



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **264 025 A1**

4(51) **C 12 N 5/02**  
**A 61 K 39/395**

**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21) WP C 12 N / 306 370 6 (22) 26.08.87 (44) 18.01.89

---

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD  
(72) Schneider, Frank, Dipl.-Stom.; Zacharias, Ute, Dipl.-Biochem.; Will, Horst, Prof. Dr. sc. Dr. rer. nat.; Noll, Franz, Dr. Dr. sc. nat.; Handschack, Wilhelm, Dipl.-Biol. Dr. rer. nat., DD

---

(54) **Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen Plasminogenaktivator Urokinase (HuUK)**

---

(55) monoklonale Antikörper, Plasminogenaktivator, Urokinase, Spezifität, Milzzellen, Myelomzellen, Fusion, Hybridzellklon, Hinterlegung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern hoher Spezifität gegen den humanen Plasminogenaktivator Urokinase. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Medizin und die Biotechnologie. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst in an sich bekannter Weise Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit Urokinase immunisiert wurden, mit Maus-Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die antikörperproduzierenden Hybridzellen selektiert, kloniert, weitervermehrt und erfindungsgemäß zur Produktion der monoklonalen Antikörper durch Kultivierung oder nach Transplantation einsetzt. Die spezifischen Hybridzellklone ZIM-Uk-IE2, ZIM-Uk-IC11 und ZIM-Uk-i:16 wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie unter den Nummern DDR-0206, DDR-0205 und DDR-0204 hinterlegt.

**Patentanspruch:**

Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen den humanen Plasminogenaktivator Urokinase (HuUk) durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit Urokinase, Fusion ihrer Milzzellen mit Maus-Myelomzellen, Selektion der antikörperproduzierenden Hybridzellen mittels immunchemischer Testverfahren und Weitervermehrung der Hybridzellklone durch Kultivierung bzw. Transplantationen auf Mäusen in der Ascitesform, dadurch gekennzeichnet, daß zur Kultivierung bzw. Transplantation die Klone ZIM-UK-IE2 (Hinterlegungsnummer DDR-0206), ZIM-UK-IC11 (Hinterlegungsnummer DDR-0205) und ZIM-UK-IH6 (Hinterlegungsnummer DDR-0204) eingesetzt werden.

**Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen den humanen Plasminogenaktivator Urokinase.

Anwendungsgebiet der Erfindung sind die Medizin und die Biotechnologie.

**Charakteristik des bekannten Standes der Technik**

Humane Urokinase ist eine Serinprotease, die von Körperzellen sezerniert wird. Urokinase wandelt das Zymogen Plasminogen, das im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten vorhanden ist, in aktives Plasmin um. Das System Urokinase/Plasmin ist an der Katalyse diverser extrazellulärer proteolytischer Prozesse beteiligt (E. Reich in: Biological Markers of Neoplasia: Basic and Applied Aspects [R. N. Ruddon, ed.] Elsevier, New York 491-500, 1978). Humane Urokinase wird als Therapeutikum für die Lyse thrombotischer Verschlüsse bei Herzinfarkt, Lungenembolie und anderen thrombotischen Erkrankungen eingesetzt (M. Verstraete, D. Collen, Blood 67, 1529-1541, 1986). Urokinase ist weiterhin als Markerenzym für den Nachweis einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen, u. a. Tumorwachstum und Metastasierung, geeignet. Monoklonale Antikörper gegen Urokinase gibt es seit 1981 (z. B. Herion, P.; Glineur, C.; Franssen, J.-D.; Urban, J.; Bollen, A.; Bioscience Reports 1, 885-892, 1981). Die Herstellung der Antikörper eingesetzt. Die Produktion der monoklonalen Antikörper erfolgte nach an sich bekannten Verfahren (Köhler, G. and Milstein, C. Nature 256, 495-497, 1975). Solche Antikörper werden vorzugsweise für den Urokinase-Nachweis in biologischen Flüssigkeiten und Geweben sowie für die Reinigung und Isolierung des Enzyms eingesetzt.

Urokinase weist verschiedene Antigen determinanten auf, zu deren eindeutigen Charakterisierung eine Vielzahl von unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern eingesetzt werden müssen.

**Ziel der Erfindung**

Die Erfindung hat das Ziel, monoklonale Antikörper gegen humanen Plasminogenaktivator Urokinase mit geeigneter Affinitätskonstante und hoher Spezifität herzustellen. Die Antikörper sollen zur Entwicklung rationeller Testbestecks zur selektiven Analytik in der medizinischen Diagnostik sowie für biochemische Untersuchungen einschließlich der Herstellung von effektiven Immunsorbentien zur Immunaффinitätschromatographie von Urokinasepräparaten eingesetzt werden.

**Darlegung des Wesens der Erfindung**

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen humanen Plasminogenaktivator Urokinase werden zunächst in an sich bekannter Weise Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit gereinigter Urokinase bis zum Erscheinen von Serumantikörpern immunisiert wurden, mit Maus-Myelomzellen hybridisiert und die erhaltenen Hybridome in Mikrotiterplatten kultiviert. Mit einem Immunoassay erfolgt der Nachweis der antikörperproduzierenden Hybridome. Die antikörperproduzierenden Hybridome werden kloniert und ihre Antigen spezifität bestimmt. Die spezifischen Hybridome gegen humanen Plasminogenaktivator Urokinase werden ausgewählt, weitervermehrt und gegebenenfalls nach Lagerung in flüssigem Stickstoff erfindungsgemäß zur Produktion der monoklonalen Antikörper erfolgt entweder in vitro in Zellkultur als Monolayer-, Roller-, Suspensionskultur und in Mikrobeads aus modifizierter Zellulose oder in vivo in Ascitesflüssigkeit nach Transplantation der spezifischen Hybridomzellen in Balb/c-Mäusen und/oder deren Hybride. Die monoklonalen Antikörper ZIM-UK-IE2; ZIM-UK-IC11 und ZIM-UK-IH6 gehören der Immunglobulinklasse IgG2a an. Die Antikörper erkennen unterschiedliche Epitope. Der monoklonale Antikörper ZIM-UK-IE2 hemmt wie die beiden anderen monoklonalen Antikörper nicht die amidolytische Aktivität der Urokinase, ist aber in der Lage, die fibrinolytische Aktivität vollständig zu unterdrücken. Seine Bindungsstelle hat der monoklonale Antikörper ZIM-UK-IE2 am aktiven Zentrum (Epitop 1) des Urokinasemoleküles. Er reagiert mit der höhermolekularen Form der Urokinase und mit der niedermolekularen Form (33 KD), die im wesentlichen aus der sogenannten Serinproteasekette mit dem aktiven Zentrum besteht. Der Vorteil dieses Antikörpers liegt in der Erkenntnis von enzymatisch aktiver Urokinase. ZIM-UK-IE2 kann als spezifischer Inhibitor von Urokinase verwendet werden. Die Bindungsstelle der beiden monoklonalen Antikörper ZIM-UK-IC11 und ZIM-UK-IH6 liegt außerhalb der niedermolekularen Form der Urokinase repräsentierenden Molekülregion (Epitop 2). Die Affinitätskonstanten aller drei monoklonalen Antikörper sind größer als  $1 \times 10^{-8}$  mol/l. Die monoklonalen Antikörper weisen keine Kreuzreaktivität mit dem gewebsspezifischen Plasminogenaktivator t-PA und mit anderen Bestandteilen des Humanvollserums auf. Die Zellklone produzieren sowohl in Zellkultur als auch in Mäusen bedeutende Mengen von Antikörpern mit einer hohen Affinität. Die Antikörper eignen sich zur Bestimmung der Urokinase in der medizinischen Diagnostik und zur Hochreinigung (Tab. 1).

Die erfindungsgemäß hergestellten Hybridome wurden am 1. Juli 1987 in der ZIM-Hinterlegungsstelle unter folgenden Registrationsnummern:

DDR-0204 ZIM-UK-IH6

DDR-0205 ZIM-UK-IC11

DDR-0206 ZIM-UK-IE2 hinterlegt.

Die Erfindung soll nachstehend durch Beispiele näher erläutert werden.

### Ausführungsbeispiele

#### 1. Herstellung der Hybridome

Balb/c-Mäuse werden durch i. p.-Injektion von 50 µg Urokinase in kompletten Freund'schen Adjuvans immunisiert. Drei Tage vor der Fusion werden 50 µg Urokinase i. v. appliziert. Die Fusion der Milzzellen einer immunisierten Maus mit positiven Serumtiter erfolgt mit Maus-Plasmazytomzellen SP.2/0 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).

#### 2. Das Screening der Antikörper aus der Kulturflüssigkeit erfolgt mit einem Immunoassay auf einem Flächenträger bzw. in Mikrotiterplatten unter Bindung des Enzyms an die feste Phase und Einsatz eines enzymmarkierten (Enzym: Peroxidase) anti-Maus-IgG-Antikörper.

Die Hybridome werden in Selektionsmedien (HAT oder Azaserin) in 96-well-Mikrotiterplatten kultiviert. Nach 8-10 Tagen wird der Kulturüberstand auf das Vorhandensein von Antikörpern getestet.

#### 3. Die Eigenschaften der von den erhaltenen Hybridomklonen produzierten monoklonalen Antikörper sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

	Immunglobulinklasse	Epitop	Reaktion mit LMW-UK (33 KD)	Hemmung der fibrinolytischen Aktivität	Hemmung der amidolytischen Aktivität	Markierbar mit POD
mAK						
ZIM-UK-IE2	IgG 2 a	1	+	++	-	ja
ZIM-UK-IC11	IgG 2 a	2	-	(+)	-	ja
ZIM-UK-IH6	IgG 2 a	2	-	(+)	-	ja