



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **255 543 A1**

4(51) C 12 N 5/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 295 624 2

(22) 27.10.86

(44) 06.04.88

(71) Wilhelm-Pieck-Universität Rostock, Universitätsplatz 1, Rostock, 2500, DD

(72) Siegl, Edda, Dr. sc. nat.; Schütt, Christine, Dr. sc. med.; Claus, Renate, Dr. med.; Friemel, Helmut, Prof. Dr. sc. med., DD

(54) **Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers**

(55) Immunologie, monoklonale Antikörper, menschliche Monozyten

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein Antigen von menschlichen Monozyten. Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper anzugeben, das in leicht beherrschbarer Weise die kostengünstige Produktion von größeren Mengen spezifischer Antikörper gegen Membrantigene humaner Monozyten gestattet. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein nachvollziehbares Verfahren anzugeben, in dessen Verlauf zunächst Hybridome erzeugt werden, die leicht und ohne Aufwand handhabbar sind und deren Kultivierung in technisch und ökonomisch vorteilhafter Weise möglich ist. Unter Verwendung dieser Hybridome sollen in anschließenden Verfahrensschritten monoklonale Antikörper erzeugt werden, die mit Antigenen reagieren, die sich auf der Membran von menschlichen Monozyten befinden. Die Aufgabe wird gelöst durch die Erzeugung des Hybridoms RoMo 1, dessen Kultivierung in vitro oder in vivo und Abtrennung des monoklonalen Antikörpers RoMo 1.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die humane Monozyten erkennen, **dadurch gekennzeichnet**, daß weibliche Balb/c-Mäuse mit humanen adhärenenten mononukleären Zellen immunisiert werden, die Milzzellen der hyperimmunen Mäuse mit Myelomzellen hybridisiert werden, Hybridomzellen RoMo 1 selektioniert werden, die selektionierten Hybridomzellen kultiviert oder in Mäuse injiziert werden, die Kulturflüssigkeit oder die Ascitesflüssigkeit gewonnen und der Antikörper RoMo 1 isoliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Hybridomzellen RoMo 1 kloniert und rekloniert werden und ein Subklon selektioniert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Immunisierung 6–8 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Myelomzellen solche die Linie P3-x63-Ag8.653 eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 3 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Immunisierung der Mäuse durch drei Injektionen von humanen adhärenenten mononukleären Zellen erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1 und 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die letzte Immunisierung 4 Tage vor der Isolierung der für die Hybridisierung bestimmten Milzzellen vorgenommen wird.
7. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verhältnis von Myelomzellen zu Milzzellen, die zur Fusion bestimmt sind, etwa 1:1 beträgt.
8. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Verfahrensschritt die Abtrennung der nicht hybridisierten Myelomzellen von den Hybridzellen durch das verwendete Kulturmedium enthalten ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Kulturmedium RPMI-1640 verwendet wird.
10. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß dem Kulturmedium 10mM HEPES, $5 \cdot 10^{-5}$ M Mercaptoethanol, 0,6g/l Glutamin, 10^6 IU Penicillin und 0,2g/l Streptomycin/l zugesetzt werden.
11. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 9 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß dem Medium fetales Kälberserum oder Rinderserum zugesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 1, 10 und 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Anteil des fetalen Kälberserums am Kulturmedium 10%, der des Rinderserums ebenfalls 10% beträgt.
13. Verfahren nach Anspruch 1, 9 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei 37°C kultiviert wird.
14. Verfahren nach Anspruch 1, 9 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß der CO₂-Gehalt der Atmosphäre über dem Kulturmedium ca. 5% beträgt.
15. Verfahren nach Anspruch 1 und 9–14, **dadurch gekennzeichnet**, daß über dem Kulturmedium hohe Luftfeuchtigkeit herrscht, die bis zur Sättigung der Atmosphäre mit Wasserdampf reichen kann.
16. Verfahren nach Anspruch 1 und 9–15, **dadurch gekennzeichnet**, daß 3–4 Tage kultiviert wird.
17. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß von der gewonnenen Kulturflüssigkeit die zellulären Bestandteile abgetrennt werden, der klare Überstand, der den monoklonalen Antikörper RoMo 1 enthält, entweder direkt weiter verwendet wird oder Reinigungs- und Anreicherungsoperationen unterzogen wird, wie z. B. Affinitätschromatografie an Protein A-Sepharse 4B.
18. Verfahren nach Anspruch 1 und 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß der gereinigte oder ungereinigte Kulturüberstand nach Lyophilisieren in eine dauerhafte Aufbewahrungsform überführt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 1 und 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß die abgetrennt zellulären Bestandteile, die aus Zellen des Hybridoms RoMo 1 bestehen, erneut in Kultur genommen werden können.
20. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der lyophilisierte Antikörper RoMo 1 bei +4°C aufbewahrt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper für Antigene humaner peripher Blutmonozyten.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bereits bekannt, monoklonale Antikörper herzustellen. Köhler und Milstein (Nature **256** [1975], 495) haben durch Fusion antikörperbildender Zellen mit einer permanent wachsenden Plasmazytomlinie eine Hybridzelllinie erzeugt, die permanent wächst und stabil Antikörper sezerniert. Diese Prinziplösung hat dazu geführt, daß verschiedene Hybridomlinien, die Antikörper unterschiedlicher Spezifität produzieren, hergestellt worden sind. So sind monoklonale Antikörper bekannt, die mit menschlichen Monozyten z. T. spezifisch reagieren (Nunez, G., Vgolini, V., Capra, J. D., Stastny, P., Scand. J. Immunol **16** [1982] 525–523, Fiebig, H., Behn, J., Kupper, H., Ambrosius, H.: 1983).

Es sind jedoch keine Hybridomlinien bekannt, die in hoher Ausbeute den monoklonalen Antikörper RoMo 1 produzieren.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper anzugeben, das in leicht beherrschbarer Weise die kostengünstige Produktion größerer Mengen spezifischer Antikörper für Zelloberflächenantigene menschlicher Monozyten gestattet. Dabei soll gleichbleibende Qualität gewährleistet sein, die Antikörper sollen stabil und damit lagerfähig sein und sich zur Verwendung in einem einfachen und exakten Nachweistest für humane Monozyten eignen, wobei Kreuzreaktionen mit Zelloberflächenantigenen anderer Zellen nicht vorkommen sollen. Durch das Zurverfügungstellen der monoklonalen Antikörper soll der Stand der Technik bereichert werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein nachvollziehbares Verfahren anzugeben, in dessen Verlauf zunächst Hybridome erzeugt werden, die leicht und unaufwendig handhabbar sind und deren Kultivierung in technisch und ökonomisch vorteilhafter Weise möglich ist. Unter Verwendung dieser Hybridome soll in anschließenden Verfahrensschritten ein monoklonaler Antikörper erzeugt werden, der mit auf Monozyten ausgeprägten Antigenen reagiert. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß zunächst nach einem an sich bekannten Verfahren adhärente mononukleäre Zellen aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert werden. Durch zweifache Adhärenz an Glas werden die adhärennten mononukleären Zellen abgetrennt. Mit in der vorstehend beschriebenen Art und Weise gewonnenen humanen adhärennten mononukleären Zellen werden erfindungsgemäß Mäuse immunisiert. Es werden 6–8 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse verwendet. Die Immunisierung erfolgt durch dreimalige Applikation des Antigens, wobei zwischen der zweiten und dritten Injektion mindestens 4 Wochen Abstand liegen. Aus den Milzen derart hyperimmunisierter Mäuse werden in an sich bekannter Weise Lymphozyten separiert. Die B-Lymphozyten dieses Zellgemisches werden mit Maus-B-Myelomzellen fusioniert bzw. hybridisiert. Die notwendigen Maus-Myelomzellen P3-X-63Ag8.653 (Kearney et. al., J. Immunol. **123** [1979]) werden in RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum oder Rinderserum gezüchtet. In einem Kulturmedium, welches Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (Littlefield, Science **145** [1964] 709), werden die gebildeten Hybridome von den nichtfusionierten Myelomzellen abgetrennt und erfindungsgemäß Zellklone selektioniert, die Antikörper der gewünschten Art sezernieren. Die Selektionierung der Hybridome erfolgt dadurch, daß die Zellen unmittelbar nach der Fusion in zahlreiche 2 ml-Kulturen aufgeteilt werden. Die Überstände der die aufwachsenden Hybridzellen enthaltenen Kulturen werden auf die Anwesenheit von Antikörpern überprüft, die nur mit Membranantigenen von menschlichen Monozyten reagieren.

Hierzu wurden alle Kulturüberstände mit angereicherten Blutmonozyten getestet. Nur die Kulturen wurden weiter verwendet, die mit den angereicherten Blutmonozyten reagieren. Mit der Immunfluoreszenztechnik wurde die Reaktion mit weiteren Zellen, wie Lymphozyten, Granulozyten, Thrombozyten, Erythrozyten ausgeschlossen.

Die durch diese Selektion erhaltenen Hybridome wurden rekloniert, Subklone selektioniert und zur Produktion von RoMo 1-Antikörpern weiter kultiviert. In der im folgenden beschriebenen Verfahrensweise wird auf dieses Hybridom abgestellt, das an der Wilhelm-Pieck-Universität Rostock, Bereich Medizin kultiviert wird und zugänglich ist.

Das Hybridom RoMo 1 wird vorwiegend in der Kultur gezüchtet. Der Kulturüberstand wird lyophilisiert und ist so dauerhaft lagerfähig. Eine Reinigung über Affinitätschromatographie mit Protein-A-Sepharose 4B ist ebenfalls möglich. Die Anreicherung führt zu einem hochreinen Antikörper. Eine Produktion in der Ascitesflüssigkeit von Balb/c-Mäusen ist ebenfalls möglich, nachdem die entsprechenden Hybridomzellen in die Bauchhöhle der Mäuse injiziert werden.

Das Kulturmedium ist RPMI-1640 mit dem Zusatz von 0,85 g/l NaHCO_3 10 mM HEPES, 5×10^{-5} M Mercaptoethanol, 10^6 IU Penicillin, 0,2 g/l Streptomycin versehen.

Als Serumzusatz dient fetales Kälberserum oder Rinderserum mit einem Anteil von 10% im Kulturmedium. Die Temperatur bei der Kultivierung sollte ca. 37°C betragen, der CO_2 -Gehalt in der Atmosphäre ca. 5%. Eine hohe Luftfeuchtigkeit ist notwendig. Die Kultur der Hybridomzellen erfolgt über 3–5 Tage.

Der nach einer der beiden Verfahrensvarianten hergestellte Antikörper RoMo 1 weist das in der Tab. 1 angegebene Reaktionsmuster mit humanen Blutzellen bzw. menschlichen Zelllinien auf.

Der monoklonale Antikörper RoMo 1 reagiert spezifisch mit menschlichen Monozyten. Er kann als pan-Monozyten-Antikörper angesehen werden und deshalb sowohl in der Diagnostik immunologischer Erkrankungen als auch bei den Untersuchungen über die Regulation des Immunsystems eingesetzt werden. Er weist ein frühes Differenzierungsantigen der monozytären Entwicklungsreihe nach.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel erläutert werden.

Hybridomzellen RoMo 1 werden auf eine Zelldichte von $1-5 \times 10^5$ Zellen/ml Kulturmedium eingestellt und in Gewebekulturflaschen kultiviert. Das Kulturmedium besteht aus RPMI-1640, das mit NaHCO_3 (0,85 g/l), Mercaptoethanol 5×10^{-5} M, 10^6 IU/l Penicillin, Streptomycin 0,2 g/l und N-2-Hydroxy-ethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (10 mM/l) HEPES ergänzt wird. Diesem Medium wird a) fetales Kälberserum, b) Rinderserum zugesetzt. Die möglichen Anteile sind 5–20%. 10%

sind besonders günstig. Die günstigsten Kulturbedingungen werden erreicht, wenn die Zellen bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten 5%igen CO₂-Atmosphäre bebrütet werden. Nach 3–5 Tagen werden die Zellkulturüberstände steril entnommen. Die z. T. an der Gefäßwand haftenden Zellen können erneut mit frischem Medium versorgt und bebrütet werden. Dabei soll die o. a. Zelldichte erreicht werden. Die im Kulturüberstand enthaltenen Hybridzellen werden durch Zentrifugieren abgetrennt. Die zellfreien Überstände enthalten den monoklonalen Antikörper RoMo 1. Ein reiner Antikörper kann durch Affinitätschromatografie (Sephrose 4B fixiertes Protein A) gewonnen werden. Die Bindungsoptimum liegt bei 10 µg/ml.

Tabelle 1

Spezifitäten (Zellen) gesunder Spender	Nachweis des Antigens mit Immunfluoreszenz
Erythrozyten	—
Thrombozyten	—
adhärente mononukleäre Zellen (90 % Monozyten)	+ 88 %
Lymphozyten	—
E ⁺	—
E ⁻	+
Granulozyten	—
T-Blasten	—
B-Zellen	—
NK-Zellen	—
Alveolarmakrophagen	—
HL-60 } Myeloide Linien	—
U937 }	
K562 Erythroide Linie	—