



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) DD (11) 276 601 A3

5(51) C 12 N 5/12

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP C 12 N / 316 696 2	(22)	13.06.88	(45)	07.03.90
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Karl-Marx-Universität Leipzig, Karl-Marx-Platz 1, Leipzig, 7010, DD
(72)	Behn, Ingrid, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Hommel, Undine, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Eichler, Wolfram, Dipl.-Biochem.; Seidel, Berthold, Dipl.-Biol.; Fiebig, Helmut, Prof. Dr. sc. nat. Dipl.-Biol., DD

(54)	Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Streptokinase
------	--

(55) Hybridom, monoklonale Antikörper, Streptokinase, Enzymimmunassay, Affinitätschromatographie

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Streptokinase. Ziel der Erfindung ist die Herstellung von Antikörpern hoher Spezifität und Affinität bei guten Ausbeuten. Das erfindungsgemäße Verfahren der Herstellung der monoklonalen Antikörper basiert auf der *in vitro* oder *in vivo* Kultivierung der Hybridome H-3L-STREPKI/1 bis /4 (ZIM-0234, ZIM-0275, ZIM-0274 und ZIM-0273). Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist der Einsatz der monoklonalen Antikörper für die quantitative Bestimmung der Streptokinase sowie für ihre affinitätschromatographische Reinigung.

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Streptokinase, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hybridome H-BL-STREPKI/1, H-BL-STREPKI/2, H-BL-STREPKI/3 und H-BL-STREPKI/4 (KMU) kultiviert bzw. durch Transplantation in syngene Mäuse in an sich bekannter Weise vermehrt und die monoklonalen Antikörper BL-STREPKI/1 bis 4 (ZIM-0234, ZIM-0275, ZIM-0274 und ZIM-0273) daraus gewonnen werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch mit Streptokinase reagieren. Die monoklonalen Antikörper können zur quantitativen Bestimmung von Streptokinase, aber auch zur affinitätschromatographischen Isolierung und Hochreinigung dieses Enzyms eingesetzt werden.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Zur quantitativen Bestimmung mittels radio- oder enzymimmunologischer Methoden sind bisher nur konventionelle Antiseren, die durch Immunisierung von Versuchstieren hergestellt werden können, benutzt worden. Diese konventionellen Antiseren besitzen eine Reihe von Nachteilen, so sind die Antiseren von differenten Tieren nicht identisch, im Gegenteil, es können beträchtliche Unterschiede hinsichtlich des Gehaltes an Antikörpern, in quantitativer und qualitativer Hinsicht, bestehen. Diese Schwankungen und die Chargenabhängigkeit der Antiseren erlauben keine durchgehende Standardisierung. Monoklonale Antikörper, die von permanent wachsenden und produzierenden Hybridomen sezerniert werden, stehen in praktisch ausreichender Menge und über einen theoretisch unbegrenzten Zeitraum zur Verfügung, so daß sich auf ihrer Grundlage reproduzierbare und standardisierbare Immunassays aufbauen lassen. Es ist bereits bekannt, wie monoklonale Antikörper hergestellt werden. Die Prinzipiellösung der Hybridomherstellung wurde von KÖHLER und MILSTEIN (Nature 256, [1975], S. 497) beschrieben. Es sind aber bisher keine monoklonalen Antikörper gegen Streptokinase hergestellt worden.

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 die Streptokinase gestattet. Die monoklonalen Antikörper sollen sich sowohl zum qualitativen Nachweis als auch zur quantitativen Bestimmung der Streptokinase eignen. Weiterhin sollen sie für die affinitätschromatographische Isolierung und Hochreinigung nach Ankopplung an einen festen Träger geeignet sein. Durch die Bereitstellung solcher Antikörper soll die Produktionskontrolle und die Reinigung der Streptokinase verbessert werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein nachvollziehbares Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Streptokinase 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 der Verwendung dieser Hybridome sollen in anschließenden Verfahrensschritten monoklonale Antikörper erzeugt werden, die mit Streptokinase spezifisch reagieren und sich zu deren quantitativen Bestimmung und zu deren Isolierung eignen. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß zunächst nach den bekannten Verfahren isolierte Streptokinase als Immunogen verwendet wird. Vorzugsweise werden 6-8 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse zur Immunisierung verwendet. Die Hyperimmunisierung der Tiere wird durch mehrmalige Gabe des Immunogens induziert. Aus den Milzen derartig hyperimmunisierter Mäuse werden die Lymphozyten in an sich bekannter Weise separiert. Die B-Lymphozyten dieses Zellgemisches werden mit murinen Myelomzellen fusioniert. Die geeigneten Maus-Myelomzellen P3-X63 Ag 8.653 (KEARNEY et al., J. Immunol. 123, [1979], S. 1548) werden in RPMI-1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) gezogen. Die Fusion wird durch Polyethylenglykol oder durch Feldsprungtechnik ausgelöst. In einem Kulturmedium, welches Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (LITTLEFIELD, Science 145, [1964], S. 709), werden die gebildeten Hybridzellen von den nicht fusionierten Myelomzellen abgetrennt und erfindungsgemäß Zellklone selektiert, die Antikörper der gewünschten Spezifität und der anderen gewünschten Eigenschaften sezernieren. Die Selektion erfolgt in der Weise, daß die Zellen unmittelbar nach der Fusion in eine Vielzahl von separaten 200 µl-Kulturen aufgeteilt werden. Die Überstände der aufwachsenden Hybridzellen enthaltenden Kulturen werden auf die Anwesenheit von Antikörpern getestet, die an festphasenadsorbierte Streptokinase binden. Hierzu werden die Kulturüberstände mit einem entsprechenden Enzymimmunassay getestet. Durch Gegentestung mit einer Palette von anderen Substanzen wird die Spezifität für die Streptokinase nachgewiesen. Unter den antikörperproduzierenden Hybridomen werden dann in einem zweiten Selektionsschritt diejenigen Hybridome ausgewählt, deren Antikörper auch mit Streptokinase auf Immunoblots reagieren. Dazu wird die Streptokinase mit

Natriumdodecylsulfat bei 100°C behandelt und anschließend auf Polyacrylamidgelen (7,5–12%) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine durch Elektroblothing auf Nitrozellulosemembranen übertragen und nach Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulose durch Albumin mit den Hybridomüberständen inkubiert. Die Entwicklung der gebundenen Antikörper erfolgt durch Peroxidase-gekoppelte Anti-Mausimmunglobulin-Antikörper und entsprechende Farbstoffe. Nur die in diesem Test positiven Hybridome werden weitergezogen.

In einem dritten Selektionsschritt werden die monoklonalen Antikörper getestet, ob sie zur Isolierung der Streptokinase geeignet sind. Dazu werden die zu testenden Kulturüberstände in die Vertiefungen von Polystyrenmikrotiterplatten gegeben, die mit Anti-Mausimmunglobulin-Antikörpern beschichtet worden waren. Nach Zugabe von radiomarkierter Streptokinase werden die zur Isolierung fähigen Antikörper identifiziert und die Hybridome weiterkultiviert.

Die durch eine derartige Selektion erhaltenen Hybridome werden rekloniert und hochproduktive Subklone selektiert, die die gewünschten monoklonalen Antikörper stabil in hoher Konzentration sezernieren. Die so erhaltenen Hybridome erhalten die Bezeichnung H-BL-STREP/1 bis 4.

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper H-BL-STREP/1 bis 4 basiert auf einem Verfahren, welches auf die *In-vitro*- oder *In-vivo*-Kultur der Hybridome H-BL-STREP/1 bis 4 ausgerichtet ist.

Die Hybridome H-BL-STREP/1 bis 4 werden an der Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität Leipzig kultiviert bzw. liegen kryokonserviert vor und sind Interessenten zugänglich. Die monoklonalen Antikörper BL-STREP/1 bis 4 haben die Registriernummern ZIM-0234, ZIM-0275, ZIM-0274 und ZIM-0273 im Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR erhalten. Die wichtigsten Eigenschaften der Serie monoklonaler Antikörper sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Ausführungsbeispiel

Selektion der Hybridome

Sechs Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse werden mit 100 µg gereinigter Streptokinase mit Komplettem Freund'schen Adjuvans i.m. immunisiert. Die Hyperimmunisierung erfolgt durch dreimalige Gabe des Antigens ohne KFA. Vier Tage nach der letzten Immunisierung wird die Milz entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt.

Die Lymphozyten werden durch Elektrofusion mit mit P3-X63 Ag 8.653-Myelomzellen fusioniert und in HAT-Medium in 8 Mikrogewebekulturplatten (96 Kavitäten) ausgesät.

Die Überstände der die aufwachsenden Hybridzellen enthaltenden Kulturen werden auf die Anwesenheit von Antikörpern getestet, die an festphasengebundene Streptokinase binden. Dazu werden Mikrotiterplatten aus Polystyren mit Streptokinase (10 µg/rill) beschichtet. Durch Gegentestung mit Extrakten aus verschiedenen Bakterienstämmen sowie einer Palette von humanen Serumproteinen wird die Spezifität überprüft.

Unter den antikörperproduzierenden Hybridomen werden dann diejenigen aufgedeckt und ausgewählt, deren Antikörper mit Epitopen reagieren, die auch nach Denaturierung der Streptokinase mit Natriumdodecylsulfat und Elektroblothing des an PAGE aufgetrennten Enzyms auf Nitrozellulosemembranen noch vorhanden sind. Die Entwicklung der gebundenen monoklonalen Antikörper erfolgt dabei durch Peroxidase-gekoppelte Anti-Mausimmunglobulin-Antikörper.

In einem dritten Selektionsschritt werden die monoklonalen Antikörper getestet, ob sie zur Isolierung der Streptokinase geeignet sind. Dazu werden die zu testenden Kulturüberstände in die Vertiefungen von Polystyrenmikrotiterplatten gegeben, die mit Anti-Mausimmunglobulin-Antikörpern beschichtet worden waren. Nach Zugabe von radiomarkierter Streptokinase werden die zur Isolierung fähigen Antikörper identifiziert und die Hybridome weiterkultiviert.

Die durch eine derartige Selektion erhaltenen Hybridome werden rekloniert und hochproduktive Subklone selektiert, die die gewünschten monoklonalen Antikörper stabil in hoher Konzentration sezernieren. Die so erhaltenen Hybridome erhalten die Bezeichnung H-BL-STREP/1 bis 4.

Tabelle 1

Charakteristika der monoklonalen Antikörper
BL-STREP/1 bis 4

Eigenschaft	Monoklonaler Antikörper BL-STREP/			
	1	2	3	4
Isotyp	IgG3	IgG1	IgG1	IgM
Eignung als				
Detektionsantikörper	ja	ja	ja	ja
Fangantikörper	ja	ja	ja	ja
Reaktion mit Streptok.				
nativ	ja	ja	ja	ja
NDS denaturiert	ja	ja	ja	ja
Affinität				
K ($\times 10^6$ l/Mol)	1000	1500	2,0	0,5