



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **244 564 A1**4(51) **C 12 N 5/02**
A 61 K 39/395
C 12 N 15/00**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 284 978 7	(22)	23.12.85	(44)	08.04.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72)	Micheel, Burkhard, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Scharte, Gudrun; Schmidt, H.-Eberhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Herzmann, Hermann, Dr. sc. rer. nat. Dipl.-Chem.; Voss, Peter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Kaiser, Günter, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern mit HCG-Kreuzaktivität

(57) Ziel der Erfindung ist die Herstellung von Antikörpern hoher Bindungsfähigkeit in guten Ausbeuten. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit HCG immunisiert wurden, mit X63-Ag8.653 Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die Hybride mit kreuzreagierenden Antikörpern selektiert, in der Zellkultur weiterzchtet und auf Mäusen in der Aszitesform weitertransplantiert. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern mit HCG-Kreuzreaktivität, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit HCG immunisiert wurden, mit X63-Ag 8.653 Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert, die antikörperproduzierenden Hybride bestimmt, die Hybride mit den entsprechenden kreuzreagierenden Antikörpern selektiert und in bekannter Weise kultiviert und auf Mäusen in der Aszitesform weitertransplantiert.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern mit HCG-Kreuzreaktivität, die also mit humanem Choriogonadotropin (HCG) und den mit HCG verwandten Hormonen luteinisierendes Hormon (LH), Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und thyreotropes Hormon (TSH) reagieren. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Hormone HCG, LH, FSH und TSH sind Glykoproteine, die aus zwei Untereinheiten, der α - und der β -Kette, aufgebaut sind. Während die α -Kette bei allen vier Hormonen fast identisch ist, unterscheiden sich die β -Ketten biochemisch und immunologisch voneinander.

HCG ist ein Serum und im Urin während der Schwangerschaft nachweisbar, seine Anwesenheit ist deshalb ein ausgezeichneter Schwangerschaftsindikator. Der HCG-Nachweis ist weiterhin in der Tumordiagnostik von Bedeutung, da HCG von Trophoblastentumoren sowie einigen Tumoren anderen Ursprungs gebildet wird.

LH und FSH erscheinen im Serum und im Urin in hoher Konzentration in der Mitte des normalen Menstruationszyklus.

LH- bzw. FSH-Nachweise sind deshalb als Indikator für den Zeitpunkt der Befruchtung geeignet.

TSH kontrolliert die normale Schilddrüsenfunktion. Abnorme TSH-Werte im Serum treten bei Hypothyreose und Myxödem auf.

Die einfachsten und schnellsten Nachweismethoden erfolgen durch Immuntests mit spezifischen Antikörpern. Bei der Anwendung von Zwei-Seiten-Bindungstests genügt ein spezifischer Antikörper, der das jeweilige Hormon von den anderen unterscheidet, und ein universeller kreuzreagierender Antikörper, der für Immuntests zum Nachweis aller vier Hormone eingesetzt werden kann.

Monoklonale Antikörper, die durch Zellfusion und Selektion antikörperproduzierender Hybridomklone gewonnen wurden und entsprechende Kreuzreaktivität besitzen, bieten sich für den Nachweis der vier Hormone mit Hilfe von Zwei-Seiten-Bindungstests an. Antikörper mit entsprechender Kreuzreaktivität sind bereits beschrieben und für Zwei-Seiten-Bindungstests eingesetzt worden (J. G. WADA, R. J. DANISCH, S. R. BAXTER et al., Clin. Chem. **28**, 1862, 1982). Da in zahlreichen Laboratorien intensive Untersuchungen zur Herstellung weiterer Antikörper erfolgen, genügen diese Antikörper offensichtlich nicht allen Anforderungen.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, monoklonale Antikörper starker Bindungsfähigkeit gegen HCG, LH, FSH und TSH in großen Ausbeuten herzustellen. Diese Antikörper sollen zum Aufbau eines Testsystems zum Nachweis dieser Hormone geeignet sein.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die mit HCG sowie mit LH, FSH und TSH reagieren, ist dadurch gekennzeichnet, daß man Milzzellen von Balb/c-Mäusen, die mit HCG immunisiert wurden, mit X63-Ag 8.653 Myelomzellen in der Zellkultur fusioniert und die erhaltenen Hybride in Mikrottestplatten aussät. Die antikörperproduzierenden Klone werden mit einem Festphasen-Radioimmuntest nachgewiesen und selektioniert.

Für den Test wird Anti-Maus-Immunglobulin an PVC (Tablettenfolie) gebunden, danach erfolgt eine Inkubation mit dem Kulturüberstand der Hybridklone und anschließend mit radioaktiv markiertem (^{125}J) HCG, LH, FSH bzw. TSH. Die kreuzreaktiven Hybridklone werden ausgewählt, weitervermehrt und danach in flüssigem Stickstoff gelagert, in bekannter Weise kultiviert und auf Mäusen in der Aszitesform transplantiert.

Die beschriebene Versuchsdurchführung führte zur Herstellung des kreuzreaktiven Hybridklons B9-AB9 in mehreren Subklonen.

Der erfindungsgemäß hergestellte Antikörper reagiert identisch mit Vorteil HCG, LH, FSH und TSH, zeigt hohe Bindungsintensität, ist in großen Ausbeuten gewinnbar und adsorbiert passiv an Plastmaterialien.

Mit dem durch den Hybridklon B9-AB9 produzierten monoklonalen Antikörper besteht die Möglichkeit, einen Immuntest aufzubauen, der sowohl HCG, LH, FSH als auch TSH nachweist oder in Kombination mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch gegen eines dieser Hormone gerichtet ist (Zwei-Seiten-Bindungstest), diese Hormone voneinander unterscheidet.

Der Hybridklon B9-AB9 wurde unter der Nummer 0107 im Zentralinstitut für Molekularbiologie hinterlegt.

Ausführungsbeispiel

- 1) Herstellung der Hybride aus Milzzellen von mit HCG immunisierten Balb/c-Mäusen und X63-Ag 8.653 Myelomzellen. Fusion, Kultivierung, Klonierung etc. nach der Originalarbeit KÖHLER, G. und C. MILSTEIN, Nature 1975, **256**, 495–497. Die Myelomlinie X63-Ag 8.653 wurde von KEARNY, J. F. et al., J. Immunol. 1979, **123**, 1547–1557 hergestellt.
- 2) Die Selektion antikörperproduzierender Hybridome wurde nach MICHEEL, B. et al., J. Immunol. Meth. 1981, **46**, 41–46 durchgeführt.
Dabei wurde ein kreuzreaktiver Hybridklon erhalten, der mit B9-AB9 bezeichnet wurde.
- 3) Spezifitätsüberprüfung des monoklonalen Antikörpers B9-AB9.

radioaktiv markiertes Hormon	Intensität der Bindung
HCG	+++
LH	+++
FSH	+++
TSH	++

4) Produzierte Antikörpermengen

Der Hybridomklon B9-AB9 produziert den entsprechenden Antikörper in hoher Quantität. Wird er in der konventionellen Zellkultur gehalten, ist der Antikörper noch bei einer Verdünnung von $1:10^3$ nachweisbar. In der Aszitesflüssigkeit Hybridomtragender Mäuse sind noch bei Verdünnungen von größer als $1:10^6$ Antikörper nachweisbar.

Damit entspricht der Klon B9-AB9 den stark produzierenden Hybridzellen.

Der produzierte Antikörper läßt sich sehr gut an Plaste (Polyvinylchlorid, Polystyrol) adsorbieren, wodurch eine Grundvoraussetzung zum Aufbau von Festphasen-Immuntests gegeben ist.