



Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz
der DDR vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 21/08
C 12 N 5/20

DEUTSCHES PATENTAMT

(21) DD C 12 P / 319 420 1

(22) 02.09.88

(45) 24.10.90

(71) siehe (73)

(72) Haase, Anita, Dipl.-Gartenbauing.; Rabenstein, Frank, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Richter, Johannes, Prof. Dr. sc. Dipl.-Biol., DD

(73) Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, Institut für Phytopathologie, Theodor-Roomer-Weg, Aschersleben, 4320, DD

(54) Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen das Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus)

(55) monoklonale Antikörper; Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus); Zellkultur; Hybridzellklone; Spezifität; Bindungsfähigkeit; Testsystem; Nachweis; Diagnose; Pflanzenmaterial; Pflanzenviren

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus, CMV). Ziel der Erfindung ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern definierter Spezifität und starker Bindungsfähigkeit in guten Ausbeuten. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst in an sich bekannter Weise Milzzellen von Inzuchtmäusen, die mit CMV immunisiert wurden, mit P3X63-Ag8.653 Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die Antikörper produzierenden Hybridzellklone selektiert, die Spezifität der Antikörper bestimmt, die spezifischen und zum Aufbau eines Testsystems zum Nachweis des CMV in Pflanzenmaterial geeigneten Hybridzellklone auswählt und erfindungsgemäß zur Produktion der monoklonalen Antikörper durch Kultivierung und nach Transplantation auf histokompatible Mäuse in der Aszitesform einsetzt. Die spezifischen und geeigneten Hybridzellklone IfP-HI-8/09 und IfP-H3-C/F11 wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR (Liste 1988) unter den Nummern ZIM-0118 und ZIM-0353 hinterlegt. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Diagnose von Pflanzenviren.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen das Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus, CMV) durch Immunisation von Inzuchtmäusen mit CMV, Fusion ihrer Milzzellen mit Myelomzellen, Selektion CMV-reaktiver Hybridzellklone, Auswahl der spezifischen und zum Aufbau eines Testsystems zum CMV-Nachweis in Pflanzensäften geeigneten Antikörperproduzierenden Zellklone und ihre Kultivierung bzw. Transplantation auf Mäusen in der Aszitesform, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Kultivierung bzw. Transplantation die Hybridzellklone IfP-H1-B/D9 (ZIM-Liste 1988 = ZIM-0118) bzw. IfP-H3-C/F11 (ZIM-Liste 1988 = ZIM-0353) eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen das Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus, im folgenden mit CMV abgekürzt). Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Diagnose von Pflanzenviren im Rahmen von Gewächshaus- und Feldprüfungen sowie bei der Entwicklung und Selektion resistenter Pflanzensorten.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Das CMV gehört zur Cucumovirus-Gruppe und besitzt einen sehr weiten Wirtskreis. Das Auftreten biologisch und serologisch unterscheidbarer Stämme ist bekannt (Van REGENMORTEL, M. H. V., Serology and Immunochemistry of Plant Viruses, Academic Press, New York, 1982). Auf Grund der Instabilität des CMV ist es notwendig, bei der Antiserumherstellung gereinigtes und mit Formaldehyd stabilisiertes Virus zu verwenden (RICHTER, J. et al., Arch. Pflanzenschutz 8 [1972], 421-428). Die Herstellung spezifischer im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) einsetzbarer polyklonaler Antiseren, deren IgG sich als Coating-Antikörper und Enzymkonjugat zur Virusdiagnose und Differenzierung gut eignen, ist schwierig und nicht reproduzierbar. Eine Lösung des Problems könnte die Herstellung entsprechend geeigneter monoklonaler Antikörper bilden. Bisher wurden einige monoklonale Antikörper gegen CMV beschrieben (RIST, D. L. und LORBEER, J. W., Phytopathology 776 [1986], 658; BRIAND, J. P. et al., Bulletin OEPP 17 [1987], 310). Über eine Verwendung dieser Antikörper als Enzymkonjugat oder Festphasen-Antikörper zum Aufbau von Enzymimmunoassays wurde jedoch nicht berichtet. Ein weiterer monoklonaler Antikörper gegen CMV sowie vier monoklonale Antikörper gegen das Erdnußstauch-Virus (peanut stunt virus, PSV), ein anderes Virus aus der Cucumovirus-Gruppe, wurde von uns kürzlich beschrieben (HAASE, A. und RABENSTEIN, F., Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 24 [1988], 167-169).

Diese Antikörper waren jedoch in dem beschriebenen Testsystem nicht zum Virusnachweis in Pflanzensäften geeignet. Die Herstellung neuer monoklonaler Antikörper mit besseren, den schon vorhandenen Antikörpern fehlenden Eigenschaften, ist zum Aufbau spezifischer und effektiver Testsysteme (z. B. DAS-ELISA) auf der Basis monoklonaler Antikörper erstrebenswert.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, monoklonale Antikörper mit definierter Spezifität und starker Bindungsfähigkeit in guten Ausbeuten herzustellen. Diese monoklonalen Antikörper sollen zum Aufbau eines Testsystems zum Nachweis des CMV in Pflanzensäften geeignet sein.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man in an sich bekannter Weise zunächst Milzzellen von Mäusen, z. B. der Mausinzuchtlinien Balb/c oder A/J, die zuvor sowohl mit gereinigtem CMV als auch mit Formaldehyd stabilisiertem CMV immunisiert wurden, mit P3 X63-Ag8.653 Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die fusionierten Zellen in Gewebekulturplatten aussät, mit Hilfe eines Selektionsmediums die Hybridzellen selektiert, mit Hilfe eines Enzymimmunoassays die Hybridzellen nachweist, die Antikörper gegen CMV produzieren, die spezifische Reaktion mit gereinigtem, mit Formaldehyd stabilisiertem CMV sowie mit nativem CMV in Pflanzensäften bestimmt, danach die spezifischen Hybridzellen auswählt, weitervermehrt, kloniert und ggf. nach Lagerung in flüssigem Stickstoff erfindungsgemäß zur Produktion der monoklonalen Antikörper durch Kultivierung oder nach Transplantation auf Hybrid- bzw. Balb/c-Mäuse in der Aszitesform einsetzt. Die für die erfindungsgemäße Antikörperproduktion eingesetzten Hybridzellklone wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie (Liste 1988) unter folgenden Nummern hinterlegt:

ZIM-0118 : IfP-H1-B/D9

ZIM-0353 : IfP-H3-C/F11.

Die durch die Erfindung hergestellten neuen monoklonalen Antikörper zeichnen sich durch die spezifische Erkennung von CMV in Pflanzensäften aus, ohne mit anderen Viren aus der Cucumovirusgruppe zu reagieren. Der monoklonale Antikörper IfP-H1-B/D9 ist spezifisch gegen CMV-Isolate vom Serotyp N gerichtet, während IfP-H3-C/F11 mit einem Epitop reagiert, das auf allen Serotypen des CMV vorhanden ist.

Die Antikörper zeichnen sich weiterhin durch eine ausgezeichnete Adsorption an Plastmaterial aus, wodurch Voraussetzungen für den Aufbau von spezifischen Enzymimmunoassays auf der Basis von monoklonalen Antikörpern geschaffen sind.

Die Antikörper sind dadurch gekennzeichnet, daß sie sich mit einem Marker (z. B. alkalische Phosphatase) koppeln lassen und ihre volle Immunologische Reaktivität behalten.

Die Erfindung ermöglicht aus diesem Grunde die Entwicklung von effektiven Testbestecks zum Nachweis des CMV in biologischen Materialien.

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

1. Immunisation von A/J-Mäusen

Zur Immunisation der Mäuse wurde ein optimiertes Impfschema verwendet. Vier Wochen alte weibliche Mäuse wurden mit Formaldehyd stabilisiertem und unstabilisiertem gereinigtem CMV in Freudschem Adjuvans (FA komplett) bzw. FA inkomplett im Abstand von jeweils 4 Wochen i. p. immunisiert. Vier, drei, und zwei Tage vor Fusionsbeginn erfolgte eine intravenöse Injektion ohne FA.

Die Zellfusion, Kultivierung, Klonierung usw. erfolgte nach Standardmethoden entspr. KÖHLER, G. und MILSTEIN, C., *Nature* 256 (1975), 495-497 und GODING, J. W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, London (1983).

2. Der Nachweis Antikörper-produzierender Hybridzellen erfolgte mit einem indirekten Enzymimmunoassay entspr. etablierter Methoden (RABENSTEIN, F. et al., *Arch. Phytopathol. u. Pflanzenschutz* 20 [1984], HAASE, A. und RABENSTEIN, F., *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* 24 [1988], 167-169; RICHTER, J. et al., *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* 24 [1988] im Druck). Danach wurde entweder gereinigtes CMV oder zuerst polyklonales Kaninchen-IgG aus CMV-Antiserum und danach CMV-haltiger Pflanzensaft an Mikrottestplatten gebunden, anschließend erfolgte die Inkubation mit Überständen der Hybridzellklone und enzymmarkierten Anti-Maus-IgG.

3. Der Nachweis der Spezifität der monoklonalen Antikörper erfolgte durch einen indirekten Enzymimmunoassay unter Verwendung von verschiedenen Isolaten der beiden Serotypen N und U des CMV sowie Isolaten des PSV und des Tomatenaspermie-Virus (tomato aspermy virus, TAV), zwei weiteren Mitgliedern der Cucumovirus-Gruppe. Entspr. dieses Tests reagierten die durch den Hybridzellklon lFP-H1-B/D9 produzierten Antikörper nur mit Isolaten des CMV-Serotyps N, während andererseits die vom Hybridzellklon lFP-H3-C/F11 sezernierten Antikörper mit beiden Serotypen des CMV eine Reaktion zeigten. Keine Reaktion erfolgte dagegen mit Isolaten des PSV und TAV.

4. Herstellung der Antikörper

Die ausgewählten Hybridzellklone wurden zur Herstellung der Antikörper gemäß üblicher Techniken (KENNETT, R. H., McKEARN, T. J. und BECHTOL, K. B., *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A new dimension in biological analysis*, New York u. London 1981) eingesetzt.

5. Konjugation mit alkalischer Phosphatase

Der gemäß gebräuchlicher Techniken gereinigte monoklonale Antikörper lFP-H3-C/F11 wurde nach der bekannten Methode von CLARK, M. F. und ADAMS, A. N. (*J. gen. Virol.* 34 [1977], 475-483) mit alkalischer Phosphatase konjugiert.

6. Die Eignung der durch die oben genannten Hybridzellklone produzierten monoklonalen Antikörper zum Aufbau eines ELISA-Systems zum Nachweis des CMV in Pflanzensäften wurde überprüft. Danach eignen sich lFP-H1-B/D9-Antikörper ausgezeichnet zur Adsorption an Mikrottestplatten aus Polystyrol als feste Phase. Der gereinigte monoklonale Antikörper konnte in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt werden. Da lFP-H1-B/D9-Antikörper an der festen Phase in Kombination mit lFP-H3-C/F11-Antikörpern als Enzymkonjugat in der löslichen Phase stark positiv nur mit CMV-N-Serotypen in Pflanzensäften reagieren, kann geschlossen werden, daß beide Antikörper Epitope erkennen, die in ausreichender räumlicher Entfernung auf dem CMV-Hüllprotein liegen. Somit ist ihr Einsatz zum Aufbau eines absolut CMV-N spezifischen Testbestecks möglich.

Da die serologische Differenzierung des CMV auf Epitope zurückzuführen ist, die für das intakte Virus charakteristisch sind und als Neotope bezeichnet werden, ist anzunehmen, daß die lFP-H1-B/D9-Antikörper mit einem Neotop auf der Oberfläche des CMV-N-Hüllproteins reagieren. Andererseits differenzieren die lFP-H3/CF11-Antikörper nicht zwischen N- und U-Stämmen des CMV und erkennen somit ein Cryptotop auf dem CMV-Hüllprotein in Pflanzensäften.

Soll das Testsystem zum Nachweis des CMV in Pflanzensäften so gestaltet werden, daß alle Serotypen erfaßt werden, kann mit polyklonalem IgG aus Kaninchen-CMV-Antiserum als Feste-Phase-Antikörper beschichtet und mit alkalische Phosphatase markierten lFP-H3/CF11-Antikörpern in der löslichen Phase inkubiert werden. Dabei kann die Inkubation von Pflanzensaft und Enzymkonjugat in einem Schritt simultan erfolgen.