



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 282 921 A5

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

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N / 328 359 8

(22) 08.05.89

(44) 26.09.90

(71) siehe (73)

(72) Sober, Jüri, Dipl.-Biol., SU; Platzner, Cornelia, Dipl.-Med., DD

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

(54) Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das Hüllprotein gp51 des Rinderleukämievirus

(55) Antikörper, monoklonale; Hüllprotein gp51; Rinderleukämievirus; Hybridomklone, stabile; Epitop A; Affinität, hohe; Epitope, neue; Charakterisierung, immunologische; anti-gp51-Antikörper; Hinterlegung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) gegen das Hüllprotein gp51 des Rinderleukämievirus (BLV). Die Erfindung kann in der Landwirtschaft, Veterinärmedizin und Biotechnologie angewendet werden. Mit der Erfindung werden 7 stabile Hybridomklone, die mAk hoher Affinität gegen das Epitop A und gegen zwei neue, durch mAk noch nicht charakterisierte Epitope des Hüllproteins gp51 produzieren, bereitgestellt. Die mAk sind zur immunologischen Charakterisierung des gp51 und zur effektiven Bestimmung von anti-gp51-Antikörpern in Rinderseren (RS) oder von gp51-Antigen (Ag) geeignet. Die Hybridomklone wurden in der ZIM-Hinterlegungsstelle für Zelllinien hinterlegt.

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das Hüllprotein gp51 des Rinderleukämievirus (BLV), durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit gereinigtem BLV, gereinigtem gp51 oder mit durch gentechnische Methoden hergestellten gp51-Derivaten, Fusion ihrer Milzzellen mit Maus-Myelomzellen, Selektion der anti-gp51-Antikörper produzierenden Hybridome und ihre Kultivierung bzw. Transplantation in Mäuse, dadurch gekennzeichnet, daß zur Kultivierung bzw. Transplantation die Klone ZIM-0471 bis 0477 eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper (mAK) gegen das Hüllprotein gp51 des Rinderleukämievirus (BLV). Anwendungsgebiete der Erfindung sind Veterinärmedizin, Landwirtschaft und Biotechnologie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Monoklonale Antikörper gegen virale Proteine werden zur Diagnostik von Viruserkrankungen, sowie zur Aufklärung von Problemen viraler Wirkungsmechanismen eingesetzt. Mit ihrer Hilfe können antigene Struktur und biologische Funktionen der Virusproteine charakterisiert werden. Das ist wiederum eine Voraussetzung für die Entwicklung neuartiger Vakzine und Diagnostika.

Für die Immunabwehr des Rindes gegen eine Infektion mit BLV spielen AK vor allem gegen das virale Protein gp51 eine wesentliche Rolle.

1982 wurden von C. Bruck et al. (Virology 122, 342-362 [1982]) die ersten 15 mAK gegen das Hüllprotein gp51 aus BLV hergestellt, die gegen 3 verschiedene antigene Determinanten (bezeichnet mit A-H) auf dem gp51-Molekül gerichtet sind. Drei der acht Epitope (F, G und H) sind an biologischen Funktionen des Hüllproteins beteiligt. Die AK in Seren BLV-infizierter Rinder sind vorwiegend gegen diese drei Epitope gerichtet. (Bruck et al. [1984]: Leukemia Res. 8, 315-321.)

Da unsere Untersuchungen mit den mAK von Bruck zeigten, daß sie für die Anwendung in verschiedenen Testsystemen z. T. eine ungenügende Affinität besitzen, wurden 1987 von Platzer und Mitarb. (WP 265910) neue mAK gegen gp51 mit höherer Affinität hergestellt und in einem indirekten ELISA zur Bestimmung der anti-BLV-AK in Rinderseren (RS) bzw. zur Bestimmung von gp51-Antigen (Ag) eingesetzt. Zwei dieser mAK (Hybridomklone DDR-0218 und DDR-0223) definieren im Vergleich zu den 8 von C. Bruck bestimmten Epitopen neue antigene Determinanten, die mit I und K bezeichnet wurden. Die anderen dort beschriebenen mAK sind gegen die Epitope B/B' und D/D' gerichtet. Die Lage der Epitope A, B/B', D/D', E, I und K auf dem gp51-Molekül konnte mit Hilfe von durch gentechnische Methoden hergestellten gp51-Fragmenten und synthetischen Peptiden durch Platzer und Mitarb. bestimmt werden (siehe WP 265910).

Bisher gibt es jedoch keine mAK mit hoher Affinität gegen das Epitop A. Bruck berichtet zwar über eine „hohe Affinität“ der AK gegen das Epitop A, jedoch erfolgte keine Bestimmung der Affinitätskonstante für die mAK mit in flüssiger Phase vorliegendem Antigen. Die Aussage über eine „hohe Affinität“ der AK wurde nur aufgrund ihrer Bindungseigenschaften zum an eine feste Phase adsorbierten Antigen getroffen. Die Affinität der AK wurde im Vergleich zu den anderen in diesem Labor hergestellten gp51-spezifischen mAK relativ bewertet und gibt kein objektives Bild über ihre Leistungsfähigkeit (z. B. in anderen Testsystemen).

Monoklonale AK gegen das Epitop A mit hoher Affinität gegenüber dem löslichen Antigen werden aber für einen diagnostischen Test benötigt, da der zu verwendende mAK das angebotene Antigen aus einer ungereinigten Proteinlösung mit hoher Effektivität und Spezifität fixieren muß.

Bei der Verwendung von viralem gp51 als Antigen wird durch die Bindung des mAK an das Epitop A die Reaktionsfähigkeit der AK des zu testenden Rinderserums mit den Epitopen F, G und H nicht beeinträchtigt.

Das Epitop A, lokalisiert im C-terminalen Abschnitt des gp51 und damit in der Übergangsregion zum gp30, besitzt eine Bedeutung, wenn man gentechnisch hergestellte Fragmente, die diesen Abschnitt enthalten, als Antigen einsetzt.

Außerdem ist anzunehmen, daß auf dem Hüllprotein gp51 weitere, durch mAK noch nicht charakterisierte, Epitope vorhanden sind, deren Aufklärung große Bedeutung für die Vervollkommenheit effektiver diagnostischer Testsysteme und die Entwicklung von Vakzinen hat.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, stabile Hybridomklone, die mAK hoher Affinität gegen das Epitop A und gegen neue, durch mAK noch nicht charakterisierte Epitope des Hüllproteins gp51 des BLV produzieren, herzustellen. Die mAK sollen zur weiteren immunologischen Charakterisierung des gp51 (Aufklärung der Antigenstruktur, Epitopmapping, biologische Funktion), und zur effektiven Bestimmung von anti-gp51-Antikörpern in Rinderseren oder von gp51 geeignet sein.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von mAK gegen das Hüllprotein gp51 des BLV ist dadurch gekennzeichnet, daß man Balb/c Mäuse mit gereinigtem BLV, gereinigtem gp51 oder mit durch gentechnische Methoden hergestellten gp51-Derivaten immunisiert, die Milzzellen entnimmt und mit Hilfe von Polyäthylenglykol (PEG) oder einem elektrischen Puls mit Maus-Myelomzellen (X63-Ag8.653) in an sich bekannter Weise fusioniert.

Die fusionierten Zellen werden in Mikrotiterplatten ausgesät und die gp51-spezifischen antikörperproduzierenden Hybridzellen mit Hilfe geeigneter immunchemischer Screeningverfahren selektiert. Anschließend werden die Hybridomklone, die mAK gegen das Epitop A und gegen bisher nicht definierte Epitope des gp51 sekretieren, ausgewählt, kloniert, weiter vermehrt, ggf. in flüssigem Stickstoff gelagert und zur Produktion der mAK in bekannter Weise in vitro oder in vivo kultiviert. Aus den gewonnenen Kulturüberständen bzw. Ascitesflüssigkeiten werden die mAK über Hydroxylapatit gereinigt und anschließend charakterisiert. Die für die erfindungsgemäße Antikörperproduktion eingesetzten Hybridome wurden in der ZIM-Hinterlegungsstelle für Zelllinien am 10.4.1989 unter folgenden Nummern hinterlegt: ZIM-0471 bis 0477

Die auf diese Weise gewonnenen 7 Hybridomklone sind stabil und produzieren mAK gegen das Hüllprotein gp51 des BLV in guten Ausbeuten. Die mAK sind durch eine hohe Affinität gegenüber dem in Lösung befindlichen Antigen gekennzeichnet und binden ebenso an denaturiertes gp51 (Western Blot nach SDS-PAAG-Elektrophorese) sowie an gp51, das an PVC oder Polystyrol adsorbiert ist.

Eine zusammenfassende Charakterisierung der erfindungsgemäß hergestellten mAK gegen gp51 gibt Tab. 1.

Die Charakterisierung der erhaltenen mAK gegen das Epitop A (mAK gp51/1 und 2) zeigt, daß sie mit hoher Affinität ($1,4 \times 10^8$) das in Lösung befindliche gp51 binden und den IgG-Subklassen 2a und 2b angehören. Erfindungswesentlich ist, daß durch den Vergleich aller gp51-spezifischen mAK untereinander und die Reaktion mit den durch gentechnische Methoden hergestellten gp51-Fragmenten zwei neue antigene Determinanten auf dem gp51-Molekül ermittelt werden konnten, die mit L (mAK gp51/3, 6, 7 und 8) und M (mAK gp51/5) bezeichnet wurden.

Das Epitop L ist eine antigene Struktur, die nicht durch die in *E.coli* oder *S.cerevisiae* hergestellten gp51-Derivate gebildet wird. Ihre Integrität ist somit abhängig von der authentischen Glykosylierung des gp51. Außerdem konkurrieren die mAK gp51/3, 6, 7 und 8 mit den AK aus dem Serum eines BLV-infizierten Rindes. Das Epitop L ist also ein weiteres Epitop (neben den von Bruck beschriebenen Epitopen F, G und H, *Virology* 136, 20–31.), gegen welches das Rind nach BLV-Infektion AK bildet.

Das Epitop M ist eine Sequenz-Determinante auf dem C-terminalen Abschnitt (zwischen der 217. und der 268. Aminosäure) des gp51. Wie Konkurrenzbindungstests mit den mAK gp51/5 und 11 zeigten, ist das Epitop M räumlich dem Epitop D/D' benachbart, das sich zwischen der 170. und der 217. Aminosäure befindet. Der mAK gp51/11 wird vom Hybridom unter der Hinterlegungsnummer ZIM-0215 produziert. Er ist in WP 265910 beschrieben.

Die erfindungsgemäß hergestellten mAK, sind für die Entwicklung eines effektiven ELISA zur Bestimmung von anti-gp51-AK in Rinderseren geeignet. Die mAK gp51/1, 2 und 5 haben eine hohe Affinität zum gelösten Ag und zeigen im diagnostischen ELISA einen sehr niedrigen Untergrundwert, d. h. keine Kreuzreaktivität mit verschiedenen Komponenten aus dem Ag-Präparat, dem RS und dem anti-Rind-Konjugat. Der Test erreicht somit hohe P/N-Werte und eine sehr hohe Empfindlichkeit. Außerdem hemmen die mAK gp51/1, 2 und 5 nicht (oder kaum) die Bindung der AK aus dem Serum des infizierten Rindes und sind einsetzbar, wenn ein gp51-Derivat, das den Abschnitt von der 217.–268. Aminosäure des gp51 enthält, als Ag eingesetzt wird. Verschiedene Kombinationen der mAK gegen die Epitope A, L und M können außerdem bei der Quantifizierung von gp51 in immunometrischen Tests eingesetzt werden.

Die mAK gegen das Epitop L (gp51/3, 6, 7 und 8) sind aufgrund ihrer hohen Affinität gut zur weiteren Aufklärung (Lokalisierung, Rolle der Glykosylierung) von biologisch wichtigen und funktionellen antigenen Determinanten des BLV geeignet.

Ausführungsbeispiel

1. Weibliche Balb/c-Mäuse wurden mit gereinigtem viralem gp51 immunisiert.
2. Die Milzzellen wurden mit X63-Ag8.653 Myelomzellen mit Hilfe von PEG 4000 fusioniert. Die Selektion, Kultivierung und Klonierung der Hybridome erfolgte entsprechend den üblichen in der Literatur beschriebenen Methoden.
3. Hybridomklone, die Antikörper gegen gp51 produzieren, wurden mit Hilfe eines ELISA auf der Basis von gereinigtem gp51 selektiert. Anschließend wurden durch kompetitive Bindungsversuche mit den bisher zur Verfügung stehenden gp51-spezifischen mAK (gegen die Epitope A–K) diejenigen ausgewählt, die mAK gegen das Epitop A bzw. gegen bisher nicht definierte Epitope auf dem gp51-Molekül produzieren.
4. Die geeigneten Hybridome wurden rekloniert, vermehrt und zur Produktion von mAK in vivo verwendet. Dazu wurden 1–2 Mio Hybridomzellen in mit Pristane vorbehandelte weibliche Balb/c-Mäuse transplantiert. Nach etwa 8–10 Tagen konnte mittels Punktierung mit der Ernte der Ascitesflüssigkeit begonnen werden. Im Durchschnitt wurden pro Maus 10 ml Ascites mit einem Gehalt von 5–10 mg IgG/ml erhalten. Der Titer betrug im ELISA 10^6 bis 10^8 .
5. Der spezifische gp51-Titer und der IgG-Gehalt des Kulturüberstandes bzw. der Ascites blieb auch nach 3monatiger Kultivierung der Hybridome bzw. nach 3maliger Transplantation (von Maus zu Maus) konstant und nach Reklonierung zeigte sich keine Aufspaltung der Hybridome in produzierende und nichtproduzierende Klone.
6. Die Anreicherung bzw. Reinigung der mAK erfolgte mit Hilfe von Fällung (Ammoniumsulfat oder PEG) oder Chromatografie (Hydroxylapatit).