



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **224 769 A1**

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

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

| | | | | | |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | WP A 61 K / 262 227 1 | (22) | 24.04.84 | (44) | 17.07.85 |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|

| | |
|------|--|
| (71) | Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD |
| (72) | Böttger, Volker, Dipl.-Biol.; Hering, Silvia, Dipl.-Biol.; Micheel, Burkhard, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol., DD |

(54) **Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen myeloische Leukämiezellen des Menschen**

(57) Ziel der Erfindung ist die Herstellung von Antikörpern hoher Spezifität in guten Ausbeuten. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit humanen myeloischen Leukämiezellen immunisiert wurden, mit X63-Ag8.653 Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die antikörperproduzierenden Hybridome selektiert, ihre Bindungsspezifität an verschiedene Zelltypen bestimmt und die spezifischen Hybridome für die Antikörperproduktion auswählt. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik und Therapie.

BÖTTGER, Volker
HERING, Silvia
Dr. MICHEEL, Burkhard

Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern
gegen myeloische Leukämiezellen des Menschen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen myeloische Leukämien des Menschen. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik und Therapie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Verschiedene Leukämien humanen Ursprungs können in der Zellkultur unbegrenzt gehalten werden. Die Linie K562 wurde ursprünglich von einem Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML) angelegt (LOZZIO u. LOZZIO, Blood 1975, 45, 321). Sie besitzt Eigenschaften einer pluripotenten Stammzelle.

Verschiedene monoklonale Antikörper gegen humane Leukämiezellen sind bekannt, es wurden auch schon derartige Antikörper gegen K562-Zellen beschrieben (YOUNG et al., Proc. Nat.Acad.Sci. 1981, 78, 7073; SCHIENLE u. MÜLLER-RUCHHOLTZ, J. Cancer Res.Clin.Oncol. 1981, 101, 109). Die Herstellung der monoklonalen Antikörper erfolgte durch die bekannten Techniken der Zellfusion und Selektion antikörperproduzierender Hybridome. Die bisher beschriebenen Anti-K562-Antikörper reagieren jedoch nicht ausschließlich mit Leukämiezellen und sind daher für eine medizinische Diagnostik und Therapie nur bedingt einsetzbar.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, monoklonale Antikörper hoher Spezifität gegen bestimmte Leukämiezellen herzustellen. Diese Antikörper sollen für die immunhistologische und serologische Diagnostik und möglicherweise nach Kopplung mit einem zytotoxischen Reagens für die Therapie derartiger Leukämien geeignet sein.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen K562- und andere myeloische Leukämiezellen ist dadurch gekennzeichnet, daß man Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit K562-Zellen immunisiert wurden, mit X63-Ag8.653 Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert und die erhaltenen Hybridome in Mikrottestplatten aussät. Die antikörperproduzierenden Hybridome werden mit Radioimmun-, Immunofluoreszenz- und Rosettentests nachgewiesen. Die reaktiven Hybridome werden kloniert, ihre Spezifität wird erfindungsgemäß mit einer Vielzahl von normalen und leukämischen Zellen und mit Hilfe obengenannter serologischer Tests ermittelt. Die spezifischen Hybridome werden ausgewählt, weitervermehrt, in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf zur Produktion größerer Antikörpermengen auf Mäusen in Aszitesform transplantiert.

Bei der Immunisierung von Mäusen mit der Zelllinie K562, die zahlreiche Eigenschaften von Stammzellen besitzt, ist die Bildung von verschiedenen Antikörpern zu erwarten, ^{die} ~~da~~ unterschiedliche weiße Blutzellen sowie Leukämiezellen verschiedenen histologischen Ursprungs erkennen. Die Bildung von Antikörpern, die nur mit K562-Zellen oder nur mit bestimmten Leukämiezellen reagieren, ist dabei sehr unwahrscheinlich.

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden:

Ausführungsbeispiel:

- 1) Herstellung der Hybridome aus Milzzellen von Balb/c-Mäusen und X63-Ag8.653 Myelomzellen. Fusion, Kultivierung, Klonierung etc. in Anlehnung an die Originalarbeit KÖHLER und MILSTEIN, Nature 1975, 256, 495. Die Myelomlinie X63-Ag8.653 wurde von KEARNEY et al., J.Immunol. 1979, 123, 1547, hergestellt.
- 2) Die Selektion antikörperproduzierender Hybridome erfolgte mit einem Radioimmuntest, bei dem vitale K562-Zellen nacheinander mit dem Kulturüberstand der Hybridome und anschließend mit ¹²⁵J-markierten Anti-Maus-Ig-Antikörpern inkubiert wurden.
- 3) Die Ermittlung der Reaktionsspezifität der identifizierten Antikörper erfolgte durch Austesten von verschiedenen kultivierten Zelllinien, normalen weißen Blutzellen und Leukämiezellen unterschiedlichen histologischen Ursprungs mit dem Radioimmuntest, dem Rosettenimmuntest (Inkubation der vitalen Zellen mit den Antikörpern und anschließend mit Protein-A-markierten Rinder- oder Schaferythrozyten) und in erster Linie mit dem indirekten Immunofluoreszenztest an fixierten Zellen (Inkubation der auf Objektträger angetrockneten und Azeton-fixierten Zellen mit den Antikörpern und anschließend mit Fluoreszin-markierten Anti-Maus-Ig-Antikörpern). Die Auswertung erfolgte mit einem Gammastrahlen-Zählgerät unter dem Lichtmikroskop oder unter dem Fluoreszenzmikroskop entsprechend dem angewendeten Test.

Erhaltene wichtigste monoklonale Antikörper

| Bezeichnung der Antikörper | Spezifität | Bemerkungen |
|---|--|---|
| ZIK-C1-A/D9 (Laborbezeichnung J; Ig-Subklasse: IgG 1) | ausschließlich K562 und myeloische Leukämiezellen (von 35 getesteten Leukämien zeigten 24 eine positive Reaktion, d.h. etwa 70 %) | Dieser Antikörper bietet sich da- mit für eine An- wendung in der Diagnostik und Therapie myeloi- scher Leukämien geradezu an. |
| ZIK-C1-A/C5 (Laborbezeichnung C; Ig-Subklasse: IgG 2a) | K562 und weiße Blutzellen der lymphatischen Reihe | Diese Antikörper sind für immu- nologische Untersuchungen in der Häma- tologie anwend- bar. |
| ZIK-C1-A/H5 (Laborbezeichnung H) | K562 und weiße Blutzellen der granulozytären Reihe | |

4) Herstellung der Antikörper

Die Gewinnung der Antikörper erfolgte aus der Kulturflüssigkeit der kultivierten bzw. aus der Aszitesflüssigkeit der transplantierten Hybridome entsprechend üblicher Methoden (KENNETT, McKEARN u. BECHTOL: Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses. Plenum Press, New York u. London 1981).

5) Anwendungsmöglichkeiten der erhaltenen Antikörper:

Alle erhaltenen Antikörper können für immunhistologische Tests bei hämatologischen Untersuchungen herangezogen werden. Besonders der Antikörper ZIK-C1-A/D9 bietet sich für eine immunhistologische bzw. serologische Differenzierung von myeloischen Leukämien an. Nach Kopplung mit toxischen Substanzen erscheint eine Anwendung in der Therapie myeloischer Leukämien ebenfalls sinnvoll, entweder durch In-vivo-Injektion oder durch In-vitro-Behandlung autologer Knochenmarkstransplantate bei Patienten mit diesen Erkrankungen.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen myeloische Leukämiezellen des Menschen,

dadurch gekennzeichnet,

daß man Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit humanen myeloischen Leukämiezellen (in diesem Fall der Zelllinie K562) immunisiert wurden, mit X63-Ag8.653 Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die antikörperproduzierenden Hybridome selektiert, ihre Bindungsspezifität an verschiedene Zelltypen bestimmt, die spezifischen Hybridome auswählt und in bekannter Weise kultiviert oder auf Mäusen in Aszitesform transplantiert.

2. Verfahren nach Punkt 1.,

dadurch gekennzeichnet,

daß man durch Immunisierung mit einer Zelllinie mit Stammzellcharakter (K 562) monoklonale Antikörper erhält, die unterschiedliche weiße Blutzellen sowie Leukämiezellen einer ganz bestimmten histologischen Spezifität (myeloische Leukämien) erkennen können.