



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 272 473 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 / 316 700 6	(22)	13.06.88	(44)	11.10.89
(71)	Karl-Marx-Universität Leipzig, Karl-Marx-Platz 1, Leipzig, 7010, DD				
(72)	Fiebig, Helmut, Prof. Dr. sc. nat. Dipl.-Biol.; Kupper, Hartmut, Dr. med.; Eichler, Wolfram, Dipl.-Biochem., DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die Epsilon-Kette des CD 3-Antigens humaner T-Lymphozyten				

(55) monoklonaler Antikörper, Hybridom, T-Lymphozyten, CD 3-Antigen, humane Lymphozyten, Leukozytendifferenzierung, Leukämiediagnostik

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper für die Epsilon-Kette (20 kDa) des CD 3-Antigens normaler und neoplastischer humaner T-Lymphozyten. Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Herstellung von entsprechenden monoklonalen Antikörpern anzugeben, das in leicht beherrschbarer Weise die kostengünstige Produktion größerer Mengen dieser Antikörper erlaubt. Die monoklonalen Antikörper weisen eine hohe Spezifität und Affinität auf, so daß sie zum Einsatz in der Durchflußzytometrie und Immunhistologie vorzüglich geeignet sind. Dazu werden in bekannter Weise Hybridzellen von B-Lymphozyten immunisierter BALB/c-Mäuse erzeugt und Hybridomzellen selektiert, deren monoklonale Antikörper die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Der monoklonale Antikörper BL-TP 3 bindet spezifisch mit hoher Affinität an die Epsilon-Kette des CD 3-Antigens. Das Verfahren zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers basiert auf der Kultivierung des Hybridoms H-BL-TP 3 *in vitro* und *in vivo* und der Abtrennung des Antikörpers. Der monoklonale Antikörper hat die Registriernummer ZIM-0152. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Patentanspruch :

Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die Epsilon-Kette des CD 3 - Antigens humaner T-Lymphozyten durch Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit angereicherten humanen T-Lymphozyten, Fusion von aus den Milzen solcher Mäuse gewonnenen B-Lymphozyten mit murinen Myelomzellen, Selektion von Hybridomen, die monoklonale Antikörper mit Pan-T-Zellreaktivität sezernieren, dadurch gekennzeichnet,

daß Hybridome, deren monoklonale Antikörper mit einem Protein von 20 kDa spezifisch reagieren, dergestalt selektiert werden,

daß zuerst T-Lymphozyten-spezifische Klone ausgewählt werden, anschließend diejenigen Hybridome, deren monoklonalen Antikörper durch zwei aufeinanderfolgende Selektionsschritte, die auf der Doppelmarkierung der Lymphozyten mit den in den Kulturüberständen enthaltenen Antikörpern, die mit FITC-markiertem Anti-Mausimmunglobulin entwickelt werden, und TRITC-markierten Pan-B-Zell- und Pan-T-Zell- Antikörpern beruhen, die die Pan-T-Zell - Spezifität garantieren, ausgewählt werden,

in einem vierten Selektionsschritt sichergestellt wird, daß die Antikörper mit CD 3 - Antikörpern komodulieren,

wobei in einem fünften Selektionsschritt nur diejenigen monoklonalen Antikörper berücksichtigt werden, die bei indirekter Immunfluoreszenz und durchflußzytometrischer Auswertung eine für die stabile Markierung ausreichend hohe Affinität aufweisen,

in einem sechsten Schritt die Antikörper ihre Eignung zur Markierung der T-Zellen in Kryostatgewebeschnitten bestätigen und keine Nebenreaktionen mit anderen nicht lymphoiden Geweben eingehen,

in einem weiteren Selektionsschritt Hybridome ausgewählt werden, deren monoklonale Antikörper mit einem radiomarkierten, durch Detergensbehandlung der T-Zellen solubilisierten, nicht glykosylierten Zellmembranantigen mit einem Molekulargewicht von 20 kDa reagieren, selektiert werden,

daß das so determinierte Hybridom H-BL-TP 3 (Registriernummer ZIM-0152) *in vitro* und *in vivo* kultiviert wird und der sezernierte monoklonale Antikörper BL-TP 3 isoliert, angereichert und gegebenenfalls mit Markern oder an feste Phasen gekoppelt wird.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die Epsilon-Kette des CD 3 - Antigens humaner T-Lymphozyten

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die mit einem Zellmembranantigen (p 20) des CD 3 - Komplexes humaner T-Lymphozyten reagieren. Die monoklonalen Antikörper können zur medizinischen Diagnostik und zur Eliminierung von normalen und neoplastischen humanen T-Lymphozyten eingesetzt werden.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Es ist bereits bekannt monoklonale Antikörper herzustellen. Die Prinzipiellösung der Hybridomherstellung wurde von KÖHLER und MILSTEIN (Nature 256, (1975), S.495) beschrieben.

Es sind monoklonale Antikörper bekannt, die mit unterschiedlichen Zelloberflächenantigenen humaner T-Lymphozyten reagieren (P.C.KUNG, G.GOLDSTEIN: Human T-lymphocyte differentiation antigens detected by monoclonal antibodies, Research Monographs in Immunology, Vol.3, S.5-15, Hrsg.: TURK, Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford 1981 sowie J.A.LEDBETTER, A.E.FRANKEL, L.A.HERZENBERG: Human Leu T-cell differentiation antigens: quantitative expression on normal lymphoid cells and cell-lines, ebenda, S.16-22). Zu den verbreitetsten monoklonalen Antikörpern, die mit der Gesamtheit der humanen T-Zellen reagieren, gehören OKT3 (US-PS 4 515 893), OKT1 (US-PS 4 515 894), Anti-T 12 (EP 0 097 518) und OKT 11 (US-PS 4 614 720). Darüber hinaus sind weitere monoklonale Antikörper bekannt geworden, die ebenfalls T-Zell-spezifisch reagieren (DD 238 168 A3) und sogar an den antigenspezifischen Rezeptorkomplex der humanen T-Zellen binden (DD-PS 250 333).

Die monoklonalen Antikörper gegen humane Leukozyten sind für die medizinische Diagnostik von großer Bedeutung, so daß im Rahmen von

bisher drei Workshops über Leukozytenantigene (Paris 1982, Boston 1984, Oxford 1986) eine internationale Standardisierung begonnen wurde, die zur CD-Nomenklatur ("Cluster of Differentiation") der entsprechenden monoklonalen Antikörper geführt hat. Die monoklonalen Antikörper der CD-Gruppen 2,3,5,6 und 7 reagieren mit allen oder zumindest der großen Mehrheit der humanen T-Zellen (Leukocyte Typing II. Vol.1-3, Hrsg.: E.L.REINHERZ et al.: Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo 1986).

Für den Nachweis der Gesamtheit der humanen T-Zellen wird vielfach der monoklonale Antikörper OKT 3 (US-PS 4 515 893) eingesetzt. Ein Äquivalent ist der Anti-Leu 4 der Firma Becton/Dickinson. Beide monoklonalen Antikörper sind dem CD 3 zuzuordnen.

Die besondere Bedeutung der Antikörper der CD 3 - Gruppe liegt in der engen Assoziation dieses CD 3 - Antigenkomplexes mit dem antigenspezifischen T-Zellrezeptor. Sowohl der hauptsächlich vorkommende Alpha/Beta - Rezeptor, als auch die relativ seltenen Gamma/Gamma- bzw. Gamma/Delta - Rezeptoren sind durch eine relativ feste nichtkovalente Bindung mit dem CD 3 - Komplex auf der Zellmembran der reifen T-Lymphozyten verbunden. Die Neuordnung der Genstücke der Ketten des T-Zellrezeptors, deren Synthese und Zelloberflächenexpression sind die determinierenden Ereignisse in der Ontogenese der T-Lymphozyten. Es gilt als sicher, daß der T-Zellrezeptor für die Realisierung seiner Signalweitergabefunktion der Kooperation mit dem CD 3 - Komplex bedarf. Es gibt bisher noch keine Hinweise, daß der T-Zellrezeptor auf der Zellmembran ohne den CD 3 - Komplex vorkommt oder gar ohne ihn funktionell wirksam werden könnte. Diese strukturelle und funktionelle Assoziierung des antigenspezifischen T-Zellrezeptors und des CD 3 - Komplexes macht monoklonale Antikörper gegen die CD 3 - Antigene zu solchen hochspezifischen Nachweisreagenzien für T-Lymphozyten.

Der CD 3 - Komplex besteht aus mindestens drei verschiedenen Ketten. Die Gamma-Kette ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa, wobei infolge der unterschiedlichen Glykosylierung aber auch Komponenten im gesamten Bereich von 25 bis 29 kDa auftreten können. Die Delta-Kette ist ebenfalls ein Glykoprotein und besitzt ein M_r von 20 kDa. Nach Deglykosylierung entstehen zwei Polypeptide mit Molekulargewichten von 14 und 16 kDa (BORST, J. et al., Nature 312, (1984), S. 455 - 458). Die Epsilon-Kette hat ebenfalls ein M_r von 20 kDa, ist aber im Gegensatz zu

den anderen beiden Ketten nicht glykosyliert (BORST et al., Eur. J. Immunol. 13 (1983), S. 576 - 580).

Soweit bekannt reagieren die meisten beschriebenen monoklonalen CD 3 - Antikörper entweder mit der Gamma- oder Delta-Kette, wobei aufgrund der engen Assoziation in unterschiedlichen Anteilen auch die anderen Ketten (epsilon, aber auch alpha und beta) mitisoliert werden können (Leucocyte Typing III, Hrsg.: A.J. McMICHAEL et al., Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1987). Es sind bisher nur zwei monoklonale Antikörper (SP 6 und SP 10) beschrieben worden, die mit der Epsilon-Kette reagieren (PESSANO et al., EMBO J. 4, (1984), S. 337 - 344). Diese monoklonalen Antikörper wurden durch Immunisierung mit der isolierten denaturierten Epsilon-Kette erzeugt und reagieren auch mit NDS- denaturierten Epitopen dieser Kette in Immunblottingexperimenten. Leider sind diese monoklonalen Antikörper nicht kommerziell erhältlich.

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 für die Epsilon-Kette des CD 3 - Antigens (Protein 20 kDa) der humanen T-Lymphozyten gestattet.

Die monoklonalen Antikörper sollen eine hohe Affinität besitzen und mit einem Epitop der Epsilon-Kette des CD 3 - Antigens reagieren, das sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird, und sie sollen sich dadurch zur qualitativen und quantitativen durchflußzytometrischen Analyse, zum immunhistologischen Nachweis von T-Zellen in Kryostatgewebeschnitten sowie zur Eliminierung von normalen und neoplastischen T-Zellen aus Lymphozytenpräparationen eignen.

Die monoklonalen Antikörper sollen stabil und lagerfähig sein. Sie sollen sich auch zur direkten Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen eignen.

Durch die Bereitstellung solcher monoklonalen Antikörper soll die medizinische Diagnostik von humanen T-Lymphozyten qualifiziert 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 sollen in anschließenden Verfahrensschritten monoklonale Antikörper erzeugt werden, die mit der Epsilon-Kette des CD 3 - Antigens, einem Protein von 20 kDa, der humanen T-Zellen reagieren.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß zunächst nach den bekannten Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation Lymphozyten aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern isoliert werden. Durch Passage über Nylonwolle oder E-Rosettenbildung werden daraus T-Lymphozyten gewonnen.

Mit in der vorangehend beschriebenen oder auf eine andere ähnliche Weise gewonnen humanen T-Lymphozyten werden Mäuse immunisiert. Vorzugsweise werden 6-8 Wochen alte weibliche BALB/c - Mäuse verwendet. Die Immunisierung erfolgt durch mehrmalige Applikation des Antigens.

Aus den Milzen derart hyperimmunisierter Mäuse werden die Lymphozyten in an sich bekannter Weise separiert.

Die B-Lymphozyten dieses Zellgemisches werden mit Maus-B-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 (FKS) gehalten.

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 in der Zielstellung genannten Eigenschaften sezernieren.

Die Selektion der Hybridome 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 nur mit Zelloberflächenantigenen von humanen T-Lymphozyten reagieren. Hierzu werden alle

Kulturüberstände, die mit humanen Blutlymphozyten reagieren, mit B-Lymphozyten, die durch Eliminierung der T-Zellen durch E-Rosettentechnik und/oder Nylonwolleseparation gewonnen werden, getestet. Nur diejenigen Kulturen werden weiter verwendet, deren Antikörper nicht mit B-Lymphozyten, wohl aber mit der großen Mehrheit der Blutlymphozyten und allen separierten T-Lymphozyten reagieren. Die Testung der Kulturüberstände mit den entsprechenden Zellen kann sowohl durch indirekte Radiobindungstechnik als auch durch indirekte Immunfluoreszenz erfolgen.

So selektierte Kulturen müssen ab dieser Stufe jedoch auf jeden Fall mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik überprüft werden. Dadurch wird ausgeschlossen, daß Hybridome weitergezogen werden, deren Antikörper mit B-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten reagieren.

Unter den in solcher Art vorselektierten Hybridomen werden nun erfindungsgemäß solche Klone gesucht, deren Antikörper nach Bindung an Lymphozyten und Entwicklung mit FITC-markiertem Anti-Mausimmunglobulin und nachfolgender Zugabe von TRITC-markiertem Anti-Pan-B-Zellen - Antikörper keine Doppelmarkierung von Zellen ergeben. Als Pan-B-Zell - Antikörper können eingesetzt werden: BL-B 22 oder BL-B 20.

In einem weiteren Selektionsschritt wird durch Doppelmarkierung mit einem TRITC-markiertem Anti-Pan-T-Zell-Antikörper nachgeprüft, daß alle durch diesen Pan-T-Zell - Antikörper markierten Lymphozyten auch durch den Hybridomüberstand markiert werden. Als Pan-T-Zell - Antikörper eignet sich besonders TRITC-BL-T/Rec.

Unter den so selektierten Hybridomen werden dann nur die weitergezogen, deren monoklonale Antikörper mit einem etablierten CD 3 - Antikörper komodulieren.

In einem anschließendem Selektionsschritt werden davon alle die Hybridome weiterkultiviert, deren Antikörper humane T-Lymphozyten nach indirekter Markierung ausreichend stark anfärben, so daß die monoklonalen Antikörper sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Analyse in durchflußzytometrischen Verfahren, wie z.B. der Analyse mit einem fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACS 440), eingesetzt werden können.

In einem weiteren Selektionsschritt werden die selektierten Hybridome überprüft, ob sie sich für die Markierung von antigen-tragenden Zellen in Kryostatschnitten lymphoider Gewebe eignen und

daß sie keine Nebenreaktionen mit anderen Geweben aufweisen.

In einem weiteren Selektionsschritt werden dann nur Hybridome weitergezogen, deren monoklonale Antikörper von den Membranen der T-Lymphozyten ein Antigen isolieren, welches ein apparentes Molekulargewicht von ca. 20 kDa, auch nach Deglykosylierung durch Endo-F, besitzt.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes werden die Oberflächenproteine von nativen humanen T-Lymphozyten nach der Laktoperoxidasemethode radioiodiert (125-Iod) oder anderweitig markiert. Die Triton X-100 - Lysate solcher markierten T-Zellen werden mit den zu untersuchenden Hybridomüberständen inkubiert und anschließend diese Mausantikörper durch Zugabe von Anti-Mausimmunglobulin-Serum präzipitiert.

Die von unspezifischen Komponenten freigewaschenen Präzipitate werden in Natriumdodecylsulfat-Puffer aufgelöst und anschließend einer NDS-Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen (5-10 %) unterzogen. An Hand von Referenzproteinen wird das apparente Molekulargewicht der radioiodierten, durch den entsprechenden monoklonalen Antikörper spezifisch abgetrennten T-Zellantigene bestimmt. Es werden solche Hybridome ausgewählt, deren monoklonale Antikörper mit Zelloberflächenantigenen von humanen T-Zellen reagieren, die im reduzierten Zustand ein apparentes Molekulargewicht von 20 kDa, auch nach Endo-F - Behandlung, aufweisen.

Die durch eine derartige Selektion erhaltenen Hybridome werden rekloniert und hochproduktive Subklone selektiert, die die gewünschten monoklonalen Antikörper stabil sezernieren. Die so erhaltenen Hybridome werden als H-BL-TP 3 bezeichnet.

Die Herstellung des monoklonalen Antikörpers BL-TP 3 basiert auf einem Verfahren, welches auf die *In-vitro*- oder *In-vivo*-Kultur des Hybridoms H-BL-TP 3 ausgerichtet ist. Das Hybridom H-BL-TP-3 wird an der Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität Leipzig kultiviert bzw. liegt kryokonserviert vor und ist Interessenten zugänglich. Der monoklonale Antikörper BL-TP 3 hat die Registriernummer ZIM-0152 im Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR erhalten.

Der durch *In-vitro*- oder *In-vivo*-Kultur erhaltene monoklonale Antikörper BL-TP 3 reagiert mit Leukozyten, anderen Blutzellen sowie lymphoiden Zellen aus bestimmten Organen in der in Tabelle 1 dargestellten Weise.

Das Reaktionsmuster des monoklonalen Antikörpers mit permanent wachsenden Zell-Linien ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Der monoklonale Antikörper BL-TP 3 kann nach den üblichen, dem Fachmann bekannten Verfahren mit FITC, TRITC, Phycoerythrin und Biotin gekoppelt werden. Diese direkt markierten Präparate zeigen eine starke Markierung der humanen T-Zellen.

Die wichtigsten Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers BL-TP 3 sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Der monoklonale Antikörper BL-TP 3 gehört der IgG1-Subklasse an.

1. Ausführungsbeispiel

Selektion des Hybridoms H-BL-TP 3

Zunächst werden nach dem bekannten Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation Lymphozyten aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert. Durch Passage über Nylonwolle und E-Rosettenbildung werden daraus T-Lymphozyten präpariert.

Mit diesen humanen T-Lymphozyten werden 8 Wochen alte weibliche BALB/c - Mäuse immunisiert. Die Immunisierung erfolgt durch mehrmalige Gabe des Antigens.

Vier Tage nach der letzten Immunisierung wird die Milz entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt.

Die B-Lymphozyten dieses Zellgemisches werden mit Maus-B-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) gehalten.

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.

Die Selektion der Hybridome erfolgt in der Weise, daß die Zellen unmittelbar nach der Fusion in 576 separate 200 µl - Kulturen aufgeteilt werden. Die Überstände der aufwachsenden Hybridzellen enthaltenden Kulturen werden auf die Anwesenheit von Antikörpern getestet, die nur mit Zelloberflächenantigenen von humanen T-Lymphozyten reagieren. Hierzu werden alle Kulturüberstände, die mit humanen Blutlymphozyten reagieren, mit B-Lympho-

zyten, die durch Eliminierung der T-Zellen durch E-Rosettentechnik und/oder Nylonwolleseparation gewonnen werden, getestet. Nur diejenigen Kulturen werden weiter verwendet, deren Antikörper nicht mit B-Lymphozyten, wohl aber mit der großen Mehrheit der Blutlymphozyten und allen über Nylonwolle separierten T-Lymphozyten reagieren. Die Testung der Kulturüberstände mit den entsprechenden Zellen erfolgt mittels indirekter Immunfluoreszenz.

So selektierte Kulturen müssen ab dieser Stufe jedoch auf jeden Fall mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik überprüft werden. Durch die Anwendung der indirekten Immunfluoreszenztechnik wird ausgeschlossen, daß Hybridome weitergezogen werden, deren Antikörper mit B-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten reagieren.

Unter den in solcher Art vorselektierten Hybridomen werden nun solche Klone gesucht, deren Antikörper nach Bindung an Lymphozyten und Entwicklung mit FITC-markiertem Anti-Mausimmunglobulin und nachfolgender Zugabe von TRITC-markiertem Anti-Pan-B-Zellen - Antikörper keine Doppelmarkierung von Zellen ergeben. Als Pan-B-Zell - Antikörper können eingesetzt werden: BL-B 22 oder BL-B 20.

In einem weiteren Selektionsschritt wird durch Doppelmarkierung mit einem TRITC-markiertem Anti-Pan-T-Zell-Antikörper nachgeprüft, daß alle durch diesen Pan-T-Zell - Antikörper markierten Lymphozyten auch durch den Hybridomüberstand markiert werden. Als Pan-T-Zell - Antikörper eignet sich besonders TRITC-BL-T/Rec.

Unter den so selektierten Hybridomen werden dann nur die weitergezogen, deren monoklonale Antikörper mit einem etablierten CD 3 - Antikörper komodulieren.

In einem anschließendem Selektionsschritt werden davon alle die Hybridome weiterkultiviert, deren Antikörper humane T-Lymphozyten nach indirekter Markierung ausreichend stark anfärben, so daß die monoklonalen Antikörper sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Analyse in durchflußzytometrischen Verfahren, wie z.B. der Analyse mit einem fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACS 440), eingesetzt werden können.

In einem weiteren Selektionsschritt werden die selektierten Hybridome überprüft, ob sie sich für die Markierung von antigenträgenden Zellen in Kryostatschnitten lymphoider Gewebe (Tonsille, Lymphknoten und Thymus) eignen und daß sie keine

Nebenreaktion mit anderen Geweben, besonders mit Haut und Bindegewebe, aufweisen.

In einem weiteren Selektionsschritt werden dann nur Hybridome weitergezogen, deren monoklonale Antikörper von den Membranen der T-Lymphozyten ein Antigen isolieren, welches ein apparentes Molekulargewicht von ca. 20 kDa, auch nach Deglykosylierung durch Endo-F, besitzt.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes werden die Oberflächenproteine von nativen humanen T-Lymphozyten nach der Laktoperoxidase-methode radioiodiert (125-Iod). Die Triton X-100 - Lysate solcher markierten T-Zellen werden mit den zu untersuchenden Hybridomüberständen inkubiert und anschließend diese Mausantikörper durch Zugabe von Anti-Mausimmunglobulin-Serum präzipitiert.

Die von unspezifischen Komponenten freigewaschenen Präzipitate werden in Natriumdodecylsulfat-Puffer aufgelöst und anschließend einer NDS-Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen (10 %) unterzogen. An Hand von Referenzproteinen wird das apparente Molekulargewicht der radioiodierten, durch den entsprechenden monoklonalen Antikörper spezifisch abgetrennten T-Zellantigene bestimmt. Es werden solche Hybridome ausgewählt, deren monoklonale Antikörper mit Zelloberflächenantigenen von humanen T-Zellen reagieren, die im reduzierten Zustand ein apparentes Molekulargewicht von 20 kDa, auch nach Endo-F - Behandlung, aufweisen.

Die durch eine derartige Selektion erhaltenen Hybridome werden rekloniert und hochproduktive Subklone selektiert, die die gewünschten monoklonalen Antikörper stabil sezernieren. Die so erhaltenen Hybridome werden als H-BL-TP 3 bezeichnet.

Die Herstellung des monoklonalen Antikörpers BL-TP 3 basiert auf einem Verfahren, welches auf die *In-vitro*- oder *In-vivo*-Kultur des Hybridoms H-BL-TP 3 ausgerichtet ist.

2. Ausführungsbeispiel

Gewinnung des monoklonalen Antikörpers BL-TP 3

2×10^6 Zellen des auf flüssigem Stickstoff gelagerter Hybridoms H-BL-TP 3 werden aufgetaut und nach zweimaliger Waschung in 4 ml

1 RPMI 1640 - Zellkulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum aufgenommen. Davon werden vier separate 1 ml - Kulturen in Gewebekulturplatten aus Polystyren angelegt.

Nach Vermehrung der Zellen werden davon sukzessiv 5 ml - , 20 ml - und 50 ml - Kulturen in Gewebekulturflaschen angelegt.

Die zellfreien Kulturüberstände der in ausreichender Dichte und Zeitdauer kultivierten Hybridomzellen enthalten den monoklonalen Antikörper BL-TP 3. Der monoklonale Antikörper kann nach einem üblichen Verfahren isoliert oder angereichert werden.

Tabelle 1

Reaktionsmuster des monoklonalen Antikörpers BL-TP 3 mit
humanen Blutzellen und Zellen aus lymphoiden Organen

Zelltyp	Markierte Zellen [%]
PBL	73 +/- 6
T-Lymphozyten	100
B-Lymphozyten	< 3
LGL (NK)	< 5
Monozyten	0
Granulozyten	0
Erythrozyten	0
Lymphoblasten (PHA-stim.)	> 90
Lymphoblasten (Con A-stim.)	> 90
Thymozyten	32 +/- 5
Tonsillenlymphozyten	41 +/- 9

Bindungsmuster des monoklonalen Antikörpers BL-TP 3 mit
permanent wachsenden humanen Zell-Linien

Zell-Linie	Reaktion des mAK BL-TP 3 mit den Zellen
T-Zellen:	
CEM	+
MOLT-3	-
MOLT-4	-
JURKAT	+
HSB-2	-
SKW-3	-
T-Zellklone (IL 2 abhängig):	
AK-15	+++
KT-2	+++
B-Zellen:	
REH	-
RAJI	-
IM-09	-
GM-607	-
HMy-2	-
Myeloide Linie:	
U-937	-
Erythroide Linie:	
K-562	-
Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz:	
+++; 100 % stark markiert	
++, 100 % schwach markiert	
+; < 100 > 25 %	
+/-; < 25 %	
-; unmarkiert	

Tabelle 3

Charakteristika des monoklonalen Antikörpers BL-TP 3

Isotyp	IgG1
Antigen	p 20; Epsilon-Kette des CD3
Modulation des CD 3/TCR	ja
Komodulation mit CD 3 - mAk	ja
Komodulation mit BL-TRec/1	ja
Eignung für	
Immunzytologie	sehr gut
Durchflußzytometrie	sehr gut
Immunhistologie	sehr gut
Eignung zur Markierung	
FITC	sehr gut
TRITC	sehr gut
Biotin	sehr gut
