



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 277 086 A1

4(51) C 12 P 21/00
C 12 N 5/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 321 806 7

(22) 15.11.88

(44) 21.03.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Karawajew, Leonid, Dr. rer. nat., SU; Rudchenko, Sergej, Dipl.-Phys., SU; Trakht, Ilja, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., SU; Micheel, Burkhard, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol., DD; Wlasik, Tatjana, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., SU

(54) Verfahren zur Herstellung bispezifischer monoklonaler Antikörper

(55) monoklonale bispezifische Antikörper, Hybrid-Hybridome, Kulturmedium, Antigen, alkalische Phosphatase, Lipoprotein, DNS-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff, Zellsortierer, Biowissenschaften, Medizin

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von bispezifischen monoklonalen Antikörpern, d. h. Antikörpern mit zwei unterschiedlichen Bindungsstellen gegen verschiedene Antigene bzw. Antigen determinanten. Ziel der Erfindung ist die Herstellung von Hybrid-Hybridomen unter Nutzung eines Zellsortierers, wobei die Hybrid-Hybridome zur Gewinnung bispezifischer Antikörper eingesetzt werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man Hybridzellen, die unterschiedliche Antikörper produzieren, in an sich bekannter Weise mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, anschließend fusioniert, die fusionierten, heterofluoreszenten, Zellen mit einem Fluoreszenzaktivierten Zellsortierer selektiert, die selektierten Zellen einige Tage in Kulturmedium kultiviert, danach erfindungsgemäß mit einem DNS-Farbstoff markiert und die Zellen mit einem erhöhten DNS-Gehalt mit dem Zellsortierer selektiert, kloniert und die Tetradome, die bispezifische Antikörper produzieren, auswählt und danach in an sich bekannter Weise in der Zellkultur und auf Mäusen zur Antikörpergewinnung weitervermehrt. Das Verfahren wird am Beispiel von Tetradomklonen, die bispezifische Antikörper gegen alkalische Phosphatase und Lipoprotein LDL (Low Density Lipoprotein) synthetisieren, demonstriert. Anwendungsgebiet der Erfindung sind die verschiedensten Gebiete der Biowissenschaften, einschl. der Medizin.

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung bispezifischer monoklonaler Antikörper durch Markierung von zwei Hybridzelllinien, die unterschiedliche Antikörper produzieren, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, anschließende Fusion und Selektion der fusionierten, heterofluoreszenten, Zellen mit einem Fluoreszenzaktivierten Zellsortierer, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die selektierten Zellen einige Tage in Kulturmedium kultiviert, mit einem DNS-Farbstoff markiert und die Zellen mit einem erhöhten DNS-Gehalt mit dem Zellsortierer selektiert, kloniert und die Tetradome, die bispezifische Antikörper produzieren, auswählt und danach in an sich bekannter Weise in der Zellkultur und auf Mäusen zur Antikörpergewinnung weitervermehrt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von bispezifischen monoklonalen Antikörpern. Anwendungsgebiet der Erfindung sind die verschiedensten Gebiete der Biowissenschaften, einschl. der Medizin.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Antikörper mit Doppelspezifität lassen sich auf chemischem Wege durch reduktive Spaltung der bivalenten Antikörpermoleküle in monovalente Fragmente und anschließende oxidative Vereinigung verschiedener monovalenter Fragmente gewinnen (A. NISONOFF und M. M. RIVERS, Arch. Biochem. Biophys. 93, 460, 1961).

Eine prinzipiell andere Methode basiert auf der Produktion der bispezifischen monoklonalen Antikörper durch hybridisierte Hybridome (Tetradome). Dabei werden zwei Hybridzelllinien, die verschiedene monoklonale Antikörper produzieren, in der Zellkultur fusioniert und die hybridisierten Zellen selektiert. Die auf diesem Wege gewonnenen Tetradome produzieren neben monospezifischen auch bispezifische Antikörper, die sich gegenüber den mit chemischen Methoden erzeugten durch wesentlich höheren Homogenität und Nativität auszeichnen. Die Selektion der fusionierten von den nichtfusionierten Zellen stellt bei dieser Methode das größte technische Problem dar.

Eine der meistangewendeten Selektionsmethoden besteht darin, daß beide für die Fusion vorgesehene Hybridomzelllinien durch zellzüchterische Manipulationen mit einem jeweils anderen Enzymdefekt versehen werden und nach der Fusion die fusionierten Zellen mittels zwei entsprechender Selektionsmedien selektiert werden (C. MILLSTEIN und A. C. CUELLO: Nature 305, 537, 1983; U. D. SPAERZ und M. J. BEVAN: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1453, 1986).

Die andere Methode nutzt die Vorteile des Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers, um die fusionierten Zellen zu identifizieren und diese herauszuselektieren. Dabei werden zwei Hybridzelllinien, die unterschiedliche Antikörper produzieren, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, anschließend fusioniert und die fusionierten, heterofluoreszenten Zellen mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer selektiert (L. KARAWAJEW, B. MICHEEL, O. BEHRSING und M. GAESTEL: J. Immunol. Methods 96, 265, 1987; Patent DD 245902). Diese Methode erfordert verglichen mit dem Einsatz von Selektionsmedien erheblich weniger Arbeitsaufwand, hat jedoch Nachteil, daß damit Heterokarione gewonnen werden von denen sich nur ein Teil zu stabilen Hybrid-Hybridomen entwickelt. Die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Hybridzelle aus einem Heterokarion hängt von mehreren wenig untersuchten Faktoren ab und kann unter Umständen sehr gering sein.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, Hybrid-Hybridome, die zur Gewinnung bispezifischer Antikörper eingesetzt werden können, mit einem effektiven Verfahren unter Nutzung eines Zellsortierers herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von bispezifischen monoklonalen Antikörpern ist dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst in an sich bekannter Weise Hybridzellen, die unterschiedliche Antikörper produzieren, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, anschließend fusioniert und die fusionierten, heterofluoreszenten Zellen mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer selektiert. Danach werden die selektierten Zellen erfindungsgemäß 3-7 Tage in einem Kulturmedium kultiviert und mit einem DNS-Farbstoff markiert. Die Zellen mit einem erhöhten DNS-Gehalt werden dann mit dem Zellsortierer selektiert, kloniert und die Tetradome, die bispezifische Antikörper produzieren, werden ausgewählt und in der Zellkultur bzw. auf Mäusen zur Antikörpergewinnung weitervermehrt. Das erfindungsgemäße Verfahren, dessen Kernstück die DNS-Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff und eine Zellselektion entsprechend dem DNS-Gehalt darstellt, erhöht wesentlich die Effektivität der Gewinnung der Tetradome mit Hilfe des Zellsortierers.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird nachfolgend am Beispiel von Tetradomklonen, die bispezifische Antikörper gegen alkalische Phosphatase und Lipoprotein LDL (Low Density Lipoprotein) synthetisieren, demonstriert. Die erhaltenen Klone

wurden in der Hinterlegungsstelle für Zelllinien im Zentralinstitut für Molekularbiologie unter folgenden Nummer hinterlegt:

Name des Klons	Registriernummer
T11-C9E7	ZIM-0425
T11-C9F2	ZIM-0424
T11-C9H4	ZIM-0423

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

1. Hybridzellen, die monoklonale Antikörper gegen Apoprotein B als Bestandteil des Lipoproteins LDL (Low Density Lipoprotein) produzieren, wurden in der Zellkultur mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein-Isothiozyanat) markiert, der eine grüne Fluoreszenz ergibt. Andere Hybridzellen, die monoklonale Antikörper gegen das für Immuntests verwendete Enzym AP (alkalische Phosphatase) produzieren, wurden in der Zellkultur mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC (Trimethyl-Rhodamin-Isothiozyanat) markiert, der eine rote Fluoreszenz ergibt.
 2. Die gefärbten antikörper-produzierenden Hybridzellen wurden in der Zellkultur mit Hilfe von PEG (Polyäthylenglykol) fusioniert.
 3. Zellen mit der rot-grünen Doppelfluoreszenz wurden mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers (FACS II, Becton Dickinson) herausselektiert, in die Zellkultur aufgenommen und 3-7 Tage kultiviert.
 4. Nach der Kultivierung wurden die Zellen mit dem DNS-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 markiert, und die Zellen mit einem DNS-Gehalt, der größer als der DNS-Gehalt der Elternzellen in der mitotischen Phase des Zellzyklus ist, wurden mit Hilfe eines FACS herausselektiert und in der Zellkultur kloniert.
 5. Alle daraus entstandenden Klone wurden auf ihre Produktion von Antikörpern gegen LDL und AP getestet. Diejenigen Klone, die Antikörper gegen beide Antigene produzieren, wurden anschließend auf die Produktion von bispezifischen Antikörpern geprüft. Dazu wurde an einem festen Träger (Mikrotestplatte) gereinigtes LDL adsorbiert und danach mit den zu testenden Kulturüberständen und AP inkubiert. Anschließend wurde die AP-Nachweisreaktion mit dem entsprechenden Substrat durchgeführt, das durch die Enzymreaktion in ein farbiges Produkt umgewandelt wird.
 6. Die Tetrade, die in dem Doppelspezifitätstest positiv reagierten, wurden in bekannter Weise in flüssigem Stickstoff eingefroren bzw. in der Zellkultur und in Inzuchtmäusen zur Antikörpergewinnung weitervermehrt.
- Die spezifischen Tetradeklone wurden in der Hinterlegungsstelle für Zelllinien im Zentralinstitut für Molekularbiologie unter folgenden Nummern hinterlegt:

Name des Klons	Registriernummer
T11-C9E7	ZIM-0425
T11-C9F2	ZIM-0424
T11-C9H4	ZIM-0423