

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 287 956 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 / 332 714 3	(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.; Starke, Roland, Dr. med.; Hentschel, Christian, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Grunow, Roland, Dr. sc. med.; Kießig, Stephar, Dr. med.; Döpel, Holger, Dr. med.; Urban, Anette, DE				
(73)	Humboldt-Universität, Bereich Medizin (Charité), O - 1040 Berlin, DE				
(54)	Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das Mannan-Antigen des Candida albicans				

(55) Antikörper; monoklonale Antikörper; Antigen; Candida albicans; Mannan-Antigen; Immunisierung; Mäuse; Hybridzellen; Medizin; Veterinärmedizin; Lebensmittelhygiene; Diagnostik

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das Candida-albicans-Mannan-Antigen (CAM). Durch Immunisierung von Mäusen und Immortalisierung ihrer Milzlymphozyten mit einer murinen Myelomzelllinie werden die Hybridzellen H-CB-CAM-G1 und -M1 (ZIM-0484 und -0483) und daraus die entsprechenden monoklonalen Antikörper CB-CAM-G1 und -M1 erhalten. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die das *Candida albicans*-Mannan-Antigen (CAM) erkennen, durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit *Candida albicans*-Vollkeimsuspensionen und Immortalisierung ihrer Milzlymphocyten mit einer murinen Myelomzelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß daraus die Hybridomzellen H-CB-CAM-G 1 (ZIM-0484) und H-CB-CAM-M 1 (ZIM-0483) selektiert zur Züchtung eingesetzt und aus dem Überstand die monoklonalen Antikörper CB-CAM-G 1 und CB-CAM-M 1 isoliert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung der Milzlymphocyten erfolgt, nachdem das Antigen 8 bis 10 Wochen alten weiblichen Mäusen über einen Zeitraum von 8 Wochen zweimal wöchentlich intravenös appliziert 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 monoklonaler Antikörper gegen das Mannan-Antigen des *Candida albicans*. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die veterinärmedizinische Diagnostik, die humanmedizinische Diagnostik und die Lebensmittelchemie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Herstellung monoklonaler Antikörper wurde bereits von KÖHLER und MILSTEIN im Jahre 1975 beschrieben (Nature 1975, 256, 495). Sie erfolgte durch somatische Fusion von murinen antikörpersezernierenden Zellen und Zellen einer permanent wachsenden Plasmocytomzelllinie, in deren Ergebnis Hybridome erzeugt werden konnten, die nach verschiedenen Klonierungsschritten monoklonale Antikörper murinen Ursprungs gegen eine gewünschte Antigenspezifität produzierten. Die Herstellung muriner monoklonaler Antikörper gegen *Candida albicans* mittels der von KÖHLER und MILSTEIN referierten Prinziplösung wird ebenfalls im Schriftum beschrieben (HOPWOOD, V., D. POULAIN, B. FORTIER, G. EVANS und A. VERNES, 1986, Infect. Immun. 54, 222; MIYAKAWA, Y., K. KAGAYA, Y. FUKAZAWA und G. SOE, 1986, J. Clin. Microbiol. 23, 881; POLONELLI, L., und G. MORACE, 1986, J. Clin. Microbiol. 23, 366; STROCKBINE, A., M. T. LARGEN und H. R. BUCKLEY, 1984, Infect. Immun. 43, 1012; BORG, M., D. WATTERS, B. REICH und R. RÜCHEL, 1988, Zbl. Bakt. Hyg. A, 268, 62; LINEHAN, L., E. WADSWORTH und R. CALDERONE, 1988, Infect. Immun. 56, 1981). Es sind jedoch keine Hybridomlinien bekannt, die in hoher Ausbeute monoklonale Antikörper vom Typ CB-CAM-G 1 und CB-CAM-M 1 sezernieren.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Herstellung muriner monoklonaler Antikörper, die für den Aufbau von Testsystemen zum Nachweis von *Candida albicans* innerhalb der medizinischen, veterinärmedizinischen und lebensmittelhygienischen Diagnostik geeignet sind.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein effektives Verfahren zur Erzeugung von Hybridomzelllinien aus deren Zellkulturüberständen in weiterführenden Verfahrensschritten monoklonale Antikörper gegen das Mannan-Antigen des *Candida albicans* gewonnen werden können, zu entwickeln.

Die nach 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 die Immunisierung von Mäusen des Inzuchtstammes Balb/c mit einer Vollkeimsuspension des *Candida albicans* (Formalin-inaktiviert, OD 1,0 in der 1-cm-Küvette bei 650 nm) nach einem bestimmten erfinderischen Schema. Als vorteilhaft erwies sich die Verwendung von 8-10 Wochen alten weiblichen Mäusen des genannten Inzuchtstammes. Die Immunisierung erfolgte durch mehrmalige Antigenapplikation, wobei keinerlei Adjuvantien zur Anwendung kamen. Als ökonomisch günstige Variante erwies sich die intravenöse Applikation von 100 µl Vollkeimsuspension 2x wöchentlich je Versuchstier über einen Zeitraum von 8 Wochen. Aus den Milzen derart hyperimmunisierter Mäuse wurde 4 Tage nach der letzten Antigenapplikation in an sich bekannter Weise eine Einzelzellsuspension mittels Glashomogenisator 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 in Zellzuchtmedium RPMI 1640 mit einem 10%igem 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. Daraufaufgehend wurden die Zellen in eine Vielzahl von separaten 200 µl Kulturen

aufgeteilt. In einem Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthaltendem Zellkulturmedium (HAT) nach LITTLEFIELD (Science 1964, 145, 709) werden die gebildeten Hybride von den nicht fusionierten Myelom- und Milzzellen abgetrennt und erfindungsgemäß Klone selektioniert, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren.

Die Detektion dieser Klone erfolgt dadurch, daß im zellfreien Überstand der angelegten Zellkulturen durch ein geeignetes Verfahren (z. B. einem spezifischen Enzymimmunoassay (EIA)) sezernierte Antikörper gegen das Mannan-Antigen von *Candida albicans* nachgewiesen werden. Die Primärzellkulturen mit Anti-*Candida albicans*-Mannan-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-CAM bezeichnet. Besonders geeignet sind die Zelllinien H-CB-CAM-G 1 und H-CB-CAM-M 1. Diese zwei Hybridome sind in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstituts für Molekularbiologie der AdW der DDR, Berlin-Buch, unter folgenden Nummern registriert:

H-CB-CAM-G 1 als ZIM-0484

H-CB-CAM-M 1 als ZIM-0483.

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-vivo*-Bedingungen wurden die Zellen in 6-well-Zellkulturplatten bis zu einer maximalen Zelldichte von 8×10^5 Zellen/ml kultiviert, wobei Antikörperkonzentrationen im Zellkulturüberstand bis zu 26 µg/ml Ig erreicht werden. Im zweiten Fall werden die Zellen auf eine Konzentration von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und in Pristan vorbehandelte Mäuse intraperitoneal nach bekanntem Verfahren appliziert. Nach ca. 8-24 Tagen lassen sich durch Punktion bis zu 13 ml Ascitesflüssigkeit gewinnen.

Auf diese Weise werden aus den genannten Hybridomen die monoklonalen Antikörper CB-CAM-G 1 und CB-CAM-M 1 gewonnen. Durch Anwendung verschiedener biochemischer und immunchemischer Verfahren lassen sich die genannten 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.

Anwendungsbeispiele

Beispiel 1

Über einen Zeitraum von 8 Wochen werden drei weibliche Balb/c-Mäuse 2× wöchentlich mit 100 µl einer Formalin-inaktivierten *Candida albicans*-Vollkeimsuspension ($OD = 1,0$ in der 1-cm-Küvette bei 650 nm) je Versuchstier intravenös immunisiert. 4 Tage nach der letzten Antigengabe werden die Milzen der Versuchstiere entnommen und mittels Glashomogenisator Einzelzellsuspensionen hergestellt. Je Versuchstier lassen sich $1-2 \times 10^8$ Milzzellen isolieren. Diese werden mit Myelomzellen der Linie P3X63 Ag 8/653 im Verhältnis von 1:3 bis 1:8 (Myelomzellen zu Milzzellen) gemischt und mittels Polyethylenglykol 1500 fusioniert. Nach entsprechenden Waschrufen werden die Zellen in 96-well-Zellkulturplatten mit 10^5 Zellen/well in 100 µl ausplattiert.

Das dabei zur Kultivierung genutzte Standardzellkulturmedium besteht aus RPMI 1640 mit 10%igem FKS-Zusatz. Am folgenden Tag werden 100 µl eines doppelt konzentrierten HAT-Selektionsmediums zugesetzt. Eine weitere Zugabe von 50 µl des HAT-Mediums pro well der Zellkulturplatte erfolgt nach einer Woche. Nach 14-tägiger Zellkultur werden die Primärzellkulturüberstände mit einem hochspezifischen EIA hinsichtlich ihres Gehaltes an spezifischen Antikörpern geprüft. Der angewandte EIA basiert auf der Festphasenbindung von Phenol/Wasser-extrahiertem *Candida albicans* Mannan-Antigen bei einem Beladungsoptimum von 10 µg CAM/ml PBS. Das zum Antikörpernachweis in der Festphasenbindung an Polystyren eingesetzte CAM (*Candida albicans*-Mannan-Antigen) wurde sowohl chemisch als auch immunochemisch charakterisiert. Die Testergebnisse werden in Tabelle 1 dargestellt. Die positiven Primärkulturen werden auf Peritonealmakrophagen der Balb/c-Maus (10^4 /well) nach dem Grenzverdünnungsverfahren kloniert und bis zum Erreichen der Monoklonalität rekloniert. Auf diese Weise werden Zelllinien mit spezifischer Anti-*Candida albicans*-Mannan-Antigen-Antikörperproduktion erhalten.

Tabelle 1

Anzahl immunglobulinproduzierender Primärkulturen nach intravenöser Antigenapplikation

Fusions-nummer	wells total	wells mit Primärkulturen	wells mit Ig-Produktion IgM	IgG	Anti-CAM-IgG	IgM
1	288	276	100	130	8	8
2	288	288	109	128	14	12
3	288	288	128	135	38	17
Prozent	Ø	98,6	39,5	46,1	5,0	3,6

Tabelle 2

Charakterisierung der Hybridomzelllinien mit monoklonaler Antikörperproduktion gegen das *Candida albicans*-Mannan-Antigen

Klon	Verdoppelungszeit (h)	Ig-Klasse	Ig-Produktion ($\mu\text{g}/24\text{h}/0,5 \times 10^6$ Zellen/ml)
H-CB-CAM-G 1	31	G	26,0
H-CB-CAM-M 1	25	M	18,3

Beispiel 2

Nach dem beschriebenen Verfahren sind Hybridomzelllinien mit monoklonaler Antikörperproduktion gegen das *Candida albicans*-Mannan-Antigen hergestellt worden, die mit CB-CAM-G 1 und CB-CAM-M 1 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 3

Charakterisierung der Spezifität monoklonaler CB-CAM 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-CAM-G 1	CB-CAM-M 1
Antigen		
Streptococcus agalactiae (VK)	0,080	0,050
Gruppenpolysaccharid aus Str. agalact. (PA)	0,044	0,046
A-Streptokokken (PA)		
(Gruppenpolysaccharid)	0,081	0,122
C-Streptokokken (PA)		
(Gruppenpolysaccharid)	0,076	0,046
G-Streptokokken (PA)		
(Gruppenpolysaccharid)	0,120	0,082
<i>Candida albicans</i> (VK)	0,247	0,152
<i>Candida</i> -Mannan-Antigen (PA)	1,823	1,418
A-Meningokokken (VK)	0,067	0,035
<i>Hämophilus influenzae</i>		
Typ b (VK)	0,043	0,026