



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 271 916 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 / 315 6J2 8	(22)	09.05.88	(44)	20.09.89
(71)	Humboldt-Universität zu Berlin, Unter den Linden 6, Berlin, 1080, DD				
(72)	Grunow, Roland, Dr. sc. med.; Jahn, Sigbert, Dr. med.; Porstmann, Bärbel, Doz. Dr. sc. med.; Effenberger, Elke; Porstmann, Tomas, Prof. Dr. sc. med., DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen HBsAg				

(55) Antikörper, monoklonale Antikörper, Antigen, Hepatitis-Virus, HBsAg, Immunisierung, Mäuse, Hybridzellen, Medizin, Diagnostik

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene des Hepatitis-Virus (HBsAg). Durch Immunisierung von Mäusen und Immortalisierung ihrer Milzlymphozyten mit einer murinen Myelomzelllinie werden die Hybridomzellen H-CB-HBsA, -B, -E, -F, -93 (ZIM 0276 bis 0280) und daraus die entsprechenden monoklonalen Antikörper CB-HBsA, -B, -E, -F und -93 erhalten. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die verschiedene Strukturen des Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigens (HBsAg) erkennen, durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit HBsAg und Immortalisierung ihrer Milzlymphozyten mit einer murinen Myelomzelllinie, **dadurch gekennzeichnet**, daß daraus die Hybridomzellen H-CB-HBsA (ZIM 0276), H-CB-HBsB (ZIM 0277), H-CB-HBsE (ZIM 0278), H-CB-HBsF (ZIM 0279) und H-CB-HBs93 (ZIM 0280) selektiert, zur Züchtung eingesetzt und aus dem zellfreien Überstand die monoklonalen Antikörper CB-HBsA, CB-HBsB, CB-HBsE, CB-HBsF und CB-HBs93 isoliert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Immunisierung der Mäuse an 8 bis 10 Wochen alten weiblichen Mäusen durch Applikation des Antigens dergestalt vorgenommen wird, daß zunächst alle 6 Wochen eine intraperitoneale Gabe des Antigens über einen Zeitraum von 8 bis 12 Monaten erfolgt und die letzte Gabe intravenös vorgenommen wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene des Hepatitis-Virus (HBsAg). Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bereits bekannt, monoklonale Antikörper herzustellen. Erstmals haben 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. Mit dieser prinzipiellen biotechnologischen Lösung sind bereits auch monoklonale Antikörper gegen Determinanten des HBsAg erzeugt worden (A. H. Goodal, G. Janossy, H. C. Thomas, Eur. Pat. Appl. EP 0038642; A. Budkowska, M. M. Riottot, P. Dubreuil, Y. Lazizi, C. Brechot, E. Sobczak, M. A. Pelit, J. Pillot, J. Med. Virol., 1986, 20, 111; Y. Eda, T. Maeda, K. Nishiyama, A. Tashiro, Eur. Pat. Appl. EP 0 179 483 (CL C 12 P 21/00, Wands, J. R., Bruns, R. R., Carlson, R. J., Ware, A., Menetore, J. E., Iselbacher, K. J., Proc. Natl. Acad. Sci., 1982, 79, 1277-1281; Peterson, D. L., Paul, D. A., Lam, J., Tribby, I. I. E., Achord, D. T., J. Immunol., 1984, 132, 920-927). Es sind jedoch keine Hybridomlinien bekannt, die in hoher Ausbeute monoklonale Antikörper vom Typ CB-HBsA, -93, -E, -F und -B sezernieren.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, der medizinischen Diagnostik monoklonale Antikörper zur Verfügung zu stellen, die zum Aufbau eines Testsystems zur Erkennung von Oberflächenantigenen des Hepatitis-B-Virus 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 monoklonale Antikörper gegen verschiedene Determinanten des HBsAg 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 monoklonalen Antikörpern sezernieren.

Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß zunächst Mäuse vom Stamm Balb/c mit einem hochgereinigten HBsAg aus positiven Patientenserum (T. Porstmann et al., Dt. Gesundheitswesen, 1980, 35, 1587-1593) nach einem bestimmten, erfinderischen Schema immunisiert wurden. Vorteilhaft ist die Verwendung von 8-10 Wochen alten weiblichen Mäusen. Die Immunisierung erfolgt durch mehrmalige Applikation des Antigens. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Mäuse zunächst etwa alle 6 Wochen eine Dosis von 50 µg des gereinigten HBsAg in komplettem Freund'schen Adjuvanz intraperitoneal über einen Zeitraum von 8-12 Monaten appliziert bekamen. Die letzte Immunisierung erfolgte mit 100-150 µg des Antigens in Phosphatpuffer intravenös. Aus den Milzen derart hyperimmunisierter Mäuse wurde 5 Tage nach der letzten Immunisierung in an sich bekannter Weise eine Zellsuspension hergestellt.

Als Fusionspartner für diese Zellen wurden Mausmyelomzellen der Linie P3 X 63 Ag 8/653 (Kearney et al., J. Immunol., 1979, 123, 1548-1550) verwendet, die in einem Zellzuchtmedium RPMI 1640, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), kultiviert wurden.

Die Zellfusion wurde nach Vermischen beider Fusionspartner und ihrer Sedimentation unter Verwendung von Polyethylenglykol induziert. Anschließend werden die Zellen in eine Vielzahl von separaten 200 µl Kulturen aufgeteilt. In einem Zellkulturmedium, welches Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) enthält (Littlefield, Science, 1964, 145, 709), werden die gebildeten Hybride von den nicht fusionierten Myelomzellen abgetrennt und erfindungsgemäß Klone selektiert, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren. Die Detektion dieser Klone erfolgt dadurch, daß in dem zellfreien Überstand der angelegten Zellkulturen durch ein geeignetes Verfahren (z. B. einem spezifischen Enzymimmunoassay [EIA]) sezernierte Antikörper gegen HBsAg nachgewiesen werden. Die Primärzellkulturen mit spezifischer Antikörperproduktion werden kloniert und sofort rekloniert, bis monoklonale Subklone erhalten werden, die stabil und in hohen Quantitäten Antikörper gegen HBsAg sezernieren.

Die Hybridome werden als H-CB-HBs bezeichnet. Besonders geeignet sind die Zellkulturen H-CB-HBsA, -93, -E, -F und -B. Diese fünf Hybridome sind in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstituts für Molekularbiologie der AdW der DDR, Berlin-Buch, unter folgenden Nummern registriert:

H-CB-HBsA als ZIM 0276

H-CB-HBsB als ZIM 0277

H-CB-HBsE als ZIM 0278

H-CB-HBsF als ZIM 0279 und

H-CB-HBs93 als ZIM 0280.

Die Hybridomzellkulturen eignen sich für eine Massenproduktion von monoklonalen Antikörpern in vitro und in vivo.

Im ersten Fall werden die Zellen kontinuierlich durch Erweiterung des Zellkulturvolumens bis zu einer Menge erweitert, die als Inokulum für einen geeigneten Bioreaktor ausreichend ist. In unserem Fall hat sich eine Erweiterung über Rollerflaschenkulturen und die Verwendung eines Air-lift-Bioreaktors als günstig erwiesen. Hierbei können im Zellkulturüberstand Antikörper in Konzentrationen bis zu 300 µl/ml erreicht werden.

Im zweiten Fall werden die Zellen aus der Zellkultur auf eine Konzentration von $2-10 \times 10^6$ /ml gebracht und in Pristan-vorbehandelte Mäuse intraperitoneal nach bekanntem Verfahren appliziert. Nach etwa 8-24 Tagen lassen sich durch Punktion bis zu 10 ml Aszitesflüssigkeit gewinnen, die bis zu 50 mg/ml spezifischen Antikörper enthalten.

Auf diese Weise werden aus den genannten Hybridomen die monoklonalen Antikörper CB-HBsA, CB-HBsB, CB-HBsE, CB-HBsF und CB-HBs93 gewonnen.

Durch verschiedene biochemische bzw. immunchemische Verfahren lassen sich die Antikörper bis zu einem hohen Reinheitsgrad anreichern. Für die Entwicklung bestimmter Testverfahren können die Antikörper mit Enzymen (z.B. mit Peroxidase) markiert werden. Sie können außerdem biotiniliert oder für Reinigungsverfahren an Trägermaterialien gekoppelt werden.

Anwendungsbeispiele

Beispiel 1

Über einen Zeitraum von 6 Monaten werden 5 Mäuse mit jeweils 50 µg/ml gereinigtem HBsAg in komplettem Freund'schen Adjuvanz immunisiert. Die Boosterungen erfolgen alle 6 Wochen. Nach der letzten Immunisierung mit 150 µg/ml Antigen intravenös werden 2×10^8 Milzzellen isoliert. Diese werden durch Polyethylenglykol 1500 mit 4×10^5 Myelomzellen P3 X63Ag8/653 fusioniert. Nach entsprechenden Waschschritten werden die Zellen in 96-well-Zellkulturplatten mit 10^5 Zellen/well in 100 µl ausplattiert. Das Standardzellkulturmedium besteht aus RPMI 1640 mit 10% FKS. Am nächsten Tag werden 100 µl des doppelt konzentrierten HAT-Mediums zugesetzt. Nach einer Woche werden 50 µl HAT-Medium pro well zugegeben. Nach 14 Tagen werden die Primärkulturen mit einem hochspezifischen EIA hinsichtlich HBs-spezifischer Antikörper geprüft. Nach dem angegebenen Verfahren können bis zu 20% der Primärkulturen spezifische Antikörper gegen HBsAg produzieren. Die positiven Primärkulturen werden auf Peritonealmakrophagen von der Maus (10^4 /well) nach dem Grenzverdünnungsverfahren kloniert und rekloniert. Auf diese Weise werden monoklonale Zelllinien mit spezifischer anti-HBsAg Antikörperproduktion erhalten.

Beispiel 2

Die klonierten Zelllinien mit spezifischer Antikörperproduktion gegen HBsAg werden im Standardkulturmedium gezüchtet in einer feuchten Atmosphäre mit einem Anteil von 5% CO₂. Durch schrittweise Adaption lassen sich diese Zellen auch in Medien mit 2-5% FKS-Anteil züchten. Diese Zellen werden in Zellkulturflaschen vermehrt. Mit Verdünnungsraten von 1:10 kann das Zellkulturvolumen erweitert werden. Die Massenproduktion der Antikörper erfolgt in Rollerflaschen mit einem Volumen von 500 ml oder anschließend in einem Air-lift-Bioreaktor mit Volumina bis zu 50 l.

Beispiel 3

In Zellkulturflaschen (Volumen 250 ml, NUNC) werden die monoklonalen Hybridome auf eine Zellmenge von $10^7-2,5 \times 10^7$ gezüchtet. Die Zellen werden zweimal in isotonischer Phosphatpufferlösung gewaschen und anschließend in 5 ml der gleichen Lösung aufgenommen. Je 1 ml der Zellsuspension wird in 8 Tage vorher mit 1 ml Pristan-behandelte Mäuse (Balb/c) i.p. appliziert. Nach etwa 8-14 Tagen wird die Aszitesproduktion anhand der Bauchschwellung bei den Mäusen sichtbar. 3-20 ml Aszitesflüssigkeit mit einem spezifischen Antikörpergehalt von 2-20 mg/ml können pro Maus gewonnen werden. Die Reinigung der Antikörper erfolgt nach bekannten Verfahren.

Beispiel 4

Nach dem beschriebenen Schema wurden Hybridomzelllinien mit monoklonaler Antikörperproduktion gegen HBsAg gewonnen, die mit H-CB-HBsA, -93, -E, -F und -B bezeichnet wurden. Diese Zelllinien wurden für die Optimierung des Verfahrens zur Herstellung der entsprechenden Antikörper charakterisiert (s. Tab. 1).

Die Antikörperspezifitäten der durch die genannten Zelllinien produzierten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Charakterisierung der Hybridomzelllinien mit monoklonaler Antikörperproduktion gegen HBsAg

Klon	Verdop- plungs- zeit (h)	Ig-Produk- tion (µg/ 24 h/10 ⁶ Zellen)	Aszites- menge/Maus bei 5 x 10 ⁶ appl. Zellen (ml)	Ig-Konzen- tration im Aszites (mg/ml)	IgB-Subtyp
H-CB-HBsA	18	20,5	10	6,0	IgG 2 a
H-CB-HBsE	20	68,9	12	22,2	IgG 1
H-CB-HBsF	36	97,0	25	3,3	IgG 1
H-CB-HBsB	20	45,0	10	8,5	IgG 1
H-CB-HBs93	18	49,5	12	21,5	IgG 2 b

Tabelle 2: Epitopepezifitäten der monoklonalen CB-anti HBsAg Antikörper

Bezeichnung	Epitopspezifität
CB-HBsA und CB-HBs93	Epitop auf dem S-Antigenbereich, Konformationsdeterminante
CB-HBsF	1.) Epitop auf dem S-Antigenbereich, Konformationsdeterminante 2.) Epitop auf dem prä-S-Antigenbereich, Sequenzdeterminante, Aminosäurebereich 120-145
CB-HBsE und CB-HBsB	Epitope auf dem prä-S-Antigenbereich, Sequenzdeterminanten, Aminosäurebereich 120-145