

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Patent
aufrechterhalten nach
§ 12 Abs. 3 ErstrG

(12) **PATENTSCHRIFT**
(11) **DD 291 777 B5**

(51) Int. Cl.⁵: C12N5/24

DEUTSCHES PATENTAMT

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Aufrechterhaltung kann Einspruch eingelegt werden

(21) Aktenzeichen:	(22) Anmeldetag:	(44) Veröff.-tag der DD-Patentschrift:	(45) Veröff.-tag der Aufrechterhaltung:
DD C 12 N / 337 452 7	31.01.90	11.07.91	18.08.94

(30) Unionspriorität:

(72) Erfinder: Marx, Uwe, Dipl.-Med., 12629 Berlin, DE; Grunow, Roland, Dr. sc. med., 10318 Berlin, DE; Hausdorf, Gert, Dipl.-Chem. Dr. rer. nat., 10369 Berlin, DE; Sternberger, Joachim, Dipl.-Med., 58455 Witten, DE; Tanzmann, Heinz, 12557 Berlin, DE; Glaser, Ralf, Dipl.-Biol. Dr. rer. nat., 10178 Berlin, DE

(73) Patentinhaber: Medizinische Fakultät (Charité) der HUB, Schumannstr. 20/21, 10117 Berlin, DE

(74) Vertreter: Wehlan, H., Dr., Pat.-Anw., 10247 Berlin

(54) Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humane Erythrozyten

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
Bron, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81 (1984) 3214-3217
Goossens, D. et al., J. of Immunol. Meth., 101 (1987) 193-200

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) gegen humane Erythrozyten durch EBV-Transformation der nach Boosterung von rh-Negativen mit 0rh-positiven Erythrozyten gewonnenen peripheren Lymphozyten, **dadurch gekennzeichnet**, daß die derart transformierten Lymphozyten kultiviert und danach mit der Heteromyelomzelllinie CB-Fu 2 (ZIM-0314) fusioniert werden, daraus die monoklonale Hybridomzelllinie H-CB-hahE (ZIM 0497) etabliert, an serumfreies Kulturmedium adaptiert und aus dem zellfreien Kulturüberstand der humane monoklonale Antikörper (hmAK) CB-hahE isoliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Lymphozyten am 7. Tag nach Boosterung gewonnen und die EBV-transformierten Lymphozyten über eine Dauer von 5 Monaten kultiviert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kultivierung der EBV-transformierten Lymphozyten mit einem Fütterungsintervall von 4 bis 5 Tagen und einem Medienaustausch von jeweils 30% erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Primärhybridome nach der Fusion mit der Heteromyelomlinie CB-Fu 2 in einem serumfreien Selektionsmedium mit Rinderserumalbumin, Humantransferrin und Rinderinsulin als Proteinzusätze kultiviert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hybridomzelllinie H-CB-hahE an ein serumfreies Kulturmedium auf der Grundlage von RPMI-Basismedium mit einem Proteinzusatz von 2g/l Humanserumalbumin adaptiert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) gegen humane Erythrozyten, insbesondere zur Herstellung panagglutinierender humaner mAK (hmAK) der Klasse IgG gegen menschliche Erythrozyten. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik von Antikörper-induzierenden Infektionskrankheiten durch indirekte Agglutinationstests.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Produktion hmAK stellt eine Quelle von Antikörpern für die Diagnostik, Prophylaxe und Therapie verschiedener Erkrankungen des Menschen dar. Es werden international Anstrengungen zur Erzeugung von hmAK gegen bakterielle und virale Antigene, Tumor- und Zell- bzw. Gewebean Antigene unternommen (James, K. u. Bell, G. T.: Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects. J. of Immunol. Meth. 100 [1987], 5-40). Dabei werden hauptsächlich zwei Herstellungsmethoden angewandt:

1. die somatische Fusion von humanen B-Lymphozyten mit murinen, heterologen (Mensch x Maus) oder humanen Myelomlinien

2. die Immortalisierung humaner B-Lymphozyten durch Transformation mit dem Epstein-Barr-Virus.

Zusätzlich findet auch die Kombination von Transformation und anschließender somatischer Fusion Anwendung, so z. B. bei der Herstellung hmAK gegen das Blutgruppenmerkmal Rho (D) (Bron, D.; Feinberg, M. B.; Teng, N. N. H. u. Kaplan, H. S.: Production of human monoclonal IgG antibodies against Rhesus [D] antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 81 [1984] 3214-3217). HmAK wurden auch gegen eine Reihe anderer blutgruppenspezifischer Oberflächenantigene auf humanen Erythrozyten entwickelt (Goossens, D.; Champomier, F.; Rottger, Ph. u. Salmon, Ch.: Human monoclonal antibodies against blood group antigens. J. of Immunol. Meth., 101 [1987] 193-200). Blutgruppenunabhängige hmAK gegen menschliche Erythrozyten allgemein sind bislang allerdings noch nicht beschrieben worden.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, der medizinischen Diagnostik hmAK zur Verfügung zu stellen, die zum Aufbau von indirekten Agglutinationstestsystemen bei Infektionskrankheiten geeignet sind.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem zunächst Hybridomzelllinien erzeugt werden können, aus denen sich in anschließenden Verfahrensschritten mAK gegen humane Erythrozyten herstellen lassen. Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe dadurch gelöst, daß EBV-transformierte periphere Lymphozyten, die nach Boosterung von rh-Negativen mit 0rh-positiven Erythrozyten gewonnen werden, kultiviert und danach mit der Heteromyelomzelllinie CB-Fu 2 (ZIM-0314; DD-WP 274446) fusioniert werden, daraus die monoklonale Hybridomzelllinie H-CB-hahE (ZIM-0497) etabliert, an serumfreies Kulturmedium adaptiert und aus dem zellfreien Kulturüberstand der humane monoklonale

Antikörper CB-hahE isoliert wird. Die Lymphozyten werden am 7. Tag nach Boosterung gewonnen und die EBV-transformierten Lymphozyten über eine Dauer von 5 Monaten kultiviert. Die Kultivierung der EBV-transformierten Lymphozyten erfolgt mit einem Fütterungsintervall von 4 bis 5 Tagen mit einem Medienaustausch von jeweils 30%. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß

- a) die Primärhybridome sich nach der Fusion mit der Heteromyelomzelllinie CB-Fu 2 in einem serumfreien Selektionsmedium mit Rinderserumalbumin, Humantransferrin und Rinderinsulin als Proteinzusätze kultivieren lassen,
- b) die etablierte Hybridomzelllinie H-CB-hahE sich in einem Kulturmedium mit einem Proteinzusatz von 2 g/l Humanserumalbumin kultivieren läßt. Grundlage für das eingesetzte Kulturmedium ist das Basismedium RPMI 1640 (Moore, G. E. et al; J. Am. Assoc. 199, 519–524 [1967]; Moore, H. J.; In vitro 6, 99–100 [1970]).

Der Erfindung lagen zwei theoretische Hypothesen zugrunde:

1. im peripheren Blut von geboosterten anti-D-Spendern befinden sich B-Lymphozyten, die im Falle einer Differenzierung zur Plasmazelle in der Lage sind, multireaktive Antikörper unter anderem gegen die eigenen Erythrozyten zu bilden.
2. diese B-Lymphozyten lassen sich durch EBV-Transformation in vitro immortalisieren und zur Sekretion der Antikörper anregen, wobei ein Klassenswitch von IgM zu IgG nach längerer Kultivierung möglich ist.

Das aus der Fusion mit der Linie CB-Fu 2 (ZIM 0314) gewonnene Hybridom wird als H-CB-hahE bezeichnet. Es ist in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstitutes für Molekularbiologie der ADW der DDR, Berlin-Buch unter der Nummer ZIM 0497 hinterlegt worden. Tabelle 1 zeigt die Resultate des Primärscreenings 10 Tage nach der Fusion der EBV-transformierten Lymphozyten. Der Primärklon H-CB-hahE wurde mehrfach kloniert, an serumfreies Medium adaptiert und in größerem Maßstab in vitro kultiviert. Aus dem produzierten Zellkulturüberstand wurde der hmAK mittels Protein-A-Sepharose isoliert. Mit Hilfe der ELISA-Technik wurde gezeigt, daß der hmAK zur Klasse IgG gehört und leichte Ketten des Types Lambda besitzt. Auf allen Etappen der Herstellung der hmAK wurden verschiedene Testmethoden zum Nachweis ihrer Spezifität eingesetzt.

Tabelle 1

Ergebnisse der Fusion zwischen der Parentalzelllinie CB-Fu 2 und EBV-transformierten peripheren Blutlymphozyten eines anti-D-Spenders

Zell-kulturen	angelegt	mit Wachstum	Ig ⁺	IgM ⁺	IgG ⁺	anti-Human-erythrozyten ⁺
n	176	176	159	16	143	42
%	100	100	90,3	9,1	81,2	23,9

Ausführungsbeispiele

1. Zellpräparation, EBV-Transformation und Zellkulturbedingungen: Mittels Dichtezentrifugation werden die mononukleären Zellen gewonnen. 2×10^6 mononukleäre Zellen werden in 10 ml RPMI-1640-Basismedium resuspendiert und sedimentiert. Der Überstand wird dekantiert und das Sediment wird in 3 ml zellfreien Kulturüberstandes der EBV-infizierten Zelllinie B95/8 resuspendiert. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37°C wird die Suspension mit RPMI-1640, einem Anteil von 10% fetalem Kälberserum und einem Zusatz von 0,001 mg/ml Cyclosporin A auf eine Konzentration von 10^5 Zellen/ml verdünnt. Die Zellen werden dann zu je 1 ml/Well auf die Kavitäten einer 24-Well-Platte verteilt. Die Zellen werden kultiviert, indem alle 2–3 Tage 50% des Mediums gewechselt werden. Nach Expansion der EBV-transformierten mononukleären Zellen werden die zellfreien Überstände der Kavitäten auf anti-erythrozytäre Antikörper getestet, und die Zellen aus den positiven Kavitäten in 25-cm²-Zellkulturflaschen übernommen. Im Verlauf von 4 Monaten wird alle 4 bis 5 Tage ein Medienaustausch von 30% vorgenommen, wobei auf den Zusatz von Cyclosporin A verzichtet wird.

2. Zellfusion: Die EBV-transformierten mononukleären Zellen sowie die CB-Fu 2-Zellen werden in RPMI-1640 zweimal sedimentiert und anschließend in einem 1:5-Verhältnis von Heteromyelomzellen zu mononukleären Zellen gemischt und erneut sedimentiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes und der Resuspendierung des Sediments in der Restflüssigkeit wird langsam unter ständiger Bewegung des Sedimentes autoklaviert, noch flüssiges Polyethylenglykol 1500 zugegeben. Nach einer Wirkzeit von 120 s wird das Polyethylenglykol durch Zugabe von RPMI-1640 langsam verdünnt. Anschließend werden die Zellen nochmals gewaschen. Das Sediment wird in einem Medium folgender Zusammensetzung aufgenommen:

Basismedium – IMEM: Hams F 12 im Verhältnis 1:1,
 Proteinzusätze – ölsäurekomplexiertes Rinderserumalbumin – 1 g/l
 – Humanserumtransferrin, eisengesättigt – 10 mg/l
 – Rinderinsulin – 10 mg/l,

sowie 2 mM L-Glutamin und 2 mM Na-Pyruvat. Die Zelldichte der Suspension wird auf 10^6 Zellen/ml eingestellt, und je 0,150 ml dieser Suspension pro Kavität einer 96-Well-Platte einpipettiert. Nach 24 h wird pro Kavität eine vierfach konzentrierte HAT/Strophanthin-Lösung zugesetzt. Nach 10 Tagen Kultivierung in feuchter, 5% CO₂-haltiger Atmosphäre werden die Zellkulturüberstände gesammelt und hinsichtlich einer spezifischen Antikörperproduktion getestet. Positive Kulturen werden in RPMI-1640-Basismedium mit einem Anteil von 10% fetalem Kälberserum sowohl kloniert, als auch vergrößert und konserviert.

3. Erythrozytenbindungssassay: Zum spezifischen Nachweis anti-erythrozytärer Antikörper werden je 0,05 ml Kulturüberstand aus den Kavitäten mit Zellwachstum entnommen und in die Kavitäten einer 96-Well-Rundbodenplatte übertragen. Dann werden je 0,1 ml 0,5%iger Erythrozytensuspension in isotoner Kochsalzlösung pro Kavität zupipettiert. Die Testplatten werden 20 min bei 37°C und danach 20 min bei 4°C inkubiert. Bei Zimmertemperatur wird die vollständige Sedimentation der Erythrozyten auf den Rundboden der Kavität abgewartet. Aus den Kavitäten werden je 0,08 ml Überstand abgesaugt und je 0,05 ml Antiserum gegen

Humanimmunoglobulin (Coombsserum) zugesetzt, wobei die Erythrozyten vollständig resuspendiert werden. Nach einer Inkubation von 20 min bei 37°C wird die Sedimentation der Erythrozyten bei Zimmertemperatur abgewartet, und das Reaktionsergebnis visuell abgelesen. Der Test wird mit Erythrozyten der Blutgruppenspezifitäten 0 rh-positiv, 0 rh-negativ, A rh-negativ, B rh-negativ, AB rh-negativ, sowie mit allen Varianten von Pannellerythrozyten durchgeführt.

4. Adaptation an serumfreies Medium: Eine spezifische Antikörper produzierende Zelllinie wird innerhalb von 6 Tagen in 0,5 l RPMI-1640-Kulturmedium mit einem Anteil von 10% fetalem Kälberserum bis zu einer Zelldichte von $2,2 \times 10^5$ Zellen/ml in einer Rollerzellkulturflasche angezüchtet. Die Zellen werden in den extrakapillaren Raum eines Kapillar-Dialysators mit einer effektiven Dialyseoberfläche von 1,2 m² eingepflegt. Sie werden über einen Zeitraum von 5 Tagen im Dialysator kultiviert, indem im intrakapillaren Raum ein Basismediendurchsatz von 3 l/Tag, und am 3. Tag der Kultivierung im extrakapillaren Raum eine Erneuerung von Basismedium mit einem Zusatz von 2 g/l Humanserumalbumin erfolgt. Am 5. Tag werden die Zellen aus dem Dialysator geerntet, in RPMI-1640-Basismedium mit einem Zusatz von 2 g/l Humanserumalbumin auf $1,6 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt, in Rollerflaschen aufgenommen und zur Antikörperproduktion weiter kultiviert.

5. Antikörperaufreinigung: 2 Liter zellfreien Kulturüberstandes einer spezifische Antikörper produzierenden Zelllinie werden über eine Tangentialflußdruckfilteranlage mit einer Filterfläche von 260 cm² und einer Ausschlußgrenze von 30 kD auf 50 ml konzentriert. Mit einer 1 M Tris-Lösung wird der pH-Wert des Konzentrates auf 8,6 eingestellt. Das Konzentrat wird auf eine Protein-A-Sepharose-Säule mit einem Gelvolumen von 5 ml aufgetragen und der Antikörper wird in einem pH-Gradienten bei einem pH-Wert von 3,8 eluiert. Das Antikörperpräparat wird mit Tris-Puffer auf einen neutralen pH-Wert eingestellt und elektrophoretisch auf Reinheit analysiert.