

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Patent beschränkt
aufrechterhalten nach
§ 12 Abs. 3 ErstrG

(12) **PATENTSCHRIFT**

(11) **DD 285 114 B5**

(51) Int. Cl.⁵: **C 12 P 21/08**
C 12 N 5/20

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 P / 329 785 1	08. 12. 88	05. 12. 90	19. 05. 94

(30) Unionspriorität:
—

(72) Erfinder: Jahn, Sigbert, Dr. sc. med., 13051 Berlin, DE; Grunow, Roland, Dr. sc. med., 10409 Berlin, DE; Porstmann, Tomas, Prof. Dr. sc. med., Berlin, DE; Wietschke, Roselotte, 10243 Berlin, DE; Effenberger, Elke, 13156 Berlin, DE; von Bæhr, Rüdiger, Prof. Dr. sc. med., 10315 Berlin, DE

(73) Patentinhaber: Bereich Medizin (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin, Schumannstr. 20/21, 10117 Berlin, DE

(74) Vertreter: Gulde & Wehlan, Pat.-Anw., Oderstr. 21, 10247 Berlin

(54) **Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die humane Cu/Zn-Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD)**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
Porstmann, T. et al., *Chim. Acta* 171 (1988) 1–10

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die verschiedene Epitope der humanen Cu/Zn-Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD) mit unterschiedlicher Bindungsaffinität erkennen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hybridomzelllinien H-CB-SOD 1 (ZIM 0384) bis H-CB-SOD 11 (ZIM 0394) eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) gegen humane Cu/Zn-Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD). Anwendungsbeispiele bestehen beim Einsatz der mAk zum Nachweis von Cu/Zn-SOD in menschlichen Körperflüssigkeiten (z. B. pränatale Diagnostik des M. Langdon-Down, der Trisomie 21) sowie der Möglichkeit der Reinigung von humaner Cu/Zn-SOD durch positive Affinitätschromatographie. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Herstellung muriner monoklonaler Antikörper (mAk) ist als technisches Problem gelöst. Das Prinzip wurde erstmalig durch G. Köhler und C. Milstein publiziert (NATURE, 1975, 258, 495), die Ak-bildende Zellen aus der Milz immunisierter Mäuse mit Zellen einer permanent wachsenden Plasmazytomzelllinie hybridisierten, Ak-produzierende Hybridoma erhielten und nach entsprechenden Klonierungsschritten monoklonale (vom einem Zell-Klon gebildete) Ak erhielten. Dieses biotechnologische Prinzip wird (modifiziert) bis heute breit angewendet. Auch die Anwendung des Verfahrens auf die Herstellung von murinen mAk gegen humane Cu/Zn-SOD ist bekannt (T. Porstmann, R. Wietschke, H. Schmechta, R. Grunow, B. Porstmann, R. Bleiber, M. Pergande, S. Stachal, R. von Baehr, Clin. Chim. Acta 171 [1988], 1-10; A. A. Khan, R. E. Warrington EP 279 705). Die Cu/Zn-SOD schützt Zellen vor der Akkumulation toxischer Superoxidradikale (O_2^-), indem sie die Reaktion $\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ katalysiert. Damit stellt die Cu/Zn-SOD ein Markerenzym für entzündliche Prozesse dar, an denen sie regulativ als Zellschutz mitwirkt (J. Fridovich: in Advances in Enzymology, ed. H. Rister, Vol. 41, 39-97, 1974). Der Nachweis von Cu/Zn-SOD bei entzündlichen Reaktionen (z. B. Rheumatoider Arthritis) ist von diagnostischer Wertigkeit (H. Rister and K. Bauermeister: Klin. Wochenschr. 60, 1982, 561-565). Von besonderer klinisch-diagnostischer Bedeutung jedoch ist die Lokalisation des Gens für Cu/Zn-SOD auf Chromosom 21, das beim M. Langdon-Down (Trisomie 21) in den Körperzellen dreimal vorliegt. Die somit verstärkte Genexpression führt zur Erhöhung der intrazellulären Cu/Zn-SOD-Konzentration und wird zum diagnostischen Nachweis der Erkrankung genutzt (P. Sinet; in: Alzheimer's Disease, Down's Syndrome and Aging. Ann. NY. Acad. Sci. 396, 83-94, 1982, New York, USA).

Zum Nachweis humaner Cu/Zn-SOD wurden bisher u. a. ELISA-Techniken genutzt, die ausschließlich auf polyklonalen anti-Cu/Zn-SOD-Antisera basieren (S. Iizuka, N. Taniguchi, A. Makita; JNCI. 72, 5, 1984, 1043-1048). Diese Testsysteme sind schwer zu standardisieren und gewährleisten nicht die geforderte Sensitivität, wie sie zum Beispiel für den intrazellulären Nachweis von humaner Cu/Zn-SOD in intrauterinem Material gefordert wird.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, monoklonale Antikörper gegen humane Cu/Zn-SOD zum Einsatz für diagnostische Zwecke zu entwickeln.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung besteht in der Entwicklung eines Verfahrens zur effektiven Erzeugung von murinen Hybridomzelllinien, von denen in anschließenden methodischen Schritten monoklonale Antikörper gegen Cu/Zn-SOD isoliert werden können. Die Hybridomzellen sollen in optimalem ökonomischen Aufwand-Nutzen-Verhältnis in vitro (bis zum Large-Scaling im Bioreaktor) und in vivo (Ascites-Flüssigkeit der Maus) kultivierbar sein und durch hohe Antikörper-Sekretionsleistung die Reinigung begünstigen.

Die Aufgabe wurde derart gelöst, daß zunächst Mäuse vom Stamm Balb/c mit einem gereinigten Rekombinanten-Präparat der humanen Cu/Zn-SOD nach einem bestimmten, der Erfindung gemäßen Schema immunisiert werden. Als vorteilhaft erwies sich die Verwendung von 8-10 Wochen alten weiblichen Balb/c-Mäusen. Die Immunisierung erfolgte durch mehrmalige Applikation des Antigens. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Mäuse zunächst ca. alle 6 Wochen eine Dosis von 50 µg des gereinigten Rekombinanten-Cu/Zn-SOD-Materials in komplettem Freund'schen Adjuvans intraperitoneal über einen Zeitraum von 8-12 Monaten appliziert bekamen. Die letzte Immunisierung erfolgte erfindungsgemäß mit 100-150 µg des Antigens in Phosphatpuffer intravenös. Aus den Milzen derart hyperimmunisierter Mäuse wurde 5 Tage nach der letzten Immunisierung durch Gewebe-Homogenisierung eine Einzel-Zell-Suspension hergestellt.

Als Fusionspartner für diese Zellen wurden Maus-Myelomzellen der Linie P3X63 Ag8/653 (J. KEARNEY et al., J. Immunol. 123, 1979, 548) verwendet, die in RPMI 1640 Zellzuchtmedium, ergänzt mit 10% Fetalem Kälberserum (FKS), kultiviert wurden. Nach Mischen der Zellsuspensionen (Milzlymphozyten: Myelomzellen im Verhältnis 5:1) und ihrer Sedimentation erfolgte die Zellfusion durch PEG (50%) in Gegenwart von DMSO (6%). Anschließend wurden die Zellen in Subkulturen (mehrere Hundert pro Fusion zu je 200 µl Volumen) aufgeteilt und in einem HAT-Selektionsmedium (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin;

Littlefield, Science, 145, 1964, 709) kultiviert. Damit konnten nicht fusionierte Zellen der permanenten Myelomlinie eliminiert und, erfindungsgemäß, Hybridzellen selektioniert werden, die Antikörper gegen humane Cu/Zn-SOD produzieren. Die Detektion spezifischer Zellkulturen erfolgte im ELISA. Primärzelllinien mit spezifischer Antikörper-Produktion wurden nach dem Grenzverdünnungsprinzip (C. Taswell; J. Immunol. 128, 1981, 1614) kloniert und subkloniert, bis mit statistischer Sicherheit Hybridoma erhalten wurden, die äußerst stabil und mit bisher nicht beschriebener, hoher Effizienz monoklonale Antikörper gegen humane Cu/Zn-SOD sezernieren. Diese Hybridoma wurden als H-CB-SOD bezeichnet. Etabliert wurden die Hybridoma-Klone H-CB-SOD 1 bis H-CB-SOD 11. Diese 11 Hybridoma sind in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstitutes für Molekularbiologie der AdW der DDR, Berlin-Buch, unter den Nummern ZIM-0384 bis ZIM-0394 registriert. Bei den beschriebenen Hybridoma handelt es sich um Zelllinien mit hoher Produktivität (nur wenige vergleichbare Daten aus dem internationalen Schrifttum sind bekannt). Die Hybridomzellkulturen eignen sich für die Massenproduktion von mAk in vitro und in vivo.

Erstmals ist es gelungen, in den beschriebenen Hybridomalinien mAk zu produzieren, die verschiedene Epitope der humanen Cu/Zn-SOD erkennen. Die überraschend hohe Antigen-Bindungsaffinität erlaubt den Einsatz der mAk zu diagnostischen und biotechnologischen Zwecken.

Es liegen experimentelle Erfahrungen bei der Bearbeitung der Hybridoma im Airlift-Bioreaktor (Kulturvolumen 50l) in vitro sowie der Ascitesproduktion in pristanbehandelten Balb/c-Mäusen in vivo vor. Auf diese Weise wurden aus den beschriebenen Hybridomkulturen die monoklonalen Antikörper CB-SOD 1 bis CB-SOD 11 in großen Mengen gewonnen. Durch verschiedene Verfahren lassen sich die mAk bis zu einem hohen Reinheitsgrad anreichern. Für die Entwicklung bestimmter Testverfahren können die Ak mit Enzymen (z. B. Peroxidase) markiert werden. Sie können außerdem zur Anwendung bei Trennverfahren (positive Affinitätschromatographie) an bestimmte Trägermaterialien gekoppelt werden.

Ausführungsbispiele

Beispiel 1

Über einen Zeitraum von 6 Monaten werden 5 Mäuse mit jeweils 50 µg gereinigter Rekombination-Cu/Zn-SOD (GRÜNTAL-AG) in komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert. Die Boosterungen erfolgen alle 6 Wochen. Nach der letzten Immunisierung mit 150 µg Antigen intravenös werden pro Tier etwa 2×10^8 Milzzellen isoliert. Diese werden durch Polyethylenglykol 1500 (unter Zusatz von 6% DMSO) mit 2×10^7 Myelomzellen P3X63 Ag 8.653 fusioniert. Nach entsprechenden Waschstritten werden die Zellen in 96-well-Flachboden-Zellkulturplatten mit 10^5 Milzzellen in 150 µl pro well ausplattiert. Als Zellzuchtmedium wird RPMI 1640, ergänzt durch 10% hitzeinaktiviertes FKS verwendet. Am nächsten Tag werden pro well 50 µl 4fach konzentriertes HAT-Selektionsmedium zugesetzt. Nach ca. 14 Tagen werden die Primärkulturen mit einem spezifischen ELISA hinsichtlich der Produktion spezifischer Antikörper gegen humane Cu/Zn-SOD geprüft. Nach dem angegebenen Verfahren können bis zu 20% der Primärkulturen spezifische Antikörper produzieren. Die positiven Primärkulturen werden auf Maus-Peritonealmakrophagen (10^4 pro well) nach dem Grenzverdünnungsverfahren kloniert und rekloniert. Auf diese Weise werden monoklonale Zelllinien mit spezifischer Antikörperproduktion gegen humane Cu/Zn-SOD erhalten.

Beispiel 2

Die klonierten Zelllinien mit spezifischer Antikörperproduktion gegen humane Cu/Zn-SOD werden in RPMI 1640 Kulturmedium, ergänzt durch 10% fetales Kälberserum, gezüchtet in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil. Durch schrittweise Adaptation lassen sich diese Zellen auch in Medien mit 2-5% FKS-Anteil züchten. Die Zellen werden in Zellkulturflaschen vermehrt. Mit Verdünnungsraten von bis zu 1:10 kann das Kulturvolumen expandiert werden. Die Massenproduktion der Antikörper erfolgt in Rollerflaschen und anschließend im Airlift-Bioreaktor mit 50 Litern Volumen. Eine Beschreibung der In-vitro-Zellkultureigenschaften der Hybridoma erfolgt in Tabelle 1.

Beispiel 3

In Zellkulturflaschen (Volumen 275 ml; NUNCLON, Kamstrup, Dänemark) werden die monoklonalen Hybridoma auf eine Zellmenge von (10^7 - $2,5 \times 10^7$) gezüchtet. Die Zellen werden abzentrifugiert und in phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung resuspendiert. Je 1 ml Suspension mit einer bestimmten (optimierten) Zellzahl wird Balb/c-Mäusen intraperitoneal appliziert, die 8 Tage zuvor mit 1 ml Pristan behandelt worden waren. Nach 5-14 Tagen zeigt die Bauchschwellung den Beginn der Ascitesproduktion. Die Hybridomklone unterscheiden sich hinsichtlich optimaler Bedingungen und Effektivität in der In-vivo-Gewinnung von mAk gegen humane Cu/Zn-SOD (Tabelle 2). Die Reinigung der monoklonalen Antikörper erfolgt nach bekannten Verfahren.

Beispiel 4

Nach dem beschriebenen Schema werden Hybridomzelllinien mit Antikörperproduktion gegen mindestens 3 verschiedene Epitope der Cu/Zn-SOD gewonnen, die mit CB-SOD 1 bis CB-SOD 11 bezeichnet werden. Die Antikörper reagieren mit hoher Affinität mit den entsprechenden Epitopen auf dem Molekül der humanen Cu/Zn-SOD.

Tabelle 1: Maus-Hybridoma mit Antikörperproduktion gegen humane Cu/Zn-SOD

Hybridom	Verdopplungszeit (Std.)	mAk-Produktion in vitro µg per 24 Std. per 10 ⁶ Zellen
H-CB-SOD 1	15	154
H-CB-SOD 2	18	133
H-CB-SOD 3	22	80
H-CB-SOD 4	28	34
H-CB-SOD 5	28	62
H-CB-SOD 10	36	168
H-CB-SOD 11	34	141

Tabelle 2: Produktion muriner monoklonaler Antikörper gegen humane Cu/Zn-SOD in vivo (Ascitesflüssigkeit)

Hybridom	Ig-Konzentration in Ascites- Flüssigkeit (mg/ml)
H-CB-SOD 1	50
H-CB-SOD 2	20
H-CB-SOD 3	40
H-CB-SOD 4	12
H-CB-SOD 5	30
H-CB-SOD 10	10
H-CB-SOD 11	20

Tabelle 3: Murine monoklonale Antikörper gegen humane Cu/Zn-SOD

Antikörper	Ig-Subklasse	Bindungsaffinität (l/Mol)
CB-SOD 1	IgG 1	$1,5 \times 10^{10}$
CB-SOD 2	IgG 1	$4,7 \times 10^7$
CB-SOD 5	IgG 1	$1,2 \times 10^{10}$
CB-SOD 11	IgG 1	$1,0 \times 10^{10}$