



Patent  
aufrechterhalten nach  
§ 12 Abs. 3 ErstrG

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: C 12 N 5/20  
A 61 K 39/395

**DEUTSCHES PATENTAMT**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Aufrechterhaltung kann Einspruch eingelegt werden

---

|                       |                  |                                           |                                            |
|-----------------------|------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| (21) Aktenzeichen:    | (22) Anmeldetag: | (44) Veröff.-tag der<br>DD-Patentschrift: | (45) Veröff.-tag der<br>Aufrechterhaltung: |
| DD C 12 N / 290 597 2 | 26. 05. 86       | 28. 09. 88                                | 09. 06. 94                                 |

---

(30) Unionspriorität:

—

---

(72) Erfinder: Rüger, Kornelia, Dipl.-Biol., 13051 Berlin, DE; Köhler, Andrea, Dipl.-Biol., Dr. rer. nat., 13055 Berlin, DE; Musielski, Herbert, Dipl.-Ing. Dr. Ing., 12589 Berlin, DE; Mohr, Jutta, Dipl.-Chem. Dr. rer. nat., 13053 Berlin, DE

(73) Patentinhaber: SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin, Berliner Allee 317/321, 13088 Berlin, DE

---

(54) Verfahren zur Herstellung von agglutinierenden monoklonalen Antikörpern gegen menschliche A-Erythrozyten

---

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:

Edelman, L. et al., Immunology 44 (1981): 549–554  
Abe, K. et al., J. of Immunol. 132 (1984): 1951–1954  
Voak et al., Vox Sang. 39 (1980), 13  
Moore et al., Develop. biol. standard, 57 (1984), 49  
Messeiter et al., Biotest Bulletin 1 (1983), 308

## Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von agglutinierenden monoklonalen Antikörpern gegen menschliche A-Erythrozyten durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit menschlichen A-Erythrozyten, Fusion ihrer Milzzellen mit Mausmyelomzellen der Linie P30/1, Selektion der spezifischen agglutinierenden antikörperbildenden Hybride, deren Klonierung und Kultivierung bzw. Transplantation in der Aszitesform in Mäuse, dadurch gekennzeichnet, daß zur Kultivierung bzw. Transplantation der Klon SIFIN mAK „Anti-A-1 (21 III 5/E 10)“ eingesetzt wird.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die humane Erythrozyten der Blutgruppe A spezifisch agglutinieren. Das Anwendungsgebiet ist die Typisierung von Erythrozyten der Blutgruppe A in der Blutgruppenserologie von Blutspende- und Transfusionseinrichtungen, klinischen- und gerichtsmedizinischen Laboratorien.

## Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Kenntnis der Blutgruppe eines Menschen ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Ausführung von Bluttransfusionen und Transplantationen. Im klassischen AB0-Blutgruppensystem werden die Merkmale 0, A, B und AB unterschieden. Die Merkmale sind unter anderem auf der äußeren Membran von menschlichen Erythrozyten vorhanden und können von menschlichen Serumantikörpern agglutiniert werden. Zur Vermeidung von Unverträglichkeitsreaktionen bei Bluttransfusionen und Transplantationen werden die Blutgruppenmerkmale durch Antiseren ermittelt.

Blutgruppentestseren bestehen aus besonders ausgewählten menschlichen Seren, deren Reaktionsparameter mit Erythrozyten den jeweiligen gesetzlichen Bestimmungen (z. B. Arzneibuch der DDR) gerecht werden müssen. In der Regel werden sie von freiwilligen, mit der jeweiligen Blutgruppensubstanz immunisierten Spendern gewonnen.

Jedes für diese Zwecke gewonnene Serum wird selbst bei gleichen Spendern graduelle Unterschiede in der Avidität und im Titer aufweisen. Die Eignung für einen Testserumpool muß überprüft werden. Eine exakte Reproduzierbarkeit der Herstellung derartiger Testseren ist nicht gegeben.

Im Gegensatz dazu lassen sich mit Hilfe der von KÖHLER und MILSTEIN (Nature 256 [1975] 495) entwickelten Hybridantentechnologie spezifische, gegen menschliche Blutgruppenmerkmale gerichtete monoklonale Antikörper produzierende Hybridomzelllinien etablieren. In der Literatur sind bereits monoklonale Antikörper dieser Spezifität beschrieben (VOAK et. al. Vox Sang. 39, [1980], 13, MOORE et. al. Develop. biol. standard. 57, [1984], 49, MESSETER et. al. Biotest Bulletin 1, [1983], 308). Diese permanent kultivierbaren Zelllinien sezernieren die Antikörper in das Zellkulturmedium, das die Grundlage für einen diagnostischen Einsatz bildet. Die Literaturdaten lassen sich wegen Nichtverfügbarkeit der jeweiligen Ausgangsmaterialien nicht reproduzieren bzw. überprüfen.

## Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, agglutinierende monoklonale Antikörper gegen menschliche Erythrozyten mit dem Blutgruppenmerkmal A zur Verfügung zu stellen. Sie sollen durch Zellkultivierung gewonnen werden und in ihren Reaktionsparametern die gesetzlichen Forderungen des Arzneibuches der DDR erfüllen.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von agglutinierenden monoklonalen Antikörpern ist dadurch gekennzeichnet, daß zunächst in an sich bekannter Weise 6–10 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse mit gewaschenen humanen A<sub>1</sub>-Erythrozyten in mehreren Applikationsstufen sowohl intraperitoneal als auch intravenös immunisiert werden. Die Lymphozyten werden aus den Milzen der immunisierten Mäuse isoliert, mit P30-/1 Myelomzellen fusioniert und die Zellsuspension in Selektionsmedium (Littlefield, Science 145 [1964] 709) kultiviert. Simultan mit dem Mediumwechsel werden die Zellkulturüberstände der Mikrotestplatten auf Anwesenheit agglutinierender Antikörper gegen humane Testerythrozyten überprüft. Aus den Vertiefungen der Mikrotestplatten, die eine positive Reaktion aufweisen, werden Hybridzellklone isoliert und separat in der Zellkultur geführt. Nach bestätigter spezifischer Agglutinationsreaktion, Kryokonservierung und nach Reklonierung werden die Subklone nach spezifischer Wirkung, Titer und Avidität bewertet. Unter den derart stabilisierten Hybridomen wurde auch eine Zelllinie etabliert, die monoklonale Antikörper in das Zellkulturmedium sezerniert und unter der Nomenklatur 21 III 5/E 10 oder Sifin mAK-Anti A-1 im Staatlichen Institut für Immunpräparate und Nährmedien hinterlegt wurde.

Diese Zelllinie wird erfindungsgemäß zur Produktion der mAK in der Zellkultur eingesetzt, wobei eine stabile Produktion über einen längeren Zeitraum ohne Veränderung der Antikörperbildungsraten möglich ist. Die Produktion der mAK ist gleichermaßen auch nach Transplantation in der Aszitesform in Mäuse möglich.

Die erfindungsgemäß hergestellten mAK reagieren spezifisch mit den Erythrozyten der Blutspendemerkmale A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>B und A<sub>2</sub>B, jedoch nicht mit 0 und B. Sie erfüllen bzw. übertreffen die im Arzneibuch der DDR gestellten Forderungen an ein Blutgruppentestserum „Anti A“.

Die Isotypcharakterisierung ergab, daß alle Subklone dieser Linie vom IgM-Typ waren. Unter Screeningbedingungen

durchgeführte Vergleiche belegen, daß bei der Bestimmung des Titers eine Überlegenheit gegenüber einem polyklonalen menschlichen Anti-A-Testserum (Sifin) bzw. gleiche oder höhere Verdünnungen gegenüber einem monoklonalen Anti-A-Testserum (Seraclone, Fi. Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt [BRD]) ermittelt wurden (Tab. 1).

Tabelle 1

Bestimmung des Titers von Zellkulturüberständen der Linie Sifin mAK Anti A-1 im Vergleich zu zwei kommerziellen Blutgruppentestseren „Anti A“

|                                           | Blutgruppenmerkmal* <sup>1</sup> |      |      |                |      |      |                  |      |                  |      |      |
|-------------------------------------------|----------------------------------|------|------|----------------|------|------|------------------|------|------------------|------|------|
|                                           | A <sub>1</sub>                   |      |      | A <sub>2</sub> |      |      | A <sub>1</sub> B |      | A <sub>2</sub> B |      |      |
| Testserum „Anti A“<br>sifin               | 1 <sup>+2</sup>                  | 2    | 3    | 1              | 2    | 3    | 1                | 2    | 1                | 2    | 3    |
| Charge: 1361185                           | 2048                             | 1024 | 2048 | 512            | 256  | 256  | 256              | 512  | 32               | 32   | 32   |
| Testserum „Anti A“<br>seraclone Biotest   |                                  |      |      |                |      |      |                  |      |                  |      |      |
| Charge: 121055                            | 4096                             | 1024 | 4096 | 512            | 1024 | 2048 | 512              | 4096 | 512              | 1024 | 1024 |
| Zellkulturüberstand<br>Sifin mAk Anti A-1 | 4096                             | 1024 | 4096 | 2048           | 1024 | 2048 | 2048             | 4096 | 1024             | 2048 | 2048 |

Testbedingungen: Der Test wurde für alle Antiseren simultan durchgeführt.

Die Testseren wurden in Mikrotestplatten zu gleichen Volumina verdünnt und mit identischen Volumina von 1–2%igen in physiologischer NaCl-Lösung gewaschenen Erythrozyten vermischt.

Reaktionszeit: 20 min/23°C

+1 Keine Reaktion mit den Blutgruppenmerkmalen B und 0

+2 1 ... 3 unterschiedliche Spendererythrozyten

#### Ausführungsbeispiel

- 1) Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit mindestens 4 Applikationen von menschlichen A<sub>1</sub>-Erythrozyten immunisiert worden waren, wurden nach den üblichen Techniken mit P30/1 Myelomzellen fusioniert. Die Zellsuspension wurde in HAT-Selektionsmedium (RPMI 1640 supplementiert mit 20% fetalem Kälberserum, 2 mM/l Glutamin, 2 g/l Natriumbicarbonat, 10 mM/l Hepes, 240 JE/ml Penicillin, 150 µg/ml Streptomycin,  $4 \times 10^{-7}$  Mol/l Aminopterin,  $1 \times 10^{-4}$  Hypoxanthin,  $1,6 \times 10^{-5}$  Mol/l Thymikin) unter Zusatz von  $1 \times 10^5$  Maus-Peritonealexsudatzellen/ml 7–10 Tage bei 37°C in einer wassergesättigten 5–6%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.
- 2) Die Selektion antikörper-produzierender Klone wurde simultan mit dem Mediumwechsel durchgeführt. Unter sterilen Bedingungen wurde die Hälfte des Zellkulturüberstandes aus den Vertiefungen der Mikrotestplatte entnommen und in getrennten Agglutinations-Mikrotestplatten, identischer Abmessung, mit gewaschenen menschlichen Testerythrozyten der Blutgruppen A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>B, A<sub>2</sub>B, B und 0 in Kontakt gebracht. Aus den Vertiefungen der Zellkulturmikrotestplatte, deren Überstände eine spezifische Agglutination hervorriefen, wurden Hybridzellklone isoliert und separat in Kultur geführt. Nach Bestätigung der Spezifitätsreaktion wurden sowohl Kryokonserven als auch Reklonierungen nach bekannten Methoden angelegt, in deren Ergebnis nach dem Agglutinationstiter selektiert wurde.
- 3) Das Hybridom SIFIN mAK Anti A-1 (21 III 5/E 10), dessen in den Zellkulturüberstand sezernierte monoklonale Antikörper die im Arzneibuch der DDR an ein Blutgruppentestserum „Anti A“ festgelegten Forderungen für die Höhe des Titers und der Avidität mit A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>B und A<sub>2</sub>B Erythrozytensuspensionen erfüllen bzw. übertreffen, kann mit den bekannten Zellkulturtechniken vermehrt und die Kulturüberstände einschlägig gewonnen werden. Die Spezifität wurde an mehr als 50 Spendererythrozyten je Blutgruppenmerkmal A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>B, A<sub>2</sub>B, B und 0 überprüft.
- 4) Eine Produktion der genannten Antikörper durch Vermehrung der Hybridomzellen als Aszites-Tumor in Paraffin-stimulierten Balb/c-Mäusen wies für 15 eingesetzte Tiere eine 100%ige Aszites-Tumorangehrate aus.