



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 262 039 A1

4(51) C 12 N 5/02
A 61 K 39/395

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 304 923 4

(22) 14.07.87

(44) 16.11.88

(71) Wilhelm-Pieck-Universität Rostock, Universitätsplatz 1, Rostock, 2500, DD

(72) Schütt, Christine, Doz. Dr. sc. med.; Siegl, Edda, Dr. sc. nat.; Claus, Renate, Dr. med.; Friemel, Helmut, Prof. Dr. sc. med., DD

(54) Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die ein Epitop der nichtpolymorphen Strukturen von HLA-Klasse II-Antigenen erkennen

(55) Immunologie, monoklonale Antikörper, HLA-Klasse II-Antigene, nichtpolymorph

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein Antigen von menschlichen Monozyten, B-Lymphozyten und allen anderen Zellen, die Klasse II-Antigene auf ihrer Oberfläche tragen. Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper anzugeben, das in leicht beherrschbarer Art und Weise die kostengünstige Produktion von größeren Mengen spezifischer Antikörper gegen ein Epitop des HLA-Klasse II-Antigens gestattet. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein nachvollziehbares Verfahren anzugeben, in dessen Verlauf zunächst Hybridome erzeugt werden, die leicht und ohne Aufwand handhabbar sind und deren Kultivierung in technisch und ökonomisch vorteilhafter Weise möglich ist. Unter Verwendung dieser Hybridome sollen in anschließenden Verfahrensschritten monoklonale Antikörper erzeugt werden, die mit einem Epitop von HLA-Klasse II-Antigen reagieren, das sich auf der Membran von bestimmten menschlichen Zellen befindet, z. B. B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen. Die Aufgabe wird gelöst durch die Erzeugung des Hybridoms Rola, dessen Kultivierung in vitro oder in vivo und Abtrennung des monoklonalen Antikörpers Rola.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die ein Epitop der nichtpolymorphen Strukturen von HLA-Klasse II-Antigenen erkennen, **dadurch gekennzeichnet**, daß weibliche Balb/c-Mäuse mit humanen adhärennten mononukleären Zellen immunisiert werden, die Milzzellen dieser hyperimmunen Mäuse mit Myelomzellen hybridisiert werden, Hybridomzellen Rola selektioniert werden, die Kulturflüssigkeit oder die Ascitesflüssigkeit gewonnen und der Antikörper Rola isoliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Hybridomzellen Rola kloniert und rektoniert werden und ein Subklon selektioniert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Immunisierung 6–8 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Myelomzellen solche der Linie P3–x63–Ag8.653 eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und 3 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Immunisierung mit humanen adhärennten mononukleären Zellen erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1 und 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die letzte Immunisierung 4 Tage vor der Isolierung der für die Hybridisierung bestimmten Milzzellen vorgenommen wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verhältnis von Myelomzellen zu Milzzellen, die zur Fusion bestimmt sind, etwa 1:1 beträgt.
8. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Verfahrensschritt die Abtrennung der nicht hybridisierten Myelomzellen von den Hybridzellen durch das verwendete Kulturmedium enthalten ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Kulturmedium RPMI — 1640 verwendet wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1 und 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß dem Kulturmedium 10mM HEPES, $5 \cdot 10^{-5}$ M Mercaptoethanol, 0,6g/l Glutamin, 10^6 IU Penicillin und 0,2g/l Streptomycin zugesetzt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 1 und 9 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß dem Medium 10% fetales Kälberserum oder 10% Rinderserum zugesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 1 und 9 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei 37°C kultiviert wird.
13. Verfahren nach Anspruch 1 und 9 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß der CO₂-Gehalt der Atmosphäre über dem Kulturmedium ca. 5% beträgt.
14. Verfahren nach Anspruch 1 und 9 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß über dem Kulturmedium hohe Luftfeuchtigkeit, die bis zur Sättigung der Atmosphäre mit Wasserdampf reichen kann, herrscht.
15. Verfahren nach Anspruch 1 und 9 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß 3–4 Tage kultiviert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß von der gewonnenen Kulturflüssigkeit die zellulären Bestandteile abgetrennt werden, der klare Überstand, der den monoklonalen Antikörper Rola enthält, entweder direkt weiter verwendet wird oder Reinigungs- und Anreicherungsoperationen unterzogen wird, wie z. B. Affinitätschromatographie an Protein A-Sephrose B.
17. Verfahren nach Anspruch 1 und 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß der gereinigte oder ungereinigte Kulturüberstand durch Lyophilisieren in eine dauerhafte Aufbewahrungsform überführt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 1 und 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß die abgetrennten zellulären Bestandteile, die aus Zellen des Hybridoms Rola bestehen, erneut in Kultur genommen werden können.
19. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der lyophilisierte Antikörper Rola bei +4°C aufbewahrt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen nichtpolymorphe Strukturen von HLA-Klasse II-Antigenen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bereits bekannt, monoklonale Antikörper herzustellen.

Köhler und Milstein (Nature **256**, 1975, 495) haben durch Fusion antikörperbildender Zellen mit einer permanent wachsenden Plasmazytomlinie eine Hybridzelllinie erzeugt, die permanent wächst und stabil Antikörper sezerniert. Diese Prinziplösung hat dazu geführt, daß verschiedene Hybridlinien, die Antikörper unterschiedlicher Spezifität produzieren, hergestellt worden sind. So sind eine Reihe von monoklonalen Antikörpern bekannt, die mit nichtpolymorphen Epitopen der HLA-Klasse II-Antigenen reagieren.

1. BMA 020, 021, 022 (BRD)
2. TŮ 35 (Ziegler, A. et al. in: Knapp (Ed.)
Leukemia Markers, New York 1981)
3. CC Anti 12 (USA)
4. VI D 1 (Knapp, W. et al., Leuk. Res. **6**, 1927 [1982])
5. Leu Anti HLA-DR (GB)
6. OK Ia 1 (USA)
7. NEI — 011 (USA)
8. BL-Ia/1, BL-Ia/4 DD-ES 230877A 1

Es sind jedoch keine Hybridlinien bekannt, die in hoher Ausbeute den monoklonalen Antikörper Rola produzieren.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper anzugeben, das in leicht beherrschbarer Weise die kostengünstige Produktion größerer Mengen spezifischer Antikörper gegen nichtpolymorphe Strukturen von HLA-Klasse II-Antigenen gestattet. Dabei soll gleichbleibende Qualität gewährleistet sein. Die Antikörper sollen stabil und damit lagerfähig sein. Sie sollen in einem einfachen Test das Vorkommen von nichtpolymorphen HLA-Klasse II-Antigenen auf menschlichen Zellen nachweisen. Durch das Zurverfügungstellen der monoklonalen Antikörper soll der Stand der Technik bereichert werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein nachvollziehbares Verfahren anzugeben, in dessen Verlauf zunächst Hybridome erzeugt werden, die leicht und unaufwendig handhabbar sind und deren Kultivierung in technisch und ökonomisch vorteilhafter Weise möglich ist. Unter Verwendung dieser Hybridome soll in anschließenden Verfahrensschritten ein monoklonaler Antikörper erzeugt werden, der mit nichtpolymorphen Strukturen von HLA-Klasse II-Antigenen reagiert.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß zunächst nach einem an sich bekannten Verfahren adhärenz mononukleäre Zellen aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert werden. Durch zweifache Adhärenz an Glas werden die adhärenz mononukleären Zellen abgetrennt. Die in der vorstehend beschriebenen Art und Weise gewonnenen mononukleären Zellen tragen das Antigen an der Membran, gegen das die Antikörper gerichtet sind. Mit diesen Zellen werden erfindungsgemäß Mäuse immunisiert. Es werden 6–8 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse verwendet. Die Immunisierung erfolgt durch dreimalige Applikation des Antigens, wobei zwischen der zweiten und dritten Immunisierung mindestens 4 Wochen liegen. Aus den Milzen derart hyperimmunisierter Mäuse werden in an sich bekannter Weise Lymphozyten separiert. Die B-Lymphozyten dieses Zellgemisches werden mit Maus-B-Myelomzellen fusioniert bzw. hybridisiert. Die notwendigen Maus-Myelomzellen P3-x63 Ag 8.563 (Kearney et al., J. Immunol. **123** [1979]) werden in RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum oder Rinderserum gezüchtet. In einem Kulturmedium, welches Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (Littlefield, Science **145** [1964] 709), werden die gebildeten Hybridome von den nichtfusionierten Myelomzellen abgetrennt und erfindungsgemäß Zellklone selektiert, die Antikörper der gewünschten Art sezernieren. Die Selektionierung der Hybridome erfolgt dadurch, daß die Zellen unmittelbar nach der Fusion in zahlreiche 2 ml-Kulturen aufgeteilt werden. Die Überstände der aufwachsenden Hybridzellen enthaltenden Kulturen werden auf die Anwesenheit von Antikörpern überprüft, die nur mit einem Epitop des HLA-Klasse II-Antigens reagieren. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde mit Hilfe des bekannten Reaktionsmusters mit menschlichen Zellen für Anti-HLA-Klasse II-Antikörper überprüft, das sind B-Lymphozyten, Blutmonozyten und aktivierte T-Lymphozyten, nachdem ein vorläufiges Screening der Hybridom-Kulturüberstände mit adhärenz mononukleären Blutzellen vorgenommen wurde (Tab. 1). Die Testung des Reaktionsmusters erfolgt mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz. Es wurde auf diese Weise die Reaktion mit weiteren Zellen, Granulozyten, Thrombozyten, Erythrozyten und ruhenden T-Lymphozyten ausgeschlossen. Die durch diese Testung als positiv befundenen Hybridome wurden kloniert, Subklone herangezogen und zur Produktion von Rola-Antikörpern kultiviert. Das Hybridom Rola wird vorwiegend in Kultur gezüchtet. Der Kulturüberstand wird lyophilisiert und ist damit dauerhaft lagerfähig. Eine Reinigung über Affinitätschromatografie mit Protein-A-Sepharose 4 B ist ebenfalls möglich. Die Anreicherung führt zu einem hochreinen Antikörper. Eine Produktion in der Ascitesflüssigkeit von Balb/c-Mäusen ist ebenfalls möglich, nachdem die Hybridomzellen in die mit Pristan-vorstimulierte Bauchhöhle injiziert werden. Das Kulturmedium ist RPMI-1640 mit dem Zusatz von 0,85 g/l NaHCO₃, 10 mM HEPES, 5 × 10⁻⁵ M Mercaptoethanol, 10⁶ IU Penicillin, 0,2 g/l Streptomycin und 10% fetalem Kälberserum oder Rinderserum. Die Kultur erfolgt bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt der Atmosphäre und hoher Luftfeuchtigkeit über 3–5 Tage.

Der nach einer der beiden Verfahrensvarianten hergestellte Antikörper Rola weist das in der Tab. 1 angegebene Reaktionsmuster mit humanen Blutzellen bzw. menschlichen Zelllinien auf.

Der monoklonale Antikörper Rola reagiert spezifisch mit einem nichtpolymorphen Epitop des menschlichen Klasse II-Antigens, das bei der Immunregulation eine besondere Rolle spielt und dessen Bestimmung für diagnostische Zwecke und in der immunologischen Grundlagenforschung von besonderer Bedeutung ist.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend in einigen Ausführungsbeispielen erläutert werden.

Beispiel 1

In flüssigem Stickstoff lagernde Hybridomzellen Rola werden aufgetaut, gewaschen und in einer Zelldichte von $2-3 \times 10^5$ /ml in Kulturmedium aufgenommen. Das Kulturmedium ist RPMI-1640 mit 10 % fetalem Kälberserum oder Rinderserum, 0,85g/l NaHCO_3 , 10mM HEPES, 5×10^{-5} M Mercaptoethanol, 0,6g/l Glutamin, 10^6 IU Penicillin und 0,2g/l Streptomycin. Die aufgetauten Zellen werden zusammen mit 2×10^4 ml Maus-Peritonealexsudatzellen als Feeder-Zellen in Gewebekulturflaschen bei 37°C, hoher Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 -Gehalt der Atmosphäre über 3–5 Tage kultiviert. Sie können durch passagieren unbegrenzt weitergezüchtet werden. Der Kulturüberstand wird nach 3–5 Tagen von zellulären Bestandteilen durch Zentrifugieren befreit und enthält den monoklonalen Antikörper Rola. Die Konzentration des Antikörpers im Kulturüberstand ist ausreichend für normale Nachweisverfahren, wie z. B. Immunfluoreszenz. Sind höhere Konzentrationen erforderlich, kann eine Reinigung über Affinitätschromatografie mit Sepharose-Protein A erfolgen. Dieses Verfahren ergibt einen hochreinen Antikörper, der z. B. für die direkte Markierung mit z. B. FITC geeignet ist.

Beispiel 2

Kultivierte Hybridomzellen werden durch Zentrifugation gewonnen und zu $1-10 \times 10^6$ in die Bauchhöhle von Balb/c-Mäusen injiziert. Diese Mäuse sind mit 0,5ml Paraffinöl oder Pristan vorstimuliert. Nach etwa 14 Tagen haben die Mäuse genügend Ascites produziert, um punktiert zu werden. Die Mäuse können in Abständen von etwa 14 Tagen mehrmals punktiert werden. Die Ascitesflüssigkeit wird hochtourig abzentrifugiert und verdünnt ungereinigt oder gereinigt durch Gelchromatografie und Ammonsulfatfällung für Nachweisreaktionen eingesetzt. Der Antikörpergehalt in der Ascitesflüssigkeit ist wesentlich höher als in der Kulturflüssigkeit.

Tab. 1

Zellen	Reaktion mit Rola (Immunfluoreszenz)*
Trombozyten	—
Erythrozyten	—
Granulozyten	—
Monozyten	+
Lymphozyten	(+)
T-Lymphozyten	—
akt. T-Lymphozyten	+
B-Lymphozyten	+
NK-Zellen	—
Alveolarmakrophagen	+

* Nachweis mit indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung von FITC-markiertem Anti-Maus-Immunglobulin