



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **260 515 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 / 290 597 2	(22)	26.05.86	(44)	28.09.88
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Staatliches Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Klement-Gottwald-Allee 317/321, Berlin, 1120, DD
(72)	Rüger, Kornelia, Dipl.-Biol.; Köhler, Andrea, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Musielski, Herbert, Dr.-Ing. Dipl.-Ing.; Mohr, Jutta, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(54)	Verfahren zur Herstellung von agglutinierenden monoklonalen Antikörpern gegen menschliche A-Erythrozyten
------	--

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von agglutinierenden monoklonalen Antikörpern gegen menschliche Erythrozyten des Blutgruppenmerkmals A. Ziel der Erfindung ist es, diese monoklonalen Antikörper von hoher Spezifität und Reaktivität in leicht beherrschbarer Weise und kostengünstig in größeren Mengen herzustellen, um menschliche Erythrozyten des Blutgruppenmerkmals A zu typisieren. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß das in an sich bekannter Weise gewonnene Hybridom Sifin mAK Anti-A-1 (21 III 5/E 10) zur Herstellung der mAK in Zellkultur oder nach Transplantation in der Aszitesform in Mäuse eingesetzt wird. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik, speziell die Blutgruppenserologie.



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 260 515 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 / 290 597 2

(22) 26.05.86

(44) 28.09.88

(71) Staatliches Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Klement-Gottwald-Allee 317/321, Berlin, 1120, DD
(72) Rüger, Kornelia, Dipl.-Biol.; Köhler, Andrea, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Musielski, Herbert, Dr.-Ing. Dipl.-Ing.;
Mohr, Jutta, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von agglutinierenden monoklonalen Antikörpern gegen menschliche A-Erythrozyten

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von agglutinierenden monoklonalen Antikörpern gegen menschliche Erythrozyten des Blutgruppenmerkmals A. Ziel der Erfindung ist es, diese monoklonalen Antikörper von hoher Spezifität und Reaktivität in leicht beherrschbarer Weise und kostengünstig in größeren Mengen herzustellen, um menschliche Erythrozyten des Blutgruppenmerkmals A zu typisieren. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß das in an sich bekannter Weise gewonnene Hybridom Sifin mAK Anti-A-1 (21 III 5/E 10) zur Herstellung der mAK in Zellkultur oder nach Transplantation in der Aszitesform in Mäuse eingesetzt wird. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik, speziell die Blutgruppenserologie.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Zur PS Nr.260515.....

ist eine Zweitschrift erschienen.

(Patent aufrechterhalten nach § 12 Abs. 3 ErstrG)

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von agglutinierenden monoklonalen Antikörpern gegen menschliche A-Erythrozyten durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit menschlichen A-Erythrozyten, Fusion ihrer Milzzellen mit Mausmyelomzellen der Linie P30/1, Selektion der spezifischen agglutinierenden antikörperbildenden Hybride, deren Klonierung und Kultivierung bzw. Transplantation in der Aszitesform in Mäuse, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Kultivierung bzw. Transplantation der Klon SIFIN mAK „Anti-A-1 (21 III 5/E 10)“ eingesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die humane Erythrozyten der Blutgruppe A spezifisch agglutinieren. Das Anwendungsgebiet ist die Typisierung von Erythrozyten der Blutgruppe A in der Blutgruppenserologie von Blutspende- und Transfusionseinrichtungen, klinischen- und gerichtsmedizinischen Laboratorien.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Kenntnis der Blutgruppe eines Menschen ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Ausführung von Bluttransfusionen und Transplantationen. Im klassischen AB0-Blutgruppensystem werden die Merkmale 0, A, B und AB unterschieden. Die Merkmale sind unter anderem auf der äußeren Membran von menschlichen Erythrozyten vorhanden und können von menschlichen Serumantikörpern agglutiniert werden. Zur Vermeidung von Unverträglichkeitsreaktionen bei Bluttransfusionen und Transplantationen werden die Blutgruppenmerkmale durch Antiseren ermittelt.

Blutgruppentestseren bestehen aus besonders ausgewählten menschlichen Seren, deren Reaktionsparameter mit Erythrozyten den jeweiligen gesetzlichen Bestimmungen (z. B. Arzneibuch der DDR) gerecht werden müssen. In der Regel werden sie von freiwilligen, mit der jeweiligen Blutgruppensubstanz immunisierten Spendern gewonnen.

Jedes für diese Zwecke gewonnene Serum wird selbst bei gleichen Spendern graduelle Unterschiede in der Avidität und im Titer aufweisen. Die Eignung für einen Testserumpool muß überprüft werden. Eine exakte Reproduzierbarkeit der Herstellung derartiger Testseren ist nicht gegeben.

Im Gegensatz dazu lassen sich mit Hilfe der von KÖHLER und MILSTEIN (Nature **256** [1975] 495) entwickelten Hybridantentechnologie spezifische, gegen menschliche Blutgruppenmerkmale gerichtete monoklonale Antikörper produzierende Hybridomzelllinien etablieren. In der Literatur sind bereits monoklonale Antikörper dieser Spezifität beschrieben (VOAK et. al. Vox Sang. **39**, [1980], 13, MOORE et. al. Develop. biol. standard. **57**, [1984], 49, MESSETER et. al. Biotest Bulletin **1**, [1983], 308). Diese permanent kultivierbaren Zelllinien sezernieren die Antikörper in das Zellkulturmedium, das die Grundlage für einen diagnostischen Einsatz bildet. Die Literaturdaten lassen sich wegen Nichtverfügbarkeit der jeweiligen Ausgangsmaterialien nicht reproduzieren bzw. überprüfen.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, agglutinierende monoklonale Antikörper gegen menschliche Erythrozyten mit dem Blutgruppenmerkmal A zur Verfügung zu stellen. Sie sollen durch Zellkultivierung gewonnen werden und in ihren Reaktionsparametern die gesetzlichen Forderungen des Arzneibuches der DDR erfüllen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von agglutinierenden monoklonalen Antikörpern ist dadurch gekennzeichnet, daß zunächst in an sich bekannter Weise 6–10 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse mit gewaschenen humanen A₁-Erythrozyten in mehreren Applikationsstufen sowohl intraperitoneal als auch intravenös immunisiert werden. Die Lymphozyten werden aus den Milzen der immunisierten Mäuse isoliert, mit P30-/1 Myelomzellen fusioniert und die Zellsuspension in Selektionsmedium (Littlefield, Science **145** [1964] 709) kultiviert. Simultan mit dem Mediumwechsel werden die Zellkulturüberstände der Mikrotestplatten auf Anwesenheit agglutinierender Antikörper gegen humane Testerythrozyten überprüft. Aus den Vertiefungen der Mikrotestplatten, die eine positive Reaktion aufweisen, werden Hybridzellklone isoliert und separat in der Zellkultur geführt. Nach beständiger spezifischer Agglutinationsreaktion, Kryokonservierung und nach Reklonierung werden die Subklone nach spezifischer Wirkung, Titer und Avidität bewertet. Unter den derart stabilisierten Hybridomen wurde auch eine Zelllinie etabliert, die monoklonale Antikörper in das Zellkulturmedium sezerniert und unter der Nomenklatur 21 III 5/E 10 oder Sifin mAK-Anti A-1 im Staatlichen Institut für Immunpräparate und Nährmedien hinterlegt wurde.

Diese Zelllinie wird erfindungsgemäß zur Produktion der mAK in der Zellkultur eingesetzt, wobei eine stabile Produktion über einen längeren Zeitraum ohne Veränderung der Antikörperbildungsrate möglich ist. Die Produktion der mAK ist gleichermaßen auch nach Transplantation in der Aszitesform in Mäuse möglich.

Die erfindungsgemäß hergestellten mAK reagieren spezifisch mit den Erythrozyten der Blutspendemerkmale A₁, A₂, A₁B und A₂B, jedoch nicht mit 0 und B. Sie erfüllen bzw. übertreffen die im Arzneibuch der DDR gestellten Forderungen an ein Blutgruppentestserum „Anti A“.

Die Isotypcharakterisierung ergab, daß alle Subklone dieser Linie vom IgM-Typ waren. Unter Screeningbedingungen durchgeführte Vergleiche belegen, daß bei der Bestimmung des Titors eine Überlegenheit gegenüber einem polyklonalen menschlichen Anti A-Testserum (Sifin) bzw. gleiche oder höhere Verdünnungen gegenüber einem monoklonalen Anti A-Testserum (Seraclone, Fi. Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt (BRD) ermittelt wurden (Tab. 1).

Tabelle 1

Bestimmung des Titors von Zellkulturüberständen der Linie Sifin mAK Anti A-1 im Vergleich zu zwei kommerziellen Blutgruppentestseren „Anti A“

	Blutgruppenmerkmal*1										
	A ₁			A ₂			A ₁ B		A ₂ B		
	1*2	2	3	1	2	3	1	2	1	2	3
Testserum „Anti A“ sifin											
Charge: 136 11 85	2 048	1 024	2 048	512	256	256	256	512	32	32	32
Testserum „Anti A“ seraclone											
Biotest											
Charge: 12 10 55	4 096	1 024	4 096	512	1 024	2 048	512	4 096	512	1 024	1 024
Zellkulturüberstand											
Sifin mAK Anti A-1	4 096	1 024	4 096	2 048	1 024	2 048	2 048	4 096	1 024	2 048	2 048

Testbedingungen: Der Test wurde für alle Antiseren simultan durchgeführt.
Die Testseren wurden in Mikrottestplatten zu gleichen Volumina verdünnt und mit identischen Volumina von 1–2%igen in physiologischer NaCl-Lösung gewaschenen Erythrozyten vermischt.
Reaktionszeit: 20 min/23°C

*1 Keine Reaktion mit den Blutgruppenmerkmalen B und 0

*2 1 ... 3 unterschiedliche Spendererythrozyten

Ausführungsbeispiel

- 1) Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit mindestens 4 Applikationen von menschlichen A₁-Erythrozyten immunisiert worden waren, wurden nach den üblichen Techniken mit P30/1 Myelomzellen fusioniert. Die Zellsuspension wurde in HAT-Selektionsmedium (RPMI 1640 supplementiert mit 20% fetalem Kälberserum, 2 mM/l Glutamin, 2 g/l Natriumbicarbonat, 10 mM/l Hepes, 240 JE/ml Penicillin, 150 µg/ml streptomycin, 4×10^{-7} Mol/l Aminopterin, 1×10^{-4} Hypoxanthin, $1,6 \times 10^{-5}$ Mol/l Thymikin) unter Zusatz von 1×10^5 Maus-Peritonealexsudatzellen/ml 7–10 Tage bei 37°C in einer wassergesättigten 5–6%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert.
- 2) Die Selektion antikörper-produzierender Klone wurde simultan mit dem Mediumwechsel durchgeführt. Unter sterilen Bedingungen wurde die Hälfte des Zellkulturüberstandes aus den Vertiefungen der Mikrottestplatte entnommen und in getrennten Agglutinations-Mikrottestplatten identischer Abmessung, mit gewaschenen menschlichen Testerythrozyten der Blutgruppen A₁, A₂, A₁B, A₂B, B und 0 in Kontakt gebracht. Aus den Vertiefungen der Zellkulturmikrottestplatte, deren Überstände eine spezifische Agglutination hervorriefen, wurden Hybridzellklone isoliert und separat in Kultur geführt. Nach Bestätigung der Spezifitätsreaktion wurden sowohl Kryokonserven als auch Reklonierungen nach bekannten Methoden angelegt, in deren Ergebnis nach dem Agglutinationstiter selektiert wurde.
- 3) Das Hybridom SIFIN mAK Anti A-1 (21 III 5/E 10), dessen in den Zellkulturüberstand sezernierte monoklonale Antikörper die im Arzneibuch der DDR an ein Blutgruppentestserum „Anti A“ festgelegten Forderungen für die Höhe des Titors und der Avidität mit A₁, A₂, A₁B und A₂B Erythrozytensuspensionen erfüllen bzw. übertreffen, kann mit den bekannten Zellkulturtechniken vermehrt und die Kulturüberstände einschlägig gewonnen werden. Die Spezifität wurde an mehr als 50 Spendererythrozyten je Blutgruppenmerkmal A₁, A₂, A₁B, A₂B, B und 0 überprüft.
- 4) Eine Produktion der genannten Antikörper durch Vermehrung der Hybridomzellen als Aszites-Tumor in Paraffin-stimulierten Balb/c-Mäusen wies für 15 eingesetzte Tiere eine 100%ige Aszites-Tumorangehrate auf.