



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 5/02
C 07 K 15/28

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 342 981 5	(22)	23.07.90	(44)	12.12.91
(71)	siehe (73)				
(72)	Meyer, Udo, Dr. sc. nat., DE; Fiedler, Raimund, Dr. med., DE; Knoll, Mario, Dipl.-Biol., DE; Gottschall, Anke, Dr. rer. nat., DE; Verbitzky, Michail, Prof. Dr. sc. med., SU				
(73)	Forschungszentrum für Tierproduktion Dummerstorf – Rostock, O - 2551 Dummerstorf, DE				
(74)	siehe (73)				

(54) Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen gonadotrope Hormone

(55) Hybridom; monoklonale Antikörper; humanes Choriongonadotropin; gonadotrope Hormone; Immunoassay; Diagnostik; Sexualzyklus; Affinitätschromatographie
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mAk gegen unterschiedliche Epitope von hCG. Das Verfahren hat das Ziel, auf einfache Art und Weise die kostengünstige Produktion großer Mengen mAk, die mit unterschiedlichen Epitopen des hCG spezifisch reagieren, zu ermöglichen. Unter Verwendung spezifischer Hybridome werden mAk erzeugt, die mit verschiedenen Determinanten des hCG spezifisch reagieren, wobei einzelne mAk die biologische Wirkung des hCG blockieren und andere nicht. Die Hybridome hCG 10, hCG 31 und hCG 55 produzieren solche spezifischen Ak bei Kultivierung in vitro und in vivo, so daß die selben unaufwendig gewonnen werden können. Die mAk eignen sich für 2-Seitenbindungsteste, zur Hormonneutralisation und zur affinitätschromatographischen Isolierung von hCG. Anwendungsgebiete sind die medizinische Diagnostik und biotechnologische Verfahren zur Beeinflussung des Sexualzyklusses von Mensch und Tier und zur Isolierung des Hormons. Die Hinterlegung der Zellklone erfolgte in der ZIM-Hinterlegungsstelle für Zelllinien beim Zentralinstitut für Molekularbiologie unter folgenden Nummern:
D 38/1–5 – (pr) ZIM-0480, D 11/1–4,6 – (pr) ZIM-0481 D 83/1–5 – (pr) ZIM-0482

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen gonadotrope Hormone mit breiter Kreuzreaktivität durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit offizinalem hCG, Fusion ihrer Milzzellen mit Maus-Myelomzellen, Selektion von Hybridomen, welche kreuzreaktive Antikörper gegen gonadotrope Hormone produzieren und ihre Kultivierung bzw. Transplantation in Mäuse, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Kultivierung bzw. Transplantation die Hybridomklone D 11/1–4, 6; D 38/1–5 und D 83/1–5 eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope des humanen Choriongonadotropins (hCG), die sich für 2-Seiten-Bindungstests, zur Hormonneutralisation und zur Affinitätschromatographischen Isolierung von hCG eignen.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik sowie biotechnische Verfahren zur Beeinflussung des Sexualzyklus von Mensch und Tier und zur Isolierung des Hormons.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Bestimmung von gonadotropen Hormonen bei Mensch und Tier erfolgt z. Z. mit polyklonalen Antisera.

Nachteile ihres Einsatzes sind, daß Seren verschiedener Individuen Antikörper unterschiedlicher Qualitäten (Spezifität, Affinität, Avidität) enthalten. Damit sind Chargenunterschiede nicht vermeidbar. Eine spezielle Anpassung der Testbedingungen ist von Serumcharge zu Serumcharge unumgänglich.

Zur Zeit sind mAK gegen gonadotrope Hormone wie hCG, LH und FSH bekannt. Dabei handelt es sich sowohl um hCG-spezifische, mit dem Gesamtmolekül reagierende Ak (DD-PS 244565, DD-PS 257586) als auch um solche, die mit der α -Untereinheit der Hormone TSH, FSH, LH und hCG reaktiv sind (DD-PS 259136) oder Kreuzreaktivität mit dem Gesamtmolekül von hCG, FSH und LH besitzen (DD-PS 244564). Das erfordert zur Bestimmung dieser Hormone eine große Palette einzelner mAK, die mit einer Vielzahl von Hybridisierungen arbeits- und kostenaufwendig hergestellt werden müssen.

Bekannt ist ferner die Herstellung der mAK nach dem von Kühler und Milstein beschriebenen Verfahren (Nature 256 [1975] S. 495).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist eine kostengünstige und quantitative Bestimmung gonadotroper Hormone mittels Immunassays, ihre Affinitätschromatographische Reinigung nach deren Ankopplung an einen festen Träger und die gezielte Beeinflussung des Sexualzyklus weiblicher Tiere durch ihre Injektion.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein nachvollziehbares Verfahren zur Herstellung mAK gegen gonadotrope Hormone von Mensch und Tier anzugeben, in dessen Verlauf zunächst Hybridome bekannterweise erzeugt werden. Unter Verwendung dieser Hybridome sollen mAK produziert werden, die mit gonadotropen Hormonen reagieren und sich zur quantitativen Bestimmung und Isolierung sowie zur Veränderung der biologischen Aktivität gonadotroper Hormone eignen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß zunächst offizinales hCG als Immunogen zur Immunisierung verwendet wird. Vorzugsweise werden 6 bis 8 Wochen alte Balb/c-Mäuse zur Immunisierung verwendet. Die Immunisierung der Tiere wird durch mehrmalige Gabe des Immunogens induziert. Aus den Milzen werden die Lymphozyten in an sich bekannter Weise präpariert. Die B-Lymphozyten dieses Zellgemisches werden mit murinen Myelomzellen fusioniert. Die geeigneten Maus-Myelomzellen P3-X63AgB.653 (Kearney et al., J. Immunol. 123 [1979] S. 1548) werden in RPMI-1640-Medium mit fetalem Kälberserum (FKS) gezogen. Die Fusion wird durch Polyethylenglycol ausgelöst. In einem Kulturmedium, welches Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (Littlefield, Science 145 [1964] S. 709), werden die geeigneten Hybridzellen von den nicht fusionierten Myelomzellen abgetrennt und erfindungsgemäß Zellklone selektiert, die Ak der gewünschten Spezifität und der anderen gewünschten Eigenschaften sezernieren. Die Selektion erfolgt in der Weise, daß die Zellen unmittelbar nach der Fusion in eine Vielzahl von separaten 200- μ l-Kulturen ausplattiert werden.

Die Überstände der die aufgewachsenen Hybridzellen enthaltenden Kulturen werden auf die Anwesenheit von Ak getestet, die sich an festphasenadsorbiertes hCG u. a. gonadotrope Hormone von Mensch und Tier binden.

Hierzu werden die Kulturüberstände in einem entsprechenden Immunassay geprüft. Unter den Ak-produzierenden Hybridomen werden dann in einem 2. Selektionsschritt diejenigen Hybridome ausgewählt, die Ak mit unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten gegen gonadotrope Hormone von Mensch und Tier produzieren.

Die durch eine entsprechende Selektion erhaltenen Hybridome werden kloniert und hochproduktive Subklone selektiert, die die gewünschten mAK stabil in einer hohen Konzentration sezernieren. Die so erhaltenen Hybridome erhielten die Bezeichnung D 11/1–4, 6; D 38/1–5 und D 83/1–5.

Die Herstellung der genannten mAK basiert auf einem Verfahren, welches auf die In-vitro- oder In-vivo-Kultur der Hybridome D 11/1–4, 6; D 38/1–5 und D 83/1–5 ausgerichtet ist.
Die spezifischen Hybridome wurden in der ZIM-Hinterlegungsstelle für Zelllinien im Zentralinstitut für Molekularbiologie unter folgenden Nummern hinterlegt:

Name des Klons	Reg.-Nr.
D 38/1–5	(pr) ZIM-0480
D 11/1–4,6	(pr) ZIM-0481
D 83/1–5	(pr) ZIM-0482

Die von diesen Klonen produzierten Antikörper weisen die in nachfolgender Tabelle aufgeführten wertvollen und überraschenden Eigenschaften gegen gonadotrope Hormone auf:

Antigene Gruppe	Klon	Reaktivität der mAK
1	D 11/1–4,6	hCG, β hCG, pLH, bLH, hLH
2	D 83/1–5	hCG, hLH, eLH, hFSH, hTSH
3	D 38/1–5	hCG, hLH, eLH, ePMSG

Wie aus der Darstellung ersichtlich, binden die mAK als immobilisierte und gelöste gonadotrope Hormone spezifisch, wobei sie auch in oberflächengebundener Form gonadotrope Hormone binden und damit zur affinitätschromatographischen Isolierung derselben geeignet sind. Die Antikörper D 11/1–4, 6; D 38/1–5 und D 83/1–5 beeinflussen die In-vivo-Wirkung gonadotroper Hormone.

Auf Grund der dargestellten Reaktionen mit unterschiedlichen Epitopen und antigenen Regionen können mit Hilfe der D 11/1–4; D 38/1–5 und D 83/1–5 Immunassays für gonadotrope Hormone von Mensch und Tier aufgebaut werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert.

1. Immunisierung von Balb/c-Mäusen

Als Immunisierungsantigen wurde ein offizinales hCG-Präparat verwendet.

Weibliche Balb/c-Mäuse wurden intraperitoneal mit 100 μ g hCG-Präparat 0,2 ml kompletten Freundschens Adjuvans immunisiert, 14 Tage später intraperitoneal mit der gleichen Antigenmenge in inkompletten Freundschens Adjuvans und 2 $\times$ in 14tägigen Abständen mit jeweils 50 μ g Antigen in 100 μ l PBS intravenös geboostert. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen der Tiere gewonnen.

2. Präparation der Milzzellsuspension

Aus den entnommenen Milzen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. Dazu wurden die Organe mechanisch zerstört, die erhaltene Organsuspension mehrmals durch eine enge Kanüle gepreßt und abschließend durch ein Homogenisator-Gazefilter passagiert. Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin supplementiert war, überführt. Die Zellen wurden dreimal mit RPMI-1640 gewaschen und anschließend in der gewünschten Konzentration im selben Medium resuspendiert. Im Durchschnitt wurden 2×10^8 Zellen/Milz gewonnen.

3. Präparation der Myelomzellen

Die hier verwendete Myelomzelllinie P3-X63 Ag 8.653 produziert keine schweren und leichten Ketten von Immunglobulinen (J. Immunol. 123 [1980], 1543–1550). Die Zellen sind gegen 20 μ g/ml 8-Azaguanin sensitiv und können in Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) enthält, nicht mehr kultiviert werden. Sie wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 20 mM Glutamin, 10 mM HEPES, 10 mM NaHCO_3 , 1000 Einheiten/ml Penicillin, 100 μ g Streptomycin und 10% fetalem Kälberserum supplementiert war (komplettes Medium), kultiviert. Die Myelomzellen befanden sich zum Zeitpunkt der Fusionierung in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellvermehrung.

4. Zellfusion

Die Milzzellsuspension wurde zu den Myelomzellen in RPMI-1640-Medium ohne Serum in einem Verhältnis von 10:1 zugesetzt und 10 min bei 200 g zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde vorsichtig abgehebert. Die Zellen wurden durch langsames Zusetzen von 1 ml einer 50%igen Polyethylenglykollösung 1500 (verdünnt in RPMI-1640, pH 7,6) über 1 min und einer Inkubation für 1 min bei 37°C fusioniert. Anschließend erfolgte eine schrittweise Zugabe von 15 ml RPMI-1640-Medium, verbunden mit einer vorsichtigen Resuspendierung der Zellen. Diesem Schritt folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 200 g und eine Resuspendierung des Zellpellets in 40 ml HAT-Medium in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml. Diese Zellsuspension wurde in 200- μ l-Portionen in 96er Zellkulturplatten ausgebracht.

5. Selektion und Anzucht der Hybridome

Nach der Zellfusion wurden die Zellen im HAT-Medium bei 37°C in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre mit 98 bis 100% H_2O -Sättigung kultiviert.

Nach ca. 2 Wochen erfolgte das Screening der Überstände von Hybridomzellkulturen auf das Vorhandensein von Aktivität gegen gonadotrope Hormone (hCG – α - und β -Kette, LH – human, porcine, bovine, equine, FSH und PMSG) von Mensch und Tier mittels eines geeigneten Immunoassays.

Diejenigen Hybridomzellkulturen, die positive Resultate im Immunoassay erbrachten, wurden zur Klonierung verwendet. Dazu wurden die Hybridome einer Endpunktverdünnung unterzogen, bei der in 96er Zellkulturplatten im Mittel 1 Zelle/Kulturgefäß ausgesät wurden, wobei 10^5 Mäuseperitonealzellen/Depot als „Feederzellen“ zugegeben wurden. Die Zellen, die nach der Klonierung noch Antikörper gegen gonadotrope Hormone produzierten, wurden vermehrt, rekloniert und anschließend in flüssigem Stickstoff in kompletten RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 7% Dimethylsulfoxid aufbewahrt.

6. Herstellung großer Mengen monoklonaler Antikörper

Klonierte Hybridome (ca. 2×10^6 Zellen) wurden Mäusen, die durch intraperitoneale Injektion von 0,5ml Paraffinum subliquum vorbehandelt waren, intraperitoneal injiziert, um antikörperenthaltende Ascitesflüssigkeit nach etwa 10 bis 15 Tagen gewinnen zu können. Die Antikörperaktivität in der Ascitesflüssigkeit wurde in einem indirekten Festphasen-EIA bestimmt.

7. Bestimmung der gegen gonadotrope Hormone gerichteten Antikörperaktivität in Kulturüberständen und Asciti

100 µl Zellkulturüberstand bzw. in 1-g-Stufen titrierter Ascites wurden auf Mikrotiterplatten gegeben, an die 5 IE hCG/Kavität über Nacht bei 4°C adsorbiert worden waren. Vor Auftrag der Proben wurde 3mal mit PBS-0,05% Tween 20 gewaschen. Nach einstündiger Probeninkubation wurde wiederum 3mal mit PBS-0,05% Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden 100 µl POD-markiertes Ziege-anti-Maus-Serum zugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert. Der Nachweis der abgelaufenen Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte nach abermaligem Waschvorgang durch Einpipettieren von 200 µl Substratlösung. Die Konzentration des entstandenen gefärbten Produktes wurde nach Abstoppen der Reaktion mit 50 µl 2 N H_2SO_4 in einem Photometer bestimmt.

8. Typisierung der monoklonalen Antikörper

Die Klassen und Unterklassen der hier beschriebenen monoklonalen Antikörper wurden analysiert. Die Antikörper wurden aus dem Kulturüberstand durch Fällung mit Ammoniumsulfat (50% Sättigung) angereichert oder aus dem Ascites durch Ammoniumsulfatfällung und anschließende Chromatographie an DEAE-Cellulose bzw. durch Affinitätschromatographische Isolierung an Protein A-CNBr-Sepharose 4B partiell gereinigt. Unter Verwendung von Klassen- und Subklassen-spezifischen Anti-Maus-Immunglobulin-Antisera wurde die Immunglobulinsubklasse im direkten Enzymimmunoassay bestimmt. Danach gehören die getesteten mAK der Hybridome D 11/1–4, 6; D 38/1–5 u. D 83/1–5 sämtlich der Klasse IgG, Subtyp 1, an.

9. Kreuzreaktion des Antikörpers mit gonadotropen und thyreotropen Hormonen

Die Kreuzreaktivität der monoklonalen Antikörper wurde mittels eines indirekten Konkurrenz-Festphasen-EIA geprüft. Dazu wurde einer Standardverdünnung des zu untersuchenden mAK eine Verdünnungsreihe (1 bis 10 µg) konkurrierendes Antigen (β -hCG, α -hCG, hLH, pLH, eLH, FSH, TSH und deren α -Untereinheiten und PMSG) zugegeben. Durch Reduktion der Bindung der geprüften mAK mit dem an die feste Phase adsorbierten hCG wurde die in der Tabelle 1 dargestellte Kreuzreaktivität der genannten mAK ermittelt.