



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **245 902 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 / 286 743 4

(22) 04.02.86

(44) 20.05.87

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Karawajew, Leonid, Dr. rer. nat., SU; Micheel, Burkhardt, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol., DD; Behrsing, Olaf, Dipl.-Biochem., DD

(54) **Verfahren zur Gewinnung von bispezifischen monoklonalen Antikörpern**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von bispezifischen monoklonalen Antikörpern. Ziel der Erfindung ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern mit zwei unterschiedlichen Bindungsstellen gegen verschiedene Antigene bzw. Antigen determinanten. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man Hybridzellen, die unterschiedliche monoklonale Antikörper produzieren, in der Zellkultur mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, anschließend fusioniert, die gebildeten Tetradome mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer selektiert, die Tetradome, die bispezifische Antikörper produzieren, auswählt, in der Zellkultur und auf Mäusen zur Antikörpergewinnung weitervermehrt. Anwendungsgebiet der Erfindung sind die verschiedensten Gebiete der Medizin, Biologie, Veterinärmedizin, Landwirtschaft und Biotechnologie.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Gewinnung von bispezifischen monoklonalen Antikörpern, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zwei Hybridzelllinien, die unterschiedliche monoklonale Antikörper produzieren, in der Zellkultur mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die gefärbten Hybridzellen in der Zellkultur fusioniert, die gebildeten Tetradome mit Hilfe eines Fluoreszenzaktivierten-Zellsortierers selektiert, die Tetradome, die bispezifische Antikörper produzieren, auswählt und in bekannter Weise kultiviert und auf Mäusen transplantiert.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern mit Doppelspezifität, d. h. mit einer Bindungsstelle gegen ein Antigen oder eine Antigen determinante und einer zweiten Bindungsstelle gegen ein zweites Antigen bzw. eine zweite Antigen determinante.

Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Medizin, Veterinärmedizin, Landwirtschaft, Biologie und Biotechnologie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Antikörper mit Doppelspezifität lassen sich auf biochemischem Wege durch reduktive Spaltung der bivalenten Antikörpermoleküle in monovalente Fragmente und anschließende oxidative Vereinigung verschiedener monovalenter Fragmente gewinnen (A. NISONOFF und M. M. RIVERS, Arch. Biochem. Biophys. **93**, 460, 1961). Diese Methode ist auch auf monoklonale Antikörper anwendbar. Monoklonale Antikörper mit Doppelspezifität wurden auch mit Hilfe der Hybridomtechnologie gewonnen.

Hybridzellen, die einen spezifischen monoklonalen Antikörper produzieren und die durch zellzüchterische Manipulationen mit einem Enzymdefekt versehen wurden, werden dazu mit Milzzellen von immunisierten Mäusen in der Zellkultur fusioniert. Auf Grund des Enzymdefektes können die fusionierten Zellen (Tridome) mit Hilfe eines Spezialmediums selektiert werden. Durch spezifische immunologische Tests wurden die Tridome selektiert, die bispezifische Antikörper produzieren (C. MILSTEIN, C. CUELLO: Nature **305**, 537, 1983; J. MARTINIS, G. S. DAVID, R. M. BARTHOLOMEUS u. R. WANG, S. 129 in Basic Biology auf New Developments in Biotechnology, Hrsg. A. Holloender et al., Plenum Publ. Corp. 1983).

Weiterhin wurden zwei Hybridzelllinien, die verschiedene monoklonale Antikörper produzieren und die jeweils mit einem anderen Enzymdefekt versehen wurden, in der Zellkultur fusioniert. Mit den entsprechenden zwei Selektionsmedien wurden die fusionierten Zellen (Tetradome) selektiert und mit immunologischen Tests die Tetradome herausgesucht, die bispezifische Antikörper produzieren (K. G. BURNETT, J. F. KULL u. J. MARTINIS, vorgestellt auf dem 5th International Congress of Immunology, 21.-27. 8. 1983, Kyoto, Japan).

Der Nachteil dieser Methoden besteht in der langwierigen Selektionsprozedur für die Tridome bzw. Tetradome, da die Induzierung der Enzymdefekte bei den verwendeten Fusionspartnern mit einem erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden ist.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, bispezifische Antikörper aus fusionierten Zelllinien zu gewinnen, wobei die Zellfusion und die Selektion der fusionierten Zellen über einen effektiveren und schnelleren Weg durchgeführt werden sollen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von bispezifischen monoklonalen Antikörpern gegen 2 unterschiedliche Antigene ist dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hybridzelllinie, die einen bestimmten monoklonalen Antikörper produziert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und diese mit einer anderen Hybridzelllinie, die einen anderen monoklonalen Antikörper produziert und mit einem unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoff markiert wurde, in der Zellkultur fusioniert. Tetradome (= Hybrid-Hybridome), die Doppelfluoreszenz aufweisen, werden über einen Fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACS) herausselektiert, kloniert und in der Zellkultur vermehrt. Die Klone werden mit immunologischen Tests auf ihre Antikörperproduktion getestet, und diejenigen Tetradomklone, die Antikörper mit Doppelspezifität produzieren, werden ausgewählt, weitervermehrt und danach in flüssigem Stickstoff gelagert, in bekannter Weise kultiviert und auf Mäusen in der Aszitesform transplantiert. Das erfindungsgemäße Verfahren, dessen Kernstück die Fluoreszenzfarbstoff-Markierung darstellt, erfordert erheblich weniger Arbeitsaufwand als die bisher bekannten Verfahren. Es ist für die verschiedensten Antigene anwendbar.

Mit den erfindungsgemäß hergestellten Antikörpern mit Doppelspezifität lassen sich die bisherigen immunologischen Nachweis- und Reinigungsverfahren qualitativ verbessern. Sie bieten ebenfalls Möglichkeiten einer therapeutischen Anwendung.

Ausführungsbeispiel

1) Hybridzellen, die monoklonale Antikörper gegen den Tumormarker AFP (Alpha-Fetoprotein) produzieren, wurden in der Zellkultur mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein-Isothiozyanat) markiert, der eine grüne Fluoreszenz ergibt. Andere Hybridzellen, die monoklonale Antikörper gegen das für Immuntests verwendete Enzym POD (Meerrettich-Peroxidase) produzieren, wurden in der Zellkultur mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC (Tetramethyl-Rhodamin-Isothiozyanat) markiert, der eine rote Fluoreszenz ergibt.

Die gefärbten Antikörper-produzierenden Hybridzellen wurden in der Zellkultur mit Hilfe von PEG (Polyäthylenglykol) fusioniert.

2) Zellen mit Doppelfluoreszenz (Tetradome), die Genmaterial aus beiden Hybridzellen enthalten müssen, wurden mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers (FACS III, Becton Dickinson) herausselektiert, in der Zellkultur kloniert und weitervermehrt.

3) Alle Tetradomklone wurden anschließend auf ihre Produktion von Antikörpern gegen AFP und POD getestet. Diejenigen Klone, die Antikörper gegen beide Antigene produzieren, wurden anschließend auf die Produktion von bispezifischen Antikörpern geprüft. Dazu wurde an einen festen Träger, PVC (Polyvinylchlorid)-Folie gereinigtes AFP adsorbiert und danach mit den zu testenden Kulturüberständen inkubiert. Nach entsprechender Waschprozedur wurde anschließend mit POD inkubiert und danach die POD-Nachweisreaktion mit dem entsprechenden Substrat durchgeführt, das durch die Enzymreaktion in ein farbiges Produkt umgewandelt wird.

4) Die Tetradome, die in dem Doppelspezifitätstest positiv reagierten, wurden in bekannter Weise in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Zellkultur und in Inzuchtmäusen zur Antikörpergewinnung weitervermehrt.

Der Tetradomklon T1-F2/B1 wurde am

unter der Nummer im RGW-Referenzzentrum für Zelllinien am Friedrich-Löffler-Institut Insel Riems hinterlegt.
