

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

# PATENTCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 287 954 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 21/08

**DEUTSCHES PATENTAMT**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21) DD C 12 P / 332 712 7                      (22) 15.09.89                      (44) 14.03.91

---

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, O - 1080 Berlin, DE  
(72) Mehl, Michael, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Kießig, Stephan, Dr. med.; Starke Roland, Dr. med.; Grunow, Roland,  
Dr. sc. med.; Lukowsky, Ansgar, Dr. sc. nat.; Döpel, Holger, Dr. med.; Hentschel, Christian, Dr. rer. nat. Dipl.-  
Chem., DE  
(73) Humboldt-Universität, Bereich Medizin (Charité), O - 1040 Berlin, DE

---

(54) **Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Tetanustoxin**

---

(55) Antikörper; monoklonale Antikörper; Antigen; Tetanus-Toxin; Immunisierung; Mäuse; Hybridzellen; Medizin;  
Diagnostik; Impfstoffherstellung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das Tetanus-Toxin. Durch  
Immunisierung von Mäusen und Immortalisierung ihrer Milzlymphozyten mit einer murinen Myelomzelllinie werden  
die Hybridomzellen H-CB-TT-G1, -M1 und -G2 (ZIM 0489 bis 0491) und daraus die entsprechenden monoklonalen  
Antikörper CB-TT-G1, -M1 und G2 erhalten. Die Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik  
und die Impfstoffherstellung.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

### Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die das Tetanus-Toxin-Antigen (TT) erkennen, durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit Tetanus-Toxin-Escherichia coli K1-Kapselpolysaccharid-Konjugat-Vakzine und Immortalisierung ihrer Milzlymphozyten mit einer murinen Myelomzelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß daraus die Hybridmonozellen H-CB-TT-G1 (ZIM-0489, H-CB-TT-M1 ZIM-0491) und H-CB-TT-G2 (ZIM-0490) selektiert zur Züchtung eingesetzt und aus dem Überstand die monoklonalen Antikörper CB-TT-G1, CB-TT-M1 und CB-TT-G2 isoliert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung der Milzlymphozyten erfolgt, nachdem das Antigen 8 bis 10 Wochen alten weiblichen Mäusen über einen Zeitraum von 57 Tagen am 1., 21., 35., 49., 51., 52. und 53. Tag in Form einer i. p. Gabe von 100 µl Konjugatvakzine und 100 µl KFA verabreicht wird und die letzte Gabe des Antigens 4 Tage vor der Milzentnahme erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper biotiniert oder an Enzyme, z. B. zur Peroxidase-Markierung, an partikuläre Träger, z. B. Latex bzw. an Trägermaterialien gekoppelt werden.

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung muriner monoklonaler Antikörper gegen Tetanustoxin. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Impfstoffherstellung und die medizinische Diagnostik.

### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Herstellung monoklonaler Antikörper ist ein bereits beschriebenes Verfahren. Erstmals haben KÖHLER und MILSTEIN (Nature 1975, 256, 495) durch somatische Fusion von murinen antikörperbildenden Zellen und Zellen einer permanent wachsenden Plasmocytomzelllinie Hybridome erzeugt, die nach entsprechenden Klonierungsschritten monoklonale Antikörper von der Maus gegen eine gewünschte Antigen spezifität produzierten. Mit dieser biotechnologischen Prinziplösung sind bereits monoklonale Antikörper gegen Tetanustoxin erzeugt worden (AHNER-HILGER, G., B. BIZZINI, K. GORETZKI, H. MÜLLER, C. VOLKERS, und E. HABERMANN, Med. Microbiol. Immunol. 1983, 172, 123; KENIMER, J. G., W. HABIG, M. C. HARDEGREE, Infect. Immun. 1983, 42, 942; SHEPPARD, A. J., D. CUSSEL und M. HUGHES, Infect. Immun. 1984, 43, 710; ZURAWSKI, V. R., E. HABER und P. H. BLACK, Science 1978, 199, 1439; GIGLOTTI, F. und R. A. INSEL, J. Clin. Invest. 1982, 70, 1306). Es sind jedoch keine Hybridomlinien bekannt, die in hoher Ausbeute murine monoklonale Antikörper vom Typ CB-TT G1, CB-TT M1 und CB-TT G2 sezernieren.

### Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, für die Reinigung von Tetanustoxinpräparaten innerhalb der Tetanus-Impfstoffproduktion sowie für die medizinische Diagnostik monoklonale Antikörper zur Verfügung zu stellen, die zum Reinigen sowie für den Nachweis von Tetanustoxin im Rahmen immunochemischer Reinigungs- und Nachweisverfahren geeignet sind.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein effektives Verfahren zur Erzeugung von Hybridomzellen, aus deren Zellkulturüberständen in weiterführenden Verfahrensschritten monoklonale Antikörper gegen das Tetanustoxin gewonnen werden können, zu entwickeln. Die nach dem beschriebenen Verfahren erzeugten Hybridomzelllinien sollen mit ökonomisch günstigstem Aufwand in vitro und in vivo kultivierbar sein und die für eine wirtschaftliche Reinigung erforderlichen Mengen an stabilen Antikörpern sezernieren. Die Aufgabenlösung erfolgte durch Immunisierung von Mäusen des Inzuchtstammes Balb/c mit einer Tetanustoxin-Escherichia coli K1-Kapselpolysaccharid-Konjugat-Vakzine (100 µg Vakzine je Applikation) nach einem bestimmten erfinderischen Schema. Als vorteilhaft erwies sich die Verwendung von 8 bis 10 Wochen alten weiblichen Mäusen des genannten Inzuchtstammes. Die Immunisierung erfolgte durch mehrmalige Antigenapplikation, wobei komplettes Freundsches Adjuvans zur Immunogenitätssteigerung zur Anwendung kam. Als ökonomisch günstigste Variante erwies sich die intraperitoneale Applikation von 100 µg Konjugatvakzine in 100 µl PBS mit gleichem Volumenanteil komplettem Freundschem Adjuvans am 1., 21., 35., 49., 50., 51., 52. und 53. Versuchstag, 4 Tage vor der Milzentnahme (4 Tage nach der letzten intraperitonealen Immunisierung) erfolgte eine intravenöse Immunisierung mit 100 µg Konjugatvakzine. Nach erfolgter Milzentnahme wurde mittels Glashomogenisator eine Einzelzellsuspension hergestellt. Zur Durchführung der somatischen Fusion der gewonnenen antikörperproduzierenden Zellen wurden Mausmyelomzellen der Linie P3X63 Ag 8/653 (KEARNEY et al., J. Immunol. 1979, 123, 1548) als Fusionspartner verwendet. Die Kultivierung der Mausmyelomzellen erfolgte im Zellzuchtmedium RPMI 1640 mit einem 10%igen Anteil an fetalem Kälberserum (FKS). Nach dem Durchmischen beider Fusionspartner in FKS-freiem Zellzuchtmedium

und anschließender Sedimentation wurde durch Zugabe von Polyethylenglykol die Zellfusion induziert. Darauf folgend wurden die Zellen in eine Vielzahl von separaten 200 µl Kulturen aufgeteilt. In einem Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthaltenden Zellkulturmedium (HAT) nach LITTLEFIELD (Science 1964, 145 709) werden die gebildeten Hybride von den nicht fusionierten Myelom- und Milzzellen abgetrennt und erfindungsgemäß Klone selektiert, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren.

Die Detektion dieser Klone erfolgte dadurch, daß im zellfreien Überstand der angelegten Zellkulturen durch ein geeignetes Verfahren (z. B. einem spezifischen Enzymimmunoassay, EIA) sezernierte Antikörper gegen das Tetanus-Toxin nachgewiesen werden. Die Primärzellkulturen mit Anti-Tetanus-Toxin-Antigen-Antikörperproduktion werden kloniert und mehrmals rekloniert, bis monoklonale Subklone erhalten werden, die stabil und in hohen Konzentrationen die gewünschten spezifischen Antikörper sezernieren.

Die so isolierten Hybridome werden mit H-CB-TT bezeichnet. Besonders geeignet sind die Zelllinien der H-CB-TT-G1, H-CB-TT-M1 und H-CB-TT-G2. Diese drei Hybridome sind in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstituts für Molekularbiologie der AdW der DDR, Berlin-Buch, unter folgenden Nummern registriert:

H-CB-TT-G1 als ZIM-0489

H-CB-TT-M1 als ZIM-0491

H-CB-TT-G2 als ZIM-0490

Die hinterlegten Hybridomzellkulturen eignen sich für eine Massenproduktion von monoklonalen Antikörpern in vitro und in vivo.

Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der genannten Zelllinien unter In-vitro-Bedingungen wurden die Zellen in 6-well-Zellkulturplatten bis zu maximalen Zelldichten von  $9 \times 10^5$  Zellen/ml Zellkulturflüssigkeit kultiviert, wobei Antikörperkonzentrationen von  $23 \mu\text{g Ig}$   $5 \times 10^5$  Zellen/ml Zellkulturflüssigkeit nachgewiesen werden konnten.

Im zweiten Fall wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml PBS eingestellt und in pristanvorbehandelte Mäuse intraperitoneal nach bekanntem Verfahren appliziert. Nach ca. 1–3 Wochen läßt sich durch Punktion die antikörperhaltige Ascitesflüssigkeit gewinnen.

Auf diese Art und Weise lassen sich durch Kultivierung der genannten Hybridome in vitro und in vivo die monoklonalen Antikörper CB-TT-G1, CB-TT-M1 und CB-TT-G2 gewinnen.

Unter Anwendung verschiedener biochemischer und immunochemischer Verfahren lassen sich die gewonnenen Antikörper bis zu einem hohen Reinheitsgrad anreichern.

Für die Entwicklung bestimmter Testverfahren können die Antikörper mit Enzymen oder partikulären Trägern kovalent bzw. adsorptiv koppeln (Peroxidase-Markierung bzw. Latex-Kopplung z. B.). Sie lassen sich jedoch auch biotinylieren oder für spezielle Reinigungsverfahren an verschiedene Trägermaterialien koppeln.

Die positiven Primärkulturen werden auf Peritonealmakrophagen der Balb/c-Mäuse ( $10^4$ /well) nach dem Grenzverdünnungsverfahren kloniert und bis zum Erreichen der Monoklonalität rekloniert. Auf diese Weise werden Zelllinien mit spezifischer Anti-Tetanus-Toxin-Antigen-Antikörperproduktion erhalten.

#### Anwendungsbeispiele

##### Beispiel 1

Über einen Zeitraum von 53 Versuchstagen werden drei weibliche Balb/c-Mäuse jeweils am 1., 21., 35., 49., 51., 52. und 53. Tag intraperitoneal mit  $100 \mu\text{g}$  einer Tetanustoxin-Escherichia coli K1-Kapselpolysaccharid-Konjugatvakzine +  $100 \mu\text{l}$  KFA immunisiert. 4 Tage nach der letzten intraperitonealen Antigengabe und 4 Tage vor der Milzentnahme erfolgte eine einmalige intravenöse Applikation von  $100 \mu\text{g}$  der Konjugatvakzine. 4 Tage nach der letzten Antigengabe wurden die Milzen entnommen und mittels Glashomogenisator Einzelsuspensionen hergestellt.

Je Versuchstier lassen sich  $1-2 \times 10^8$  Milzzellen isolieren. Diese werden mit Myelomzellen der Linie P3X63 Ag8/653 im Verhältnis von 1:3 bis 1:8 (Myelomzellen zu Milzzellen) gemischt und mittels Polyethylenglykol 1500 fusioniert. Nach entsprechenden Waschschritten werden die Zellen in 96-well-Zellkulturplatten mit  $10^5$  Zellen/well in  $100 \mu\text{l}$  ausplattiert. Das dabei zur Kultivierung genutzte Standardzellkulturmedium besteht aus RPMI 1640 mit 10%igem FKS-Zusatz. Am folgenden Tag werden  $100 \mu\text{l}$  eines doppelt konzentrierten HAT-Selektionsmediums zugesetzt. Eine weitere Zugabe von  $50 \mu\text{l}$  des HAT-Mediums pro well der Zellkulturplatte erfolgt nach einer Woche. Nach 14tägiger Zellkultur werden die Primärzellkulturüberstände mit einem hochspezifischen EIA hinsichtlich ihres Gehaltes an spezifischen Antikörpern geprüft. Die Testergebnisse werden in Tabelle 1 dargestellt.

##### Beispiel 2

Nach dem beschriebenen Verfahren sind Hybridomzelllinien mit monoklonaler Antikörperproduktion gegen das Tetanus-Toxin hergestellt worden, die mit H-CB-TT-G1, H-CB-TT-M1 und H-CB-TT-G2 bezeichnet wurden. Diese Zelllinien wurden für die Optimierung des Verfahrens zur Herstellung der entsprechenden Antikörper charakterisiert (Tabelle 2).

Die Spezifitätscharakterisierung der durch die genannten Zelllinien produzierten Antikörper ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 1**

Anzahl in immunoglobulinproduzierender Primärkulturen nach intraperitonealer Immunisierung mit TT-Konjugatvakzine

Fusionsnummer	wells total	wells mit Wachstum	wells mit IgG	Immunglobulinproduktion Anti-TT-IgG
1	288	288	282	282
2	288	288	288	288
3	288	288	187	31
ProzentØ		100%	87,5%	69,4%

**Tabelle 2**

Charakterisierung der Zelllinien mit monoklonaler Antikörperproduktion gegen Tetanus-Toxin

Klon	Verdopplungszeit	Ig-Klasse	Ig-Produktion (µg/24h, 0,5 × 10 <sup>6</sup> Zellen/ml)
H-CB-TT-G1	27	G	23,1
H-CB-TT-M1	18	M	14,3
H-CB-TT-G2	22	G	24,8

**Tabelle 3**

Charakterisierung der Spezifität monoklonaler CB-TT im EIA gegenüber verschiedenen bakteriellen Antigenen (Festphasenbindung von Vollkeimsuspensionen (VK) bzw. immunochemisch charakterisierten Teilantigenen (PA), Entwicklung mit Anti-Species-Antikörpern POD-markiert, Testung Zellkulturüberstände nativ)

Antikörper Ext. 460nm	CB-TT-G1	CB-TT-M1	CB-TT-G2
<b>Antigen</b>			
Streptococcus agalactiae VK	0,008	0,003	0,005
Candida albicans VK	0,085	0,079	0,078
E. coli 075 K 100 VK	0,005	0,009	0,004
B-Meningokokken VK	0,020	0,012	0,018
E. coli 016 K 1 VK	0,022	0,047	0,036
E. coli 083 K 1 -			
Kapselpolysaccharid	0,034	0,042	0,054
LPS aus E. coli 083	0,099	0,053	0,107