



(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 254 593 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) C 12 N 5/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 297 612 5	(22)	15. 12. 86	(44)	02. 03. 88
------	-----------------------	------	------------	------	------------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Patentabteilung, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Wollweber, Leo, Dr. rer. nat.; Wisniewski, Hans-Georg, Dr. rer. nat.; Fritzke, Helga; Münster, Hiltrud; Tonew, Marion, Dr. sc. nat.; Tonew, Emil, Dr. med. habil.; Wondraczek, Reinhard, Dr. sc. nat., DD

(54) **Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes Interferon-alpha**

(55) Gewinnung von monoklonalen Antikörpern, Reaktion mit Interferon-alpha, immunchemische Bestimmung, immunaffinitätschromatographische Anreicherung, intralienale Immunisierung mit HuIFN-alpha, Fusion mit Myelomzellen der Linie P3-X63-Ag8.653, Selektion, Einzelzellklonierung, Hybridzellklone H/B61D3 und H/C61D2, monoklonale Antikörper ZIMET B61D3 und ZIMET C61D2

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper, die zur Reaktion mit humanem Interferon-alpha (HuIFN-alpha) befähigt sind. Das Ziel der Erfindung besteht darin, monoklonale Antikörper herzustellen, die für die immunchemische Bestimmung und für eine immunaffinitätschromatographische Anreicherung von HuIFN-alpha geeignet sind. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man Milzzellen von Mäusen, die intraliental mit HuIFN-alpha immunisiert worden sind, mit Myelomzellen der Linie P3-X63-Ag8.653 in vitro fusioniert, die erhaltenen Hybridome mit spezifischer Antikörperproduktion selektioniert, anschließend eine Einzelzellklonierung mittels eines speziellen Mikromanipulators durchführt und die erhaltenen Klone in üblicher Weise weiter vermehrt. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden durch Kultivierung der Hybridzellklone H/B61D3 und H/C61D2 die monoklonalen Antikörper ZIMET B61D3 und ZIMET C61D2 gewonnen. Anwendungsgebiet der Erfindung sind die Humanmedizin, die Veterinärmedizin und die Biotechnologie.

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes Interferon-alpha (HuIFN-alpha) durch Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit HuIFN-alpha, Fusion ihrer Milzzellen mit Myelomzellen, Selektion der erhaltenen Hybridome, Bestimmung ihrer Antigendeterminantenspezifität, Auswahl der spezifischen Hybridome und ihre Kultivierung bzw. Transplantation auf Mäuse in der Aszitesform, **gekennzeichnet dadurch**, daß

- die Antigendeterminantenspezifität durch einen Feststoffphasen-Bioassay bestimmt wird,
- zur Kultivierung bzw. Transplantation die Klone H/B61D3 und H/C61D2 eingesetzt und
- die monoklonalen Antikörper ZIMET B61D3 sowie ZIMET C61D2 aus den Kulturüberständen der Hybridzelllinien bzw. aus der Aszitesflüssigkeit von Hybridom-tragenden Mäusen, vorzugsweise von BALB/cxNMRI- oder NMRIxBALB/c-Hybridmäusen, isoliert werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes Interferon-alpha (HuIFN-alpha). Diese Antikörper können in der biotechnologischen Analytik und in der medizinischen Diagnostik angewendet sowie überdies zur immunaffinitätschromatographischen Anreicherung von biotechnologisch produziertem HuIFN-alpha eingesetzt werden. Das Anwendungsgebiet liegt somit in der biotechnologischen Forschung und Industrie sowie für die verfahrensgemäß hergestellten Produkte weiterhin in der medizinischen Diagnostik.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Interferone sind Proteine, die von tierischen Zellen nach Virusinfektion oder nach Kontakt mit Mitogenen freigeschützt werden und normale Zellen vor einer Virusinfektion schützen. Sie sind in bezug auf chemische Zusammensetzung und biologische Aktivität heterogen (Pestka, Arch. Biochem. Biophys. **221**, 1983, 1–37).

Monoklonale Antikörper gegen humanes Interferon-alpha sind seit 1980 bekannt (Secher and Burke, Nature **285**, 1980, 446–450; Staehelin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 1981, 1848–1852). Diese Antikörper wurden jeweils nach der bekannten Hybridomtechnik von Köhler und Milstein (Nature **256**, 1975, 495–497) hergestellt, und sie werden hauptsächlich für die Interferon-Analytik bei der gentechnologischen Bearbeitung von Interferon sowie zur Anreicherung biotechnologisch hergestellter Interferone verwendet.

Im Inland ist das Schutzrecht WP 231 007 bekannt, welches ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interferon-alpha zum Gegenstand hat.

Die im Ergebnis dieses Verfahrens gewonnenen zwei monoklonalen Antikörper haben den Nachteil, daß jeder von ihnen nur einen bestimmten HuIFN-alpha-Subtyp binden kann und somit für die immunaffinitätschromatographische Anreicherung von biotechnologisch produzierten HuIFN-alpha-Subtypen als auch für deren immunochemische Bestimmung beide Antikörper benötigt werden.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, neue monoklonale Antikörper gegen humanes Interferon-alpha herzustellen, die zur immunochemischen Bestimmung von Interferon in Medizin und Biotechnologie sowie zur immunaffinitätschromatographischen Anreicherung gentechnisch produzierter HuIFN-alpha-Subtypen eingesetzt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein hinreichend einfaches und zuverlässig handhabbares Verfahren zur Gewinnung von neuen monoklonalen Antikörpern, die zur Reaktion mit HuIFN-alpha befähigt sind, anzugeben.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe wie folgt gelöst:

Mäuse des Stammes BALB/c werden mehrmals intralinal mit gereinigtem HuIFN-alpha immunisiert. Die Milzzellen der so immunisierten Mäuse werden in an sich bekannter Weise mit der Maus-Myelomzelllinie P3-X63-Ag8.653 in vitro fusioniert und in Mikrotiterplatten in einem Selektionsmedium, das nur die Vermehrung der Hybridzellen gestattet (HAT-Medium), ausgesät. Nach Erscheinen der Hybridomzellhaufen werden die Kulturüberstände mit Hilfe eines Cellulosenitrat-Immunospotttests auf Antikörpergehalt getestet und anschließend in an sich bekannter Weise die Spezifität durch einen Festphasen-Bioassay bestimmt.

Von durch diese Tests ausgewählten Hybridomen mit spezifischer Antikörperproduktion gegen HuIFN-alpha werden verfahrensgemäß durch Einzelzellklonierung mittels eines speziellen Mikroaminulators stabile monoklonale Hybridzelllinien selektioniert. Die von ausgewählten Hybridzelllinien produzierten Antikörper werden in an sich bekannter Weise auf ihre Eignung für immunochemische Bestimmungsmethoden und für die Immunoaffinitätschromatographie geprüft.

Die auf diese Weise erhaltenen Hybridzellklone H/B61D3 und H/C61D2 werden anschließend weitervermehrt, in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf für die Produktion monoklonaler Antikörper in vitro oder in Aszitesform verwendet.

Die Gewinnung der neuen monoklonalen Antikörper erfolgt aus Kulturbeständen der stabilen monoklonalen Hybridzelllinien bzw. aus der Aszitesflüssigkeit Hybridom-tragender BALB/c-Mäuse, vorzugsweise von BALB/c x NMRI- oder NMRI x BALB/c-Hybridmäusen, nach gebräuchlichen Isolierungsverfahren.

Die Vorteile der vorliegenden Erfindung liegen

- in der intralialen Immunisierung, welche zu hohen Ausbeuten an gewünschten Hybridomen führt, sowie
- in der Einzelzellklonierung, die eine sichere und schnelle Gewinnung stabiler Hybridzellklone ermöglicht.

Darüber hinaus werden erhebliche Einsparungen an teuren Zellzuchtmedien erzielt.

Die verfahrensgemäß hergestellten neuen monoklonalen Antikörper ZIMET B61D3 und ZIMET C61D2 haben weiterhin den Vorteil, daß zwei HuiFN-alpha-Subtypen (alpha 1, alpha 2) mit jedem dieser Antikörper angereichert werden können und zur immunochemischen Bestimmung der genannten HuiFN-alpha-Subtypen nur ein Antikörper markiert werden muß.

Die Erfindung ermöglicht die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen HuiFN-alpha, die für die Bereitstellung von Immunoassays für Human-Medizin, Veterinärmedizin und Biotechnologie sowie von Immunsorbentien zur immunaffinitätschromatographischen Anreicherung von biotechnologisch produziertem HuiFN-alpha für therapeutische Zwecke von volkswirtschaftlicher Bedeutung sind.

Ausführungsbeispiele

1. Beispiel

- Herstellung der Hybridome

Mäuse des Stammes BALB/c werden in mehrwöchigen Abständen mit jeweils 10^6 bis 10^7 IU HuiFN-alpha intralial immunisiert. Drei Tage nach der letzten Immunisierung erfolgt die Fusion der Milzzellen einer immunisierten Maus mit Myelomzellen der Linie P3-X63-Ag8.653 (hergestellt von Kearny et al., J. Immunology **123**, 1979, 1548–1550) nach bekannten Verfahren (Köhler, G., and C. Milstein, Nature **256**, 1975, 459–497; Campbell, A. M., Monoclonal antibody technology in Laboratory Techn. in Biochem. and Molec. Biol. Vol. 13, Elsevier 1984). Die Hybridome werden in HAT-Medium angezüchtet.

- Die Auswahl der Hybridome mit spezifischer Antikörperproduktion erfolgt mit Hilfe eines Cellulosenitrat-Immunospotttests (Wollweber und Wisniewski, Acta histochem., Suppl.-Band **33** [1986], 305–307) und eines Festphasen-Bioassays (Berthold et al., Arzneim.-Forsch. **35** [I], [1985], 364–369).

Die Klonierung wird in vitro, hier konkret durch Einzelzellklonierung mit Hilfe eines speziellen Mikromanipulators in 96-well-Mikrotiterplatten und Plaste-Petrischalen, durchgeführt.

Die von den gewonnenen Hybridomklonen produzierten neuen monoklonalen Antikörper ZIMET B61D3 und ZIMET C61D2 weisen folgende Eigenschaften auf:

Eigenschaften	Monoklonaler Antikörper	
	ZIMET B61D3	ZIMET C61D2
Ig-Klasse	IgG 1	IgG 1
Interferon-Subtyp-spezifität	HuiFN ₁ , HuiFN ₂	HuiFN ₁ , HuiFN ₂
Eignung zur Immunaffinitätschromatographie	sehr gut	sehr gut

Gewinnung der neuen Antikörper

Die Gewinnung der neuen monoklonalen Antikörper erfolgt aus Kulturbeständen der stabilen monoklonalen Hybridzelllinien bzw. aus der Aszitesflüssigkeit Hybridom-tragender BALB/c-Mäuse nach gebräuchlichen Isolierungsverfahren.

2. Beispiel

- Herstellung der Hybridome

Die Herstellung der Hybridome erfolgt analog Ausführungsbeispiel 1.

- Gewinnung der neuen Antikörper

Eine gegenüber BALB/c-Mäusen deutlich erhöhte Aszitesbildung wird durch die Verwendung von NMRI x BALB/c bzw. BALB/c x NMRI-F₁-Hybridmäusen erreicht, wodurch die Effektivität der Produktion der monoklonalen Antikörper ZIMET B61D3 und ZIMET C61D2 auf etwa 350% gesteigert wird.