



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 293 606 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1

Patentgesetz der DDR

vom 27. 10. 1983

in Übereinstimmung mit den entsprechenden

Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/06

G 01 N 33/533

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 339 723 6	(22)	12.04.90	(44)	05.09.91
(71)	siehe (72)				
(72)	Rabenstein, Frank, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., Staßfurter Höhe 20, O - 4320 Aschersleben; Krämer, Ilona, Dr. rer. nat. Dipl.-Biochem.; Zielke, Rudi, Dr. agr. Dipl.-Landwirt, DE				
(73)	siehe (72)				
(54)	Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen <i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i> (Smith) Davis, Gillaspie, Vidaver & Harris				

(55) monoklonale Antikörper; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; Zellkultur; Hybridzellklone; Spezifität; Enzymimmunoassays; Nachweis des Erregers; biologische Probematerialien; Antikörperproduktion; Hinterlegung; Diagnose; Pflanzenkrankheiten

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen den Erreger der Bakteriellen Tomatenwelke *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Ziel der Erfindung ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern definierter Spezifität und hoher Bindungsfähigkeit gegen Bestandteile bzw. Metaboliten dieses Erregers. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst in an sich bekannter Weise Milzzellen von Inzuchtmäusen, die mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* immunisiert wurden, mit Myelomzellen, z. B. P3 X63-Ag8.653, in der Zellkultur fusioniert, die positiven Antikörper-produzierenden Hybridzellklone mit geeigneten Methoden, wie z. B. Enzymimmunoassays oder Immunfluoreszenz-Technik, selektiert, die Spezifität der Antikörper bestimmt, die spezifischen und zur Entwicklung von Testsystemen zum Nachweis des Erregers bzw. dessen Metaboliten in biologischen Probematerialien geeigneten Hybridzellklone auswählt und erfindungsgemäß zur Produktion der monoklonalen Antikörper durch Kultivierung und nach Transplantation auf histokompatible Mäuse in der Aszitesform einsetzt. Die spezifischen und geeigneten Hybridzellklone IfP-R17-HD11 und IfP-R17-CD6, die monoklonale Antikörper vom Isotyp IgG1 bzw. IgG3 produzieren, wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR unter den Nummern ZIM-0451 und ZIM-0452 am 27. 12. 1988 hinterlegt. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Diagnose von bakteriellen Pflanzenkrankheiten.

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung von spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Bestandteile bzw. Metaboliten des Erregers der Bakteriellen Tomatenwelke, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cm), durch Immunisierung von Inzuchtmäusen mit Cm, Fusion ihrer Milzzellen mit Myelomzellen, Selektion von Cm-reaktiven Hybridzellklonen, Auswahl der spezifischen und zum Aufbau von Testsystemen zum Nachweis des Erregers bzw. dessen Metaboliten in biologischen Probematerialien geeigneten Antikörper-produzierenden Zellklone und ihre Kultivierung bzw. Transplantation auf Mäuse in der Aszitesform, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Kultivierung bzw. Transplantation die Hybridzellklone IfP-R 17-HD 11 (ZIM-Liste 1988 = ZIM-0451) bzw. IfP-R 17-CD 6 (ZIM-Liste 1988 = ZIM-0542) eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen das pflanzenpathogene Bakterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (im folgenden mit Cm abgekürzt). Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Diagnose der Bakteriellen Tomatenwelke im Rahmen von Gewächshaus- und Feldprüfungen (einschließlich Erregernachweis in flüssigen Nährmedien von NFT-Anlagen), die Züchtung und Selektion von resistenten Pflanzensorten sowie der Nachweis im Saatgut.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die bakteriell bedingte Tomatenwelke, die durch Cm verursacht wird, kann bei Tomaten zu schweren Verlusten führen. Diese Gefahr besteht insbesondere dann, wenn Produktionsmethoden wie die Nährfilmtechnik eingesetzt werden. Wünschenswert wäre neben einer sicheren Diagnose in Tomatenpflanzen der Erregernachweis im Nährmedium sowie in kontaminiertem Saatgut. Für den Nachweis von Cm in Tomatensamen wurde der Immunfluoreszenz-Test (IFT) in Kombination mit einem Biotest vorgeschlagen (VAN VAERENBERGH, J. P. C. und CHAUVEAU, J. F., Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 17 [1987], 131-138). Über eine Identifizierung von Cm anhand seiner Stoffwechselmetaboliten, bei der polyklonale Antiseren verwendet wurden, berichteten BRAGARD u. a. (Meded, Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent 52/3 b [1987], 1081-1087). Diese polyklonalen Antiseren zeigten im enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) starke Kreuzreaktionen mit verschiedenen anderen *Clavibacter*-Arten, die auch mit anderen serologischen Techniken gefunden werden können (RILEY, I. T., Intern. J. Syst. Bacteriology 35 [1987], 153-159). Insgesamt wenig aussichtsreich erscheint eine Differenzierung auf dem Subspeziesniveau unter Verwendung von polyklonalen Antiseren zu sein. Eine Lösung des Problems könnte die Herstellung geeigneter monoklonaler Antikörper (im weiteren mit mAk abgekürzt) darstellen. Über die Herstellung von mAk gegen *Clavibacter*-Arten wurde in der Literatur bisher nur im Falle von *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* berichtet (DE BOER, S. H. und WIECZOREK, A., Phytopathology 74 [1984], 1431-1434 sowie MAGEE, W. E., BECK, C. F. und RISTOW, S. S., Hybridoma 5 [1986], 231-235). Über Produktion und Einsatz von mAk gegen Cm zum Erregernachweis wurde bisher nicht berichtet.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, mAk mit hoher Bindungsfähigkeit und verbesserter Spezifität in guten Ausbeuten herzustellen. Diese mAk sollen für den Aufbau eines Testsystems zum Nachweis von Cm bzw. dessen Bestandteile, wie extrazelluläre Proteine, Kohlenhydrate, Toxine u. a., geeignet sein.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man in an sich bekannter Weise zunächst Milzzellen von Mäusen, z. B. der Mausinzuchtlinien BALB/c oder A/J, die zuvor mit Rohsuspensionen der Bakterienart *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Stamm 3.1.4. immunisiert wurden, mit P3 X 63-Ag 8.653 oder anderen Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die fusionierten Zellen in Gewebekulturplatten aussät, mit Hilfe eines Selektionsmediums die Hybridzellen selektiert, mit geeigneten Enzymimmunoassays jene Hybridomzellklone nachweist, die Antikörper gegen Cm bzw. dessen Bestandteile produzieren, die spezifisch reagierenden Hybridzellen auswählt, weitervermehrt, kloniert und ggf. nach Lagerung in flüssigem Stickstoff erfindungsgemäß zur Produktion der mAk durch Kultivierung oder nach Transplantation auf histokompatible Mäuse in der Aszitesform einsetzt.

Die für die erfindungsgemäße Antikörperproduktion eingesetzten Hybridzellklone wurden im Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR unter folgenden Nummern hinterlegt (Datum der Hinterlegung: 27. 12. 1988):

- ZIM-0451: IfP-R 17-HD 11 produziert mAk CM 5 (IgG 1)
- ZIM-0452: IfP-R 17-CD 6 produziert mAk CM 3 (IgG 3)
- ZIM-0453: IfP-R 17-HF 7 produziert mAk CM 6 (IgM)
- ZIM-0454: IfP-R 17-BH 7 produziert mAk CM 2 (IgM)
- ZIM-0455: IfP-R 17-HG 8 produziert mAk CM 7 (IgM)
- ZIM-0456: IfP-R 17-BF 11 produziert mAk CM 1 (IgM)
- ZIM-0457: IfP-R 17-HC 6 produziert mAk CM 4 (IgM)

Die durch die Erfindung hergestellten mAk zeichnen sich durch die spezifische Erkennung von Cm in biologischen Proben aus, ohne mit anderen Bakterien außerhalb der Gattung *Clavibacter* zu reagieren. Der mAk-CM3 ist spezifisch gegen Oberflächenantigene von Cm gerichtet, während alle übrigen mAk auch mit Stoffwechselmetaboliten von Cm reagieren. Die Antikörper CM3 und CM5 zeichnen sich weiterhin durch gute Adsorptionseigenschaften an Plastrmaterial aus, wodurch Voraussetzungen für den Aufbau von spezifischen Enzymimmunoassays geschaffen sind. Diese beiden mAk sind dadurch gekennzeichnet, daß sie sich mit einem Marker (z. B. alkalischer Phosphatase) koppeln lassen und dabei ihre volle immunologische Reaktivität behalten.

Die Erfindung ermöglicht aus diesem Grunde die Entwicklung von effektiven Testbestecks zum Nachweis von Cm bzw. dessen Metaboliten in biologischen Materialien.

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

1. Immunisation von Mäusen der Inzuchtlinie A/J

Zur Immunisierung der Mäuse wurde ein optimales Injektionsschema erarbeitet. Vier bis sechs Wochen alte weibliche Mäuse wurden mit einer Suspension von Cm (10^{10} Keime/ml) ohne Verwendung von Adjuvans im wöchentlichen Abstand i. p. immunisiert. Es erfolgten insgesamt 4 Immunisationen mit je 0,5 ml.

Am vierten, dritten und zweiten Tag vor Fusionsbeginn wurde eine intraperitoneale bzw. zuletzt intravenöse Injektion von jeweils 0,1 ml Bakteriensuspension (Keimzahl 10^{10} /ml) verabreicht.

Die Zellfusion, Kultivierung, Klonierung etc. erfolgte nach Standardmethoden entspr. KÖHLER, G. und MILSTEIN, C., *Nature* **256** (1975), 495-497 und GODING, J. W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practices*, Academic Press, London (1983).

2. Der Nachweis Antikörper-produzierender Hybridzellen erfolgte mit einem indirekten Enzymimmunoassay (i-ELISA). Dabei wurden entweder eine Bakteriensuspension von 10^9 Cm/ml direkt durch Antrocknen bei 80°C oder zuerst polyklonale Immunglobuline aus Ziegen- oder Kaninchenantisera und danach Bakteriensuspension bzw. Cm-haltiger Pflanzensaft aus infizierten Tomatenpflanzen an Mikrottestplatten gebunden, anschließend erfolgte die Inkubation mit Überständen der Hybridzellklone und enzymmarkierten Anti-Maus-IgG.

3. Der Nachweis der Spezifität der mAk erfolgte durch einen indirekten Enzymimmunoassay unter Verwendung von verschiedenen Spezies bzw. Subspezies der Gattung *Clavibacter* sowie von Bakterien aus 10 anderen Arten und Gattungen. Entsprechend dieses Tests reagierten im i-ELISA bis auf mAk CM6 alle anderen Antikörper nicht mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, jedoch spezifisch mit Cm. Keine Reaktion erfolgte mit der Unterart *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* sowie anderen Bakterienarten außerhalb der Gattung *Clavibacter*. Der mAk CM7 zeigte eine Kreuzreaktion mit *C. tritici*. Die Prüfung der genannten mAk im Immunfluoreszenztest erbrachte mit dem i-ELISA übereinstimmende Reaktionsmuster.

4. Herstellung der Antikörper

Die ausgewählten Hybridzellklone wurden zur Herstellung der mAk nach den üblichen Techniken (KENNET, R. H., McKEARN, T. J. und BECHTOL, K. B., *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A new dimension in biological analysis*, New York u. London 1981), eingesetzt.

5. Markierung mit alkalischer Phosphatase

Die gemäß gebräuchlicher Techniken gereinigten mAk CM1 bis CM7 wurden nach der bekannten Methode von CLARK, M. F. und ADAMS, A. N. (*J. gen. Virol.* **34** [1977], 475-483) mit alkalischer Phosphatase konjugiert.

6. Die Eignung der durch die oben genannten Hybridzellklone produzierten mAk zum Aufbau von ELISA-Systemen für den Nachweis von Cm bzw. dessen Metaboliten in Probematerialien wurde überprüft. Danach eignen sich die gereinigten mAk CM3 und CM5 zur Adsorption an Mikrottestplatten aus Polystyrol als feste Phase. Die Antikörper konnten in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt werden. Nach Markierung mit alkalischer Phosphatase zeigten diese beiden mAk eine unveränderte immunologische Aktivität. Die Stammkonjugate konnten im Falle von CM3 in einer Verdünnung von 1:1000 und beim mAk CM5 in einer Verdünnung von 1:500 im Doppelantikörper-Sandwich-ELISA eingesetzt werden. Immunologische Untersuchungen ergaben, daß die mAk CM3 bzw. CM5 gegen unterschiedliche Antigen determinanten gerichtet sind. Danach reagiert der mAk CM3 nicht mit bakterienfreien Filtraten einer Cm-Suspension bzw. nicht mit einem nach KRÄMER, R., *Zentralbl. Mikrobiol.* **141** (1986), 327-335, gereinigten Toxinpräparat aus Cm, das ein wasserlösliches, hochmolekulares Glykopeptid darstellt und bei Tomatenschnittlingen Welkesymptome verursacht. In immunoelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte jedoch nachgewiesen werden, daß CM3 spezifisch an Oberflächenstrukturen der Bakterienzellwand von Cm bindet.

Alle anderen mAk, insbesondere mAk CM5, reagieren mit bakterienfreien Filtraten bzw. mit dem Toxinpräparat aus Cm. Wird das Testsystem zum Nachweis des Erregers in Testproben so gestaltet, daß nur Cm-Oberflächenantigene erfaßt werden, dann kann mit dem mAk CM3 als Feste-Phase-Antikörper beschichtet und mit alkalische Phosphatase markierten CM3-Antikörpern in der löslichen Phase inkubiert werden. Dabei ist es möglich, die Inkubation von Testmaterial und Enzymkonjugat in einem Schritt durchzuführen.

Andererseits kann das Testsystem so aufgebaut werden, daß Metaboliten, wie z. B. das Welketoxin von Cm, in infizierten Tomatenpflanzen erfaßt werden. Hierfür kann beispielsweise die Mikrottestplatte mit dem mAk CM5 beschichtet und im DAS-ELISA mit einem polyklonalen IgG-Enzym-Konjugat aus Ziegenantiserum im zweiten Schritt inkubiert werden.