



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 231 007 A1

4(51) A 61 K 39/395

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP A 61 K / 267 877 6 (22) 01.10.84 (44) 18.12.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72) Noll, Franz, Dr. sc. nat.; Handschack, Wilhelm, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Eichmann, Evelyn, Dipl.-Biol.; Gaestel, Matthias, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Schadow, Dieter, Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interferon-alpha (HuIFN)

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interferon-alpha. Das Ziel der Erfindung ist die Herstellung monoklonaler Antikörper, die für die immunchemische Bestimmung und die immunaffinitätschromatographische Reinigung von menschlichem Interferon-alpha geeignet sind. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man Milzzellen von Mäusen, die mit Interferon immunisiert wurden, mit Plasmacytomzellen in der Zellkultur fusioniert, die antikörperbildenden Hybridome selektiert, die Eigenschaften der gebildeten monoklonalen Antikörper bestimmt, die spezifischen Hybridome auswählt und in üblicher Weise weiter vermehrt. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Medizin und die Biotechnologie.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interferon-alpha (HuIFN), **dadurch gekennzeichnet**, daß man Milzzellen von Mäusen, die mit Interferon immunisiert wurden, mit Maus-Plasmacytomzellen in der Zellkultur fusioniert, die antikörperbildenden Hybridome mittels Immunodot-Assay und Festphasen-Bioassay selektiert, die Eigenschaften der gebildeten monoklonalen Antikörper hinsichtlich ihrer Reaktivität mit HuIFN bestimmt und die Produktion der Antikörper durch die spezifischen Hybridomklone entweder in der Zellkultur oder in Ascitesform durchführt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die in der biotechnologischen und medizinischen Diagnostik angewendet und für die immunaffinitätschromatographische Reinigung von Interferon-alpha eingesetzt werden können.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Interferon-alpha wird von Lymphozyten in Folge einer Virusinfektion gebildet und verhindert dann die Ausbreitung der Virusinfektion auf andere Zellen, indem diese unter der Wirkung von Interferon-alpha einen sogen. antiviralen Status erwerben.

Monoklonale Antikörper gegen humanes Interferon-alpha gibt es seit 1980 (Secher, D. S. and D. C. Burke, Natur **285**, 446-450 (1980/)).

Die Herstellung dieser Antikörper erfolgte nach der bekannten Lymphozytenhybridomtechnik (Köhler, G. and C. Milstein, Nature **256**, 495-497 / 1975/). Solche Antikörper werden vorzugsweise für den Interferon-Nachweis bei der gentechnischen Herstellung von Interferon in Mikroorganismen und für die Isolierung und Reinigung der biosynthetisch gewonnenen Interferone eingesetzt.

Die Interferone sind eine heterogene Stoffklasse (Pesta, S. and S. Baron in Methods in Enzymology/ ed. S. Pestka/ Vol. 78, p. 3 Acad. Press 1981), so daß eine Vielzahl monospezifischer Antikörper gebraucht werden, um alle Interferon-alpha-Subtypen spezifisch erkennen zu können.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, monoklonale Antikörper gegen menschliches Interferon-alpha mit geeigneter Affinitätskonstante und großer Spezifität herzustellen. Solche Antikörper sollen zur Entwicklung eines Testbesteckes für menschliches Interferon-alpha und für die Präparation von Immunsorbentien zur immunaffinitätschromatographischen Reinigung von Interferon eingesetzt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interferon-alpha ist dadurch gekennzeichnet, daß man Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit gereinigtem HuIFN bis zum Erscheinen von Serumantikörpern immunisiert werden, mit Maus-Myelomzellen in der Zellkultur hybridisiert und die erhaltenen Hybridome in Mikrotiterplatten aussät. Die antikörperproduzierenden Hybridomklone werden zunächst mit einem Immunodot-Assay nachgewiesen. Dafür wird HuIFN auf kleine Nitrozellulosefilter aufgetragen, das so behandelte Filter mit den Hybridomüberständen inkubiert; nach Waschung erfolgt die Inkubation mit Anti-Antikörper-Enzymkonjugat und schließlich wird das Filter mit dem Enzymsubstrat behandelt. Die antikörperproduzierenden Hybridome werden kloniert und erfindungsgemäß auf ihre Verwendungsfähigkeit für immunchemische Bestimmungsmethoden und in der Immunaffinitätschromatographie geprüft. Die spezifischen Hybridomklone werden ausgewählt, weiter vermehrt, in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf für die Produktion von monoklonalen Antikörpern entweder in Ascitesflüssigkeit auf Mäuse transplantiert oder in Zellkultur vermehrt. Wesentliche Voraussetzung zur Durchführung der Erfindung ist der Antikörper-Hemmtest zur Bestimmung der Spezifität der einzelnen monoklonalen Antikörper hinsichtlich ihrer Erkennung der verschiedenen antigenen Determinanten auf den Interferonmolekülen.

Dieser Test kann folgendermaßen durchgeführt werden:

Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper werden an eine feste Phase gebunden, danach erfolgt die Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper, der eine bestimmte Determinante erkennt. Anschließend wird mit normalem Mausserum behandelt und danach mit ¹²⁵I-IFN im Gemisch mit einem zu testenden anderen monoklonalen Antikörper inkubiert. Wird keine Radioaktivität an die feste Phase gefunden, haben beide Antikörper die gleiche Spezifität. Die Erfindung ermöglicht die Herstellung spezifischer Antikörper gegen humanes Interferon-alpha, seine Subtypen und gentechnisch hergestellte modifizierte Formen und damit die Entwicklung von rationellen Testkits für die Medizin und Biotechnologie sowie für die Herstellung von effektiven Immunsorbentien zur Immunaffinitätschromatographie, die bei der industriellen Herstellung von humanem Interferon-alpha für medizinische Zwecke unbedingt gebraucht werden.

Auführungsbeispiel:

1. Herstellung der Hybridome

Balb/c-Mäuse werden mehrfach in mehrwöchigen Abständen mit etwa 10⁶ IU HuIFN-alpha i. p. und in die Fußsohlen immunisiert. Die Fusion der Milzzellen einer immunisierten Maus mit Maus-Plasmacytomzellen P3/X63-Ag8-6.5.3. (hergestellt von Kearny, I. F. et al., J. Immunolgy **123**, 1548-1550 / 1979/) erfolgt nach bekannten Verfahren (Köhler, G. and C. Milstein, Nature **256**, 495-497 / 1975/); Hudson, L. and F. C. Hay: Practical Immunology, 2. Auflage Oxford 1980). Die Hybridome werden in einem Selektivmedium angezüchtet. Die Klonierung und weitere Bearbeitung der Hybridome erfolgt in 96 well-Mikrotiterplatten.

2. Das Screening der angezüchteten Hybridome erfolgte mit einem Immunodot-Assay und mit einem Festphasen-Bioassay.

3. Der Antikörperhemmtest und die Bestimmung der Affinität werden mit den Kulturüberständen der verschiedenen Hybridomklone auf Anti-Interferon-Spezifität durchgeführt.

Eigenschaften der von den erhaltenen Hybridomklonen produzierten monoklonalen Antikörpern:

Eigenschaften	Monoklonale Antikörper ZIM-IIB2	ZIM-IIG7
IgD-Klasse	IgG1	IgG1
Affinität (1/Mol)	>10 ⁸	noch nicht getestet
Interferon-Subtypenspezifität	noch nicht bestimmbar	noch nicht bestimmbar
Antigendeterminante	I	noch nicht bestimmt
Eignung zur Immunaффinitäts- chromatographie	sehr gut	noch nicht bestimmt

4. Herstellung der Antikörper

Die Gewinnung der Antikörper erfolgt aus der Kulturflüssigkeit der kultivierten oder aus der Ascitesflüssigkeit der transplantierten Hybridomzellen entsprechend üblicher Verfahren.