



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 274 448 A1

 4(51) C 12 P 21/00
 A 61 K 39/395
 C 12 N 5/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 316 478 8	(22)	29.07.88	(44)	20.12.89
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, Berlin, 1080, DD
(72)	Grunow, Roland, Dr. sc. med.; Porstmann, Tomas, Prof. Dr. sc. med.; Döpol, Holger, Dr. med.; Kießig, Stephan, Dr. med.; Jahn, Sigbert, Dr. med., DD

(54) Verfahren zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper gegen Strukturproteine des HIV

(55) Antikörper, humane monoklonale Antikörper, Human Immunodeficiency Virus, HIV, AIDS, Strukturproteine, Zelllinie, Human-Maus-Heteromyelomzelllinie, Fusion, B-Lymphozyten, Medizin, Diagnostik

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper (hmAk) gegen Strukturproteine des Human Immunodeficiency Virus (HIV, Erreger der Immunschwächekrankheit AIDS). Die hmAK CB-hp25-1 bis -3 sowie CB-hgp41-1 und -2 werden aus den Hybridomen H-CB-hp25-1 bis -3 sowie H-CB-hgp41-1 und -2 (ZIM-0315 bis -0317 sowie ZIM-0318 und -0319) gewonnen, die ihrerseits aus der Human-Maus-Heteromyelomzelllinie CB-Fu2 (ZIM-0314) nach Fusion mit HIV-tragenden B-Lymphozyten erhalten werden. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Patentansprüche:

Verfahren zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper, die verschiedene Strukturen des Human Immunodeficiency Virus (HIV) erkennen, **dadurch gekennzeichnet**, daß normale humane B-Lymphozyten mit einer Maus-Myelomzelllinie fusioniert und solche Hybridomzellen selektiert werden, die keine eigene Antikörperproduktion aufweisen, daraus Subklone gewonnen werden, von denen die Heteromyelomzelllinie CB-Fu 2 (ZIM-0314) ausgewählt wurde, mit der Zelllinie CB-Fu 2 (ZIM-0314) nach Fusion mit B-Lymphozyten aus dem Blut HIV-infizierter Probanden Hybridomzellen selektiert, daraus die Hybridomzellen H-CB-hp25-1 (ZIM-0315), H-CB-hp25-2 (ZIM-0316), H-CB-hp25-3 (ZIM-0317) sowie H-CB-hgp41-1 (ZIM-0318) und H-CB-hgp41-2 (ZIM-0319) ausgewählt, zur Züchtung eingesetzt und aus dem zellfreien Überstand die humanen monoklonalen Antikörper CB-hp25-1, CB-hp25-2, CB-hp25-3 sowie CB-hgp41-1 und CB-hgp41-2 isoliert werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper (hmAk) gegen Strukturproteine des Human Immunodeficiency Virus (HIV). Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Produktion hmAK stellt eine relativ neue Quelle von Antikörpern für die Diagnostik, Prophylaxe und Therapie verschiedener Erkrankungen des Menschen dar. International werden große Anstrengungen zur Erzeugung hmAk gegen bakterielle und virale Antigene, Tumor- und Zell- bzw. Gewebsantigene unternommen (James, K. u. G. T. Bell: Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects. J. Immunol. Meth. 100 [1987], 5-40). Erstmals hatten Köhler und Milstein (Nature, 1975, 256, 495) durch somatische Fusion von murinen antikörperbildenden Zellen und Zellen einer permanent wachsenden Plasmazytomzelllinie Hybridome erzeugt, die nach entsprechenden Klonierungsschritten monoklonale Antikörper von der Maus gegen eine gewünschte Antigenspezifität produzierten. Nach dieser prinzipiellen biotechnologischen Lösung sind auch monoklonale Antikörper gegen Determinanten des HIV erzeugt worden. (Chassagne, J., Verelle, P., Klatzmann, D., Montagnier, L., Dionet, C., Gluckman, J. C., Patent Cooperation Treaty [1986] WO 86/04336; Mc Dougal, J. S., Nicholson, J. K., Gross, G. D., Cort, S. P., Kennedy, M. S., Mawle, A. C.: J. Immunol. 137 [1986] 2937-2944; Robert-Guroff, U., Brown, U., Gallo, R. C.: Nature 316 [1985] 72-74).

Die effektive Gewinnung humaner monoklonaler Antikörper (hmAk) gegen die verschiedensten Antigenspezifitäten ist weltweit bisher durch 2 Hauptprobleme erschwert (Engleman, E. B., S. K. Foug, J. Larrick und A. Raubitschek; Human hybridomas and monoclonal antibodies, Plenum Press, New York 1985):

1. Die Verfügbarkeit einer Fusionszelllinie, die mit vergleichbarer Fusionsfrequenz wie im Maus x Maus-System in der Lage ist, humane B-Lymphozyten zu immortalisieren.

2. Die geringe Frequenz an Antigen-spezifischen B-Precursorzellen im peripheren Blut des Menschen.

Mit diesen beiden Problemen ist eine geringe Ausbeute an Hybridomzellklonen verbunden, die spezifische Antikörper gegen ein vorgegebenes Antigen produzieren. Damit ist auch mit großer Wahrscheinlichkeit der Umstand zu erklären, daß weltweit trotz intensiver Bemühungen die Herstellung hmAk gegen Strukturproteine des HIV durch somatische Zellhybridisierung bisher selten beschrieben wurde (Banapour, B., K. Rosenthal, L. Rabin, V. Sharma, L. Young, J. Fernandez, E. Engleman, M. McGrath, G. Reyes u. J. Lifson: Characterization and epitope mapping of a human monoclonal antibody reactive with the envelop glycoprotein of human immunodeficiency virus. J. Immunol. 139 [1987], 4027-4033; McClure, J., EP-PS 251 612).

Die bisher beschriebenen humanen mAk gegen HIV-Proteine wurden mit Hilfe der Transformation humaner B-Lymphozyten mit Epstein-Barr-Virus (EBV) erzeugt. Da das EBV ein humanpathogenes Virus darstellt, ist die prospektive Anwendung der so produzierten Antikörper beim Menschen mit Problemen belastet. Trotz intensiver Bemühungen gelang es anderen Arbeitsgruppen nicht, z. B. durch 30 Fusionen von peripheren Blutlymphozyten HIV-Infizierter mit der NS-1 Parentalzelllinie, humane mAk gegen HIV-Antigene zu erzeugen (Zolla-Pazner, S., Pinler, A., Mizuma, H.: J. Virol. Meth. 17 [1987] 45-53). Zur Patentanmeldung kommt hier ein Verfahren zur Herstellung humaner mAk gegen HIV-Strukturproteine und die Gewinnung entsprechender mAk mit neuen, verbesserten Eigenschaften unter Verwendung der Fusionszelllinie CB-Fu 2 (ZIM-0314).

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, der medizinischen Diagnostik humane monoklonale Antikörper zur Verfügung zu stellen, die zum Aufbau eines Testsystems zur Erkennung von Antigenen des HIV geeignet sind.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem zunächst effektiv Hybridomzelllinien erzeugt werden können, von denen in anschließenden Verfahrensschritten humane monoklonale Antikörper (hmAk) gegen verschiedene Determinanten des HIV isoliert werden können. Die Hybridomzelllinien sollen mit ökonomisch günstigem Aufwand in vitro und in vivo kultivierbar sein und für eine Reinigung ausreichend hohe Mengen an hmAK sezernieren.

Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß eine Human-Maus-Heteromyelomzelllinie (CB-Fu2) aus normalen humanen B-Lymphozyten und einer Maus-Myelomzelllinie hergestellt, mit dieser Zelllinie nach Fusion mit B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut HIV-infizierter Probanden Hybridomzellen (H-CB-hp25-1 bzw. -3 sowie H-CB-hgp41-1 und -2) selektiert, zur Züchtung eingesetzt und aus dem zellfreien Überstand humane monoklonale Antikörper (CB-hp25-1 bis -3 sowie CB-hgp41-1 und -2) isoliert werden. Die Heteromyelomzelllinie CB-Fu2 wurde durch Selektion solcher Hybridomzellen gewonnen, die keine eigene Antikörperproduktion aufwiesen und aus deren Subklonen die Linie CB-Fu2 hervorgeht. Die Human-Maus-Heterofusionszelllinie CB-Fu2 zeichnet sich durch eine hohe Fusionsfrequenz und eine hohe Immortalisationsrate Immunglobulin-produzierender B-Lymphozyten aus. Mit dieser Zelllinie wurden nach Fusion mit B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut HIV-infizierter Probanden verschiedene hmAk gegen Strukturproteine des HIV erzeugt. Die Spezifität dieser Antikörper wurde in verschiedenen Testsystemen charakterisiert.

Tabelle 1 zeigt die Resultate des Primärscreenings der Zellkulturen etwa 3 Wochen nach der Fusion. In 99% der angelegten Zellkulturen wurde in HAT-(Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)-Medium progressives Zellwachstum beobachtet, zum großen Teil mehr als ein Zellklon. In mehreren Kavitäten wurde die Produktion von IgM bzw. IgG nachgewiesen. In einigen Zellkulturüberständen konnten im EIA IgM- bzw. IgG-Antikörper gegen HIV-Bestandteile bestimmt werden.

Durch mehrfache Klonierungen wurden IgM- und IgG anti-HIV produzierende Zellklone etabliert. Die L-Ketten der Antikörper sind vom kappa-Typ, die IgG-Antikörper vom IgG1-Subtyp. Zwei der spezifischen IgG anti-HIV Antikörper wurden näher untersucht und als CB-hgp41-1 und CB-hp25 bezeichnet.

Mit Hilfe des Westernblots wurde die Antigenspezifität der Antikörper näher untersucht. Der monoklonale Antikörper CB-hgp41-1 reagiert mit dem gp41 Transmembran-Env-Protein des HIV. Die Reaktion mit rekombinanten Antigenen erbrachte auch eine Bande im gp160-Bereich, dem Precursorprotein von gp120 und gp41. Mit Hilfe von mehreren Peptiden, die analog verschiedener Bereiche des gp41 synthetisiert wurden, wurde die genaue Bindungsstelle des Antikörpers im Bereich der Aminosäuren 606-612 identifiziert. Der monoklonale Antikörper CB-hp25 zeigt eine Reaktion mit dem Major-Coreprotein p25 und den Precursorproteinen p55 und p41.

Der Immunofluoreszenztest weist mit den HIV-infizierten Zellen charakteristische Reaktionsmuster der monoklonalen Antikörper aus. Die Zelllinien zeigen stabiles Wachstum und kontinuierliche Antikörperproduktion über einen Zeitraum von mehreren Monaten.

Überraschenderweise bewirken diese Antikörper in einem biologischen Testmodell gegenüber entsprechenden Kontrollen eine Verzögerung der Infektion humaner T-Zellen mit dem HIV und zeigen damit eine potentielle Wirksamkeit zur Prophylaxe bzw. Therapie des AIDS.

Die Hybridome sind in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstituts für Molekularbiologie der AdW der DDR, Berlin-Buch, unter folgenden Nummern registriert:

H-CB-hp25-1 als ZIM-0315
H-CB-hp25-2 als ZIM-0316
H-CB-hp25-3 als ZIM-0317
H-CB-hgp41-1 als ZIM-0318
H-CB-hgp41-2 als ZIM-0319,

die Fusionslinie CB-Fu2 unter ZIM-0314.

Die Hybridomzellkulturen eignen sich zur in vitro- bzw. in vivo-Produktion der humanen monoklonalen Antikörper CB-hp25-1, CB-hp25-2, CB-hp25-3 sowie CB-hgp41-1 und CB-hgp41-2.

Tabelle 1:

Ergebnisse der Fusion zwischen der Parentalzelllinie CB-Fu2 und peripheren Blutlymphozyten eines HIV-Antikörperträgers

Zellkulturen	angelegt	mit Wachstum	IgM ⁺	IgG ⁺	HIV _{IgM} ⁺	HIV _{IgG} ⁺
n	468	462	348	62	6	5
%	100	99	74	13	1	1

Ausführungsbeispiele

1. Zellpräparation: Mononukleäre Zellen (MNZ) werden aus heparinisiertem Blut von HIV-Antikörperträgern durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Die Heteromyelomzelllinie CB-Fu2 ist durch Fusion von normalen humanen B-Lymphozyten und der Maus-Myelomzelllinie P3X63 Ag8/653 entstanden. Es werden solche Hybridomzellen selektiert, die keine eigene Antikörperproduktion aufweisen. Diese Zelllinien werden mehrfach in 8-Azaguanin passagiert bzw. kloniert, um HAT-sensitive Subklone zu erhalten. Die Linie CB-Fu2 zeichnet sich durch ein gutes Wachstum und eine hohe Immortalisierungsrate humaner B-Lymphozyten nach Hybridisierung aus.

2. Zellfusion und Zellkulturbedingungen: Die mononukleären sowie die CB-Fu2-Zellen werden in Serum-freiem RPMI 1640 (SIFIN, DDR) zweimal sedimentiert und anschließend in einem 1:5 Verhältnis von Heteromyelomzellen zu MNZ gemischt und erneut sedimentiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes und der Resuspendierung des Sediments in der Restflüssigkeit wird langsam unter ständiger Bewegung des Sediments autoklaviertes, noch flüssiges Polyethylenglykol 1500 zugegeben. Nach einer Wirkzeit von 90 sec wird das Polyethylenglykol durch Zugabe von RPMI 160 langsam verdünnt. Anschließend werden die Zellen nochmals gewaschen und danach mit RPMI 1640 mit einem Anteil von 10% fetalem Kälberserum (FKS) auf eine Konzentration von 10⁶ Zellen/ml verdünnt. 100µl dieser Zellsuspension werden pro Nöpfchen einer 96-well-Zellkulturplatte einpipettiert. Nach 24 Stunden wird pro Nöpfchen 100µl einer doppelt konzentrierten HAT-Lösung zugesetzt. Nach 2-4 Wochen

Kultivierung in feuchter, 5% CO₂-haltiger Atmosphäre werden von den Zellkulturen die Überstände gesammelt und hinsichtlich einer spezifischen Antikörperproduktion getestet. Positive Kulturen werden mehrfach mit der Grenzverdünnungstechnik kloniert.

3. Enzymimmunoassay (EIA): Der Nachweis von spezifischen anti-HIV Antikörpern erfolgt mit Hilfe eines „Sandwich“-EIA. Elektronenmikroskopisch reine HIV-Partikel aus Zellysate von HIV-infizierten H9-Zellen werden in einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml an Flachboden-Mikrotiterplatten aus Polystyren adsorbiert. 50 µl der Zellkulturüberstände werden in den Antigen-beschichteten Platten über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen werden 50 µl einer Lösung von Peroxidase-konjugierten Antikörpern spezifisch gerichtet gegen humane Immunglobuline, dazugegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das gebundene Konjugat wird durch die Substratreaktion mit Wasserstoffperoxid und o-Phenylendiamin nachgewiesen. Die Farbreaktion wird bei 492 nm mit einem Multiscan Vertikalphotometer gemessen. IgG- und IgM-Isotypen werden in den Zellkulturüberständen mit einem Zweiseiten-Bindungsassay getestet (Jahn, S., S. T. Kiessig, A. Lukowsky, H.-D. Volk, T. Porstmann, R. Grunow u. R. v. Baehr: Pokeweed mitogen induced synthesis of human IgG and IgM in vitro. Biomed. Biochim. Acta 45 [1986], 467).

4. Immunoblotting: Das gereinigte Virusmaterial wird denaturiert und mit 2,5% Sodium Dodecylsulfat (SDS) und 5% 2-Merkaptoethanol bei 90°C für 5 min reduziert und danach in einem 10%igen Polyacrylamid-Slabgel elektrophoretisch getrennt. Die Proteinbanden werden auf Nitrozellulosepapier elektrotransferriert. Nach dem Blocken mit 5% Trockenmilch werden die Streifen in 5 ml 1:2 verdünnten Zellkulturüberstand eingetaucht. Die gebundenen Antikörper werden mit Peroxidase-markierten anti-human IgG-Antikörpern und Färbung mit Diaminobenzidin (0,1% NiCl₂) nachgewiesen.

5. Immunofluoreszenztest: H9- oder K37-Zellen, die eine hohe Infektionsrate mit HIV aufweisen, werden auf 10-Feld-Objektträger aus dem Sediment aufgeschwemmt und luftgetrocknet. Die Zellen werden mit eiskaltem Azeton für 10 min fixiert und die Zellkulturüberstände auf die Präparate für 2 h bei 37°C gegeben. Nach dem Auswaschen der überschüssigen Antikörper wird für 45 min mit einem FITC-antihuman IgG-Antikörper (ATAB, USA) inkubiert und deren Bindung nach dem Waschen mit einem Umkehrfluoreszenzmikroskop untersucht. Als Positivkontrolle dient ein Serumpool von HIV-Antikörperträgern, und als Negativkontrollen werden negative Zellkulturüberstände bzw. zum Ausschluß von anti-zellulären Antikörpern nicht-infizierte H9- oder K37-Zellen verwendet.

6. Neutralisationstest: Es werden humane T-Zellenlinien (K37) gezüchtet, die mit HIV infiziert (K37⁺) oder nicht infiziert (K37⁻) sind. Die Infektion der K37⁻-Zellen kann durch Inkubation dieser Zellen mit einem HIV-haltigen, zellfreien Überstand von K37⁺-Zellen (Variante 1) oder durch Vermischen von K37⁻- und K37⁺-Zellen im Verhältnis 100:1 erfolgen (Variante 2). Die Ausbreitung der Infektion in den davon angelegten Zellkulturen wird mit dem Immunfluoreszenztest unter Verwendung eines spezifischen anti-HIV-Antiserums festgestellt. Wird während der Infektionsphase bestimmtes polyklonales anti-HIV-Humanserum den Kulturen zugesetzt, kommt es zur Verhinderung oder Verzögerung der Infektionsausbreitung. Setzt man anstelle des Antiserums z. B. den humanen mAK CB-hgp41-1 zu, kommt es überraschendweise zu einem ähnlichen Effekt, insbesondere bei der Variante 2.