

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Patent
aufrechterhalten nach
§ 12 Abs. 3 ErstrG

(12) **PATENTSCHRIFT**

(11) **DD 292 021 B5**

(51) Int. Cl.⁵: C 12 N 5/28
C 12 P 21/08

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 N / 337 935 5	16.02.90	18.07.91	05.05.94

(30) Unionspriorität:

(72) Erfinder:	Glaser, Ralf, Dipl.-Biol. Dr. rer. nat., 10178 Berlin, DE; von Baehr, Rüdiger, Prof. Dr. sc. med., 10179 Berlin, DE; Marx, Uwe, Dipl.-Med., 12629 Berlin, DE; Hausdorf, Gert, Dipl.-Chem. Dr. rer. nat., 10369 Berlin, DE; Grunow, Roland, Dr. sc. med., 10318 Berlin, DE; Jahn, Sigbert, Dr. sc. med., 15566 Schöneiche, DE
(73) Patentinhaber:	Medizinische Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin, Schumannstr. 20/21, 10115 Berlin, DE
(74) Vertreter:	Gulde & Wehlan, Pat.-Anw., Oderstr. 21, 10247 Berlin

(54) **Verfahren zur Herstellung numaner monoklonaler Antikörper gegen Alpha-Haemolysin von Staphylococcus aureus**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
James, K., Bell, G. T., J. of Immunol. Meth. 100 (1987), 5-40 DD 274 446 A 1

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper (hmAk) gegen das Alpha-Haemolysin von *Staphylococcus aureus*, **dadurch gekennzeichnet**, daß humane Lymphozyten mit der Heteromyelomlinie CB-Fu 2 (ZIM-0314) fusioniert, die Hybride abgetrennt und Klone selektiert werden, die Antikörper gegen Alpha-Haemolysin produzieren, eine derartige Primärzellkultur kloniert und so oft rekloniert wird, bis monoklonale Subklone (Hybridome) erhalten werden, das Hybridom H-CB-STL-1 (ZIM-0502) selektiert, zur Kultivierung eingesetzt und aus dem Überstand der hmAk CB-STL-1 isoliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Lymphozyten Verwendung finden, die von Spendern solcher Seren stammen, die eine hohe neutralisierende Aktivität gegen Alpha-Haemolysin aufweisen und deren Spender mit Staphylokokken-Toxoid-Impfstoff immunisiert werden und denen am 7. Tag nach der Immunisierung Blut entnommen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Klone in den zellfreien Überständen der Zellkulturen humane Antikörper vom Typ IgG gegen Alpha-Haemolysin produzieren und die Überstände eine neutralisierende Aktivität gegenüber Alpha-Haemolysin aufweisen.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper (hmAk) gegen das Alpha-Haemolysin von *Staphylococcus aureus*. Die Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die Biotechnologie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Produktion hmAk stellt eine Quelle von Antikörpern für die Diagnostik, Prophylaxe und Therapie verschiedener Erkrankungen des Menschen dar. Es werden international Anstrengungen zur Erzeugung von hmAk gegen bakterielle und virale Antigene, Tumor- und Zell- bzw. Gewebean Antigene unternommen (James, K., u. Bell, G. T.: Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects. J. of Immunol. Meth. 100 [1987], 5-40). Dabei werden hauptsächlich zwei Herstellungsmethoden angewandt:

1. die somatische Fusion von humanen B-Lymphozyten mit murinen, heterologen (Mensch x Maus) oder humanen Myelomlinien
 2. die Immortalisierung humaner B-Lymphozyten durch Transformation mit dem Epstein-Barr-Virus.
- Zusätzlich findet auch die Kombination von Transformation und anschließender somatischer Fusion Anwendung, so z. B. bei der Herstellung hmAk gegen das Blutgruppenmerkmal Rho(D) (Bron, D.; Feinberg, M. B.; Teng, N. N. H. u. Kaplan, H. S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 81 [1984] 3214-3217).

Es ist ebenfalls bekannt, daß die Methode der Elektrofusion die Ausbeute an Hybridomen gegenüber der PEG-Fusion erhöht (Karsten, U., Stolley, P., Walter, I., Papsdorf, G., Weber, S., Conrad, K., Pasternack, L., Kopp, J., Hybridoma 7 [1988] 627-633) und daß diese Technik auch auf die Fusion humaner Lymphozyten mit Heteromyelomzellen angewandt werden kann. Gegen Alpha-Haemolysin von *Staphylococcus aureus* sind humane Myelomseren bekannt (Mansa, B., Kjems, E., Lind, I., Prog. Immunobiol. Scand. 4 [1970] 60). Es sind jedoch keine Hybridome bekannt, die die Produktion großer Mengen humaner Antikörper gegen das Alpha-Haemolysin erlauben.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, der Medizin humane Antikörper zur Verfügung zu stellen, die bei der Therapie von Erkrankungen und Symptomen angewandt werden können, die durch Alpha-Haemolysin von *Staphylococcus* hervorgerufen werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem zunächst effektiv eine Hybridomzelllinie erzeugt werden kann, von der in anschließenden Verfahrensschritten humane monoklonale Antikörper gewonnen werden können, die eine neutralisierende Wirkung auf Alpha-Haemolysin von *Staphylococcus aureus* besitzen. Die Hybridomzelllinie soll mit ökonomisch günstigem Aufwand in vitro kultivierbar sein und für eine Reinigung ausreichend hohe Mengen an monoklonalen Antikörpern sezernieren.

Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe dadurch gelöst, daß zunächst untersucht wurde, wie hoch die neutralisierende Aktivität verschiedener Seren gegenüber Alpha-Haemolysin ist. Die höchste Aktivität wurde mit 1,2 U/ml gefunden. Der Proband dieses Serums wurde mit 0,5 ml Staphylokokken-Toxoid-Impfstoff (Behringwerke AG, Marburg) immunisiert. Am 7. Tag nach der Immunisierung wurden Blut entnommen und in bekannter Weise mononukleäre Zellen gewonnen.

Als Fusionspartner für diese Zellen wurden CB-Fu 2-Zellen (ZIM-0314) verwendet, die in einem Zellzuchtmedium RPMI 1640 mit 10% FKS kultiviert wurden (DD-WP 274446). Diese Heteromyelomzelllinie ist im Zentralinstitut für Molekularbiologie (ZIM) der AdW der DDR unter der Nummer 0314 hinterlegt worden.

Die beiden Zellsuspensionen wurden vermischt und einer Elektrofusion ausgesetzt (Glaser, R. W., Jahn, S., Grunow, R., Allerg. Immunol. 35 [1989] 123-132). Erfindungsgemäß wurden zwei Pulse von 3,3kV/cm mit einer Länge von 2-15µs verwendet. Die Zellen wurden in verschiedener Konzentration auf 96-Well-Zellkulturplatten verteilt. In einem Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) enthält (Littlefield, Science 145 [1964] 709), wurden die gebildeten Hybride von den nicht fusionierten Myelomzellen abgetrennt und erfindungsgemäß Klone selektiert, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren. Die Detektion dieser Klone erfolgte dadurch, daß in dem zellfreien Überstand der angelegten Zellkulturen durch einen spezifischen ELISA humane Antikörper vom Typ IgG gegen Alpha-Haemolysin nachgewiesen werden. Diese Überstände wurden des weiteren daraufhin geprüft, ob sie eine neutralisierende Aktivität gegenüber Alpha-Haemolysin besitzen. Eine Primärzellkultur, die spezifische, neutralisierende Antikörper produzierte, wurde kloniert und so oft rekloniert, bis monoklonale Subklone erhalten wurden, die stabil und in hohen Quantitäten Antikörper produzieren. Dieses Hybridom wurde mit H-CB-STL-1 bezeichnet. Es ist in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstitutes für Molekularbiologie der AdW der DDR, Berlin-Buch unter der Nummer 0502 hinterlegt worden.

Die Hybridomzelllinie eignet sich für die Massenproduktion von monoklonalen Antikörpern in vitro. Dazu werden die Zellen kontinuierlich durch Erweiterung des Zellkulturvolumens bis zu einer Menge erweitert, die als Inokulum für einen geeigneten Bioreaktor ausreichend ist. Optimale Wachstumseigenschaften zeigen die Zellen bei einer Konzentration von 50 000 bis 120 000 Zellen/ml. Eine maximale Antikörperproduktion wird erreicht, wenn die Zellen auf eine Zelldichte von ca. 250 000 Zellen/ml heranwachsen und bei dieser Konzentration etwa 3 Tage gehalten werden.

Ausführungsbeispiele

1. Boosterung und Zellpräparation

Humane Seren werden auf die neutralisierende Aktivität gegenüber Alpha-Haemolysin von Staphylococcus aureus untersucht. Es wird das Serum mit der höchsten Aktivität ausgewählt. Der entsprechende Spender wird durch Injektion von 0,5 ml Staphylokokken-Toxoid-Impfstoff fluid, Charge A312013 in den Oberarm geboostert. Am 7. Tag nach Boosterung wird dem Spender peripheres Blut entnommen. Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden die mononukleären Zellen gewonnen.

2. Fusion und Selektion

10^7 dieser mononukleären Zellen werden mit $3 \cdot 10^6$ Zellen der Linie CB-Fu 2 vermischt und in serumfreien RPMI gewaschen. Die Zellen werden anschließend 30 Minuten bei 37°C in 1 mg/ml Pronase E inkubiert und zweimal in 280 mM Mannitollösung (0,1 mM Ca^{++} , 0,5 mM Mg^{++} , 1 mM Phosphatpuffer pH 7,2) gewaschen. Die Zellen werden in 500 µl der gleichen Lösung resuspendiert und in Portionen von 20 µl in schneller Folge fusioniert und unter Zusatz von RPMI (10% FKS) in die oberste Reihe von je zwei 96-Well-Platten eingetropft. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank werden die Zellen mit HT-Medium (RPMI 1640 + 10% FKS + Hypoxanthin + Thymidin) jeweils über die gesamte 96-Well-Platte verteilt, so daß sich in jedem Well 100 µl Zellsuspension befindet. Am nächsten Tag werden pro Well 100 µl HAT-Medium (HT + Aminopterin) zugegeben. Am 5. und 7. Tag wird je 50 µl HAT-Medium zugegeben. Am 10. Tag wird 200 µl des zellfreien Überstandes abgenommen. Am 10., 12., 14. und 17. Tag werden je 50 µl HAT-Medium zugegeben und am 19. Tag 150 µl des zellfreien Überstandes abgenommen und auf die Anwesenheit der gesuchten Antikörper getestet.

3. Produktion von Antikörpermengen im Milligrammbereich

10^6 Zellen eines stabilen Subklones der gewonnenen Zelllinie werden aus dem Flüssigstickstoff aufgetaut und in ein Well einer 6-Well-Platte überführt. Die Zellen werden täglich mit frischem Medium versorgt. Nach 3 Tagen sind die Zellen gut angewachsen. Sie werden innerhalb von weiteren 3 Tagen auf alle 6 Wells der Platte verteilt. Wenn in allen Wells eine Zelldichte von etwa 200 000 Zellen pro ml erreicht ist, wird die Zellsuspension aus der Platte geerntet und in eine Rollerflasche überführt. Diese wird mit Zellkulturmedium auf 150 ml aufgefüllt. Die Zelldichte in der Rollerflasche wird alle ein bis zwei Tage kontrolliert, und es wird jeweils soviel Medium zugegeben, daß die Zelldichte im Bereich zwischen 50 000 und 180 000 Zellen pro ml gehalten werden kann. Gegebenenfalls wird der Inhalt einer Rollerflasche auf zwei Flaschen verteilt. Wenn das beabsichtigte Suspensionsvolumen erreicht ist, läßt man die Zellen ungestört im Roller wachsen. Wenn eine Zelldichte von 300 000 Zellen pro ml erreicht ist, läßt man die Zellen noch für zwei Tage Antikörper produzieren und gewinnt dann den zellfreien Überstand durch Zentrifugieren der Suspension.

4. Antikörperaufreinigung

2 Liter zellfreien Kulturüberstandes einer spezifische Antikörper produzierenden Zelllinie werden über eine Tangentialflußdruckfilteranlage mit einer Filterfläche von 260 cm² und einer Ausschlußgrenze von 30 kD auf 50 ml konzentriert. Mit einer 1 M Tris-Lösung wird der pH-Wert des Konzentrates auf 8,6 eingestellt. Das Konzentrat wird auf eine Protein-A-Sephrose-Säule mit einem Gelvolumen von 5 ml aufgetragen, und der Antikörper in einem pH-Gradienten bei einem pH-Wert von 4,0 eluiert. Das Antikörperpräparat wird mit Tris-Puffer auf einen neutralen pH-Wert eingestellt und elektrophoretisch auf Reinheit analysiert.