



(12) **Wirtschaftspatent**

Teilweise bestätigt gemäß § 18 Absatz 1
Patentgesetz

(19) **DD** (11) **242 423 B1**

4(51) **C 12 N 5/00**
A 61 K 39/395

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP C 12 N / 281 907 4	(22)	21.10.85	(45)	11.05.88
				(44)	28.01.87

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Karsten, Uwe, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Micheel, Burkhard, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Kössler, Alois, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol., DD

(54)	Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Rinderserumalbumin (RSA)
------	--

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Rinderserumalbumin (RSA) durch Fusion von Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit gereinigtem RSA immunisiert wurden, mit Myelomzellen in der Zellkultur, Selektion antikörperproduzierender Hybridome, deren Klonierung und nachfolgende Vermehrung, **dadurch gekennzeichnet**, daß X63-Ag 8.653 Myelomzellen eingesetzt und die Antikörper durch Kultivierung oder durch Transplantation in Ascitesform des Hybridoms A23-A/D3 (ZIM-Liste 1983: 0004) produziert werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Rinderserumalbumin (RSA). Anwendungsgebiet der Erfindung sind die biologisch-medizinische Grundlagenforschung, die biologische und medizinische Diagnostik und die Biotechnologie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Albumin ist das mengenmäßig vorherrschende Protein im Serum von Säugetieren. RSA wird als Trägerprotein für die unterschiedlichsten niedermolekularen Substanzen verwendet, um z. B. deren Stabilität oder Immunogenität zu erhöhen. Es ist Bestandteil vieler Zellkulturmedien und tritt damit häufig als Nebenprotein bei der Gewinnung von Bioprodukten aus Zellkulturen auf. Nachweis sowie Anreicherung oder Entfernung von RSA sind daher regelmäßig notwendige biochemische Aufgaben. Für Nachweisverfahren eignen sich Immuntests am besten. Für die Anreicherung bzw. Entfernung von RSA ist die Immunaффinitätschromatographie die Methode der Wahl. Die Bereitstellung von spezifische Antikörpern gegen RSA ist für diese Methoden unbedingte Voraussetzung. Monoklonale Antikörper erfüllen die Anforderungen am besten, da sie in großen Mengen in hoher Reinheit und Spezifität produziert werden können.

Die Herstellung dieser Antikörper erfolgt durch die Technik der Zellfusion und Selektion antikörperproduzierender Hybride. Im EP 131 415 werden monoklonale Antikörper gegen RSA (Hybridomklon KM-10, Myelomlinie F5-U 1) der Immunglobulinklasse IgG1 beschrieben. Diese Antikörper sind bezüglich Spezifität und Affinität nicht für den Aufbau von hochempfindlichen Testsystemen geeignet.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, weitere monoklonale Antikörper mit verbesserten Eigenschaften gegen Rinderserumalbumin herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen RSA ist dadurch gekennzeichnet, daß man Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit gereinigtem RSA immunisiert wurden, mit X63-Ag 8.653 Myelomzellen fusioniert, die Hybride in einem Selektivmedium kultiviert und auf die Produktion spezifischer Antikörper prüft. Dies kann mit einem Festphasen-Fluoreszenztest erfolgen, der folgendermaßen durchgeführt wird:

Anti-Maus-Immunglobulin wird an Nitrozellulose-Plättchen gebunden, danach erfolgt eine Inkubation mit dem Kulturüberstand der Hybridome und anschließend eine weitere mit RSA, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde.

Die Auswertung erfolgt in einem Mikrofluorometer. Die positiven Hybride werden kloniert und zur Produktion der monoklonalen Antikörper entweder in der Zellkultur weiter vermehrt oder auf Mäuse in der Ascitesform transplantiert (Antikörpertiter in Ascites $> 10^6$). Der Hybridomklon ist frei von Mykoplasma und wächst sehr gut im Medium mit Pferdeserum.

Der auf erfindungsgemäße Weise hergestellte monoklonale Antikörper (mAK) gegen RSA gehört der Immunglobulinklasse IgG2a an und reagiert mit Protein A. Damit werden die analytischen und präparativen Möglichkeiten gegenüber den bisher bekannten Antikörpern erheblich erweitert (keine Reaktion mit Protein A). Im Sandwich-ELISA können unter Benutzung dieses mAK < 7 ng RSA nachgewiesen werden. Der erfindungsgemäß hergestellte mAK weist keine Kreuzreaktivität mit humanem Serumalbumin auf.

Die entscheidenden Vorteile dieses mAK liegen also darin, daß er sehr spezifisch und hochtitrig ist und mit Protein A reagiert. Wesentliche Voraussetzung für die Herstellung von monoklonalen Anti-RSA-Antikörpern ist die Verwendung eines Zellkulturmediums, das frei von RSA ist. Geeignet ist das Zellzuchtmedium RPMI 1640 mit einem Zusatz von 10% Pferdeserum.

Ausführungsbeispiel

- 1) Herstellung der Hybridome: Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit gereinigtem Rinder-Serumalbumin immunisiert worden waren, wurden mit X63-Ag 8.653 Myelomzellen gemäß üblichen Techniken fusioniert (KÖHLER, G. und C. MILSTEIN, Nature 1975, 256, 495–497; HUDSON, L. und F. C. HAY, Practical Immunology, 2. Aufl., Oxford 1980). Die Myelom-Zelllinie X63-Ag 8.653 wurde von KEARNY, J. F., A. RADBRUCH, B. LIESEGANG und K. RAJEWSKY, J. Immunol. 1979, 123, 1547–1557 beschrieben. Als Zellkulturmedium diente RPMI 1640 mit 10% Pferdeserum.

- 2) Die Selektion antikörper-produzierender Hybride mit einem Festphasen-Fluoroimmunttest erfolgte analog der Methode von MICHEL, B., KARSTEN, U. und H. FIEBACH, J. Immunol. Meth. 1981, **46**, 41–46.
- 3) Positive Hybridome wurden vermehrt und in flüssigem Stickstoff konserviert. Antikörper wurden sowohl in vitro (Kulturüberstand) als auch in vivo (Aszitesflüssigkeit) produziert.
- 4) Folgender Hybridomklon, der monoklonale Antikörper gegen RSA erzeugt, wurde erhalten:
A23-A/D3

Er wurde in der ZIM-Hinterlegungsstelle für Zelllinien unter der Nummer ZIM-0004 hinterlegt. Spezifitätstests ergaben eine ausschließliche Reaktion mit RSA, nicht jedoch mit humanem Serumalbumin (HSA).