogenetische Hybridoma Zelle umfaßt, die aus einer Ursprungs-immortalisierten Zelle und einer Partner-Zelle

fusioniert wird und wobei die genannte Antikörper produzierende Zelle genetisch kompatibel mit der genannten Partner-Zelle ist.

2. Hybridoma Zell-Linie nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die den genannten Antikörper produzierende Zelle den gleichen Genus wie die Partner-Zelle in der xenogenetischen Hybridoma Ursprungszelle hat.
3. Hybridoma Zell-Linie nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die den genannten Antikörper produzierende Zelle die gleiche Spezies wie die Partner-Zelle in der xenogenetischen Hybridoma Ursprungszelle hat.
4. Hybridoma Zell-Linie nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die den nicht-humanen Primaten-monoklonalen Antikörper produzierende Zelle ein Lymphozyt ist.
5. Hybridoma Zell-Linie nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der nicht-humane Primaten-monoklonale Antikörper ein Affen-monoklonaler Antikörper ist.
6. Hybridoma Zell-Linie nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die immortalisierte Ursprungszelle eine SP-2 Zell-Linie ist.
7. Verfahren zur Herstellung der Hybridoma Zell-Linie nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine xenogenetische Hybridoma-Zelle "drug"-resistent macht, diese dann mit einer Antikörper produzierenden Zelle, die genetisch mit der Partner-Zelle im xenogenetischen Hybridoma kompatibel ist, fusioniert und das erwünschte Hybrid selektioniert.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selektion eines gewünschten Hybrids aufgrund des Mangels an Sensitivität gegenüber HAT und der Prüfung auf die Fähigkeit, nicht-humane Primaten-monoklonale Antikörper zu erzeugen, erfolgt.
9. Zell-Fusionssystem, welches eine nicht-humane Primatenmonoklonale Antikörper produzierende Zelle und eine xenogenetische Hybridoma-Zelle umfaßt, fusioniert aus einer immortalisierten Zelle und einer Partner-Zelle, welche genetisch kompatibel mit der genannten Antikörper produzierenden Zelle ist, in einer Nährmedium-Kultur, zusammen mit einem Agens, welches die Fusion der genannten Zellen unterstützt.
10. Eine (Maus x Menschen) x nicht-Menschen Primaten Hybridoma Zell-Linie.
11. Eine (Maus x nicht-Menschen Primaten) x nicht-Menschen Primaten Hybridoma Zell-Linie.
12. Eine Zell-Linie gemäß Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine (Maus x Menschen) x Affen Hybridoma Zell-Linie ist.
13. Eine Zell-Linie gemäß Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine (Maus x Affen) x Affen Hybridoma Zell-Linie ist.
14. Hybridoma Zell-Linie, umfassend eine Trioma-Zelle, die mit einer nicht-humanen Primaten-monoklonale Antikörper produzierenden Zelle fusioniert wird, wobei die Trioma-Zelle die Fusion einer immortalisierten Zelle mit einem nicht-humanen Primaten Lymphozyten umfaßt und wobei die immortalisierte Zelle eine xenogenetische Hybridoma Zelle umfaßt, die aus einer Ursprungs-immortalisierten Zelle und einer Partner-Zelle fusioniert wird, und wobei der genannte Lymphozyt genetisch kompatibel ist, sowohl mit der genannten Partner-Zelle als auch mit der genannten Antikörper produzierenden Zelle.
15. Hybridoma Zell-Linie nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß die genannte Antikörper

produzierende Zelle den gleichen Genus wie der Lymphozyt hat.

- 5 16. Hybridoma Zell-Linie nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Lymphozyt den gleichen Genus wie die Partner-Zelle und die genannte Antikörper produzierende Zelle hat.
17. Zell-Linie nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie [(Maus x Menschen) x nicht-Menschen Primaten] x nicht-Menschen Primaten Zell-Linie ist.
- 10 18. Zell-Linie nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie [(Maus x Menschen) x Schimpansen] x Schimpansen Zell-Linie ist.
19. Zell-Linie nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie (Maus x Menschen) x Schimpansen Zell-Linie ist.