

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 154566 B



(21) Patentansøgning nr.: 3948/80

(51) Int.Cl.⁴ C 07 K 15/06

(22) Indleveringsdag: 17 sep 1980

C 12 P 21/00

(41) Alm. tilgængelig: 19 mar 1981

(44) Fremlagt: 28 nov 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 18 sep 1979 US 76642 09 okt 1979 US 82515

(71) Ansøger: *ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION; U.S. Route No. 202; Raritan, New Jersey, US

(72) Opfinder: Patrick Chung-Shu *Kung; US, Gideon *Goldstein; US

(74) Fuldmægtig: Th. Ostenfeld Patentbureau A/S

(54) Monoklonalt antistof og fremgangsmåde til fremstilling heraf

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3948-80

En hybrid celle-linie til fremstilling af monoklont antistof for et antigen, som findes på normale humane cytotoxiske og suppressor T-celler, dannes ved fusionering af splenocyter fra mus, eksempelvis CAF₁-mus, der er immuniserede med normale humane thymocyter, med celler fra en muse-myeloma-linie, eksempelvis P3X63Ag8U1-myeloma-celler.

Antistoffet reagerer med mere end 90% af cytotoxiske og suppressor TH₂⁺ T-celler (ca. 20-30% af alle normale humane perifere T-celler), men ikke med normale humane perifere B-celler, nul-celler eller makrofager.

Det reagerer med ca. 80% af normale humane thymocyter.

Det reagerer ikke med TH₂⁻ T-celler eller OKT4⁺ T-celler, men reagerer med ca. 68% af OKT4⁻ T-celler.

Det definerer en T-celle population (OKT5⁺), som er stærkt cytotoxisk og som er lavere end normale niveauer i primær galdecirrose, dissemineret sclerose og hyper-IgE, normale niveauer i alle stadier af Hodgkins sygdom og højere end normale niveauer i type I erhvervet agammaglobulinæmia og akut infektiøs mononukleose.

Det monoklone antistof kan anvendes til diagnostiske og terapeutiske formål.

DK 154566 B

Den foreliggende opfindelse angår et monoklonalt antistof og en fremgangsmåde til fremstilling heraf.

Fusionen af muse-myeloma-celler til milt-celler fra immuniserede mus af Kohler og Milstein i 1975 (Nature 256, 495-497 (1975)) viste for første gang, at det var muligt at opnå en kontinuert celle-linie, der fremstiller homogent (såkaldt "monoklonalt") antistof. Siden dette grundlæggende arbejde har der været udfoldet store anstrengelser på at fremstille forskellige hybride celler (kaldet "hybridomas") og på at anvende det ved hjælp af disse hybridomas fremstillede antistof til forskellige videnskabelige undersøgelser. Der henvises fx. til Current Topics in Microbiology and Immunology, bind 81 - "Lymphocyte Hybridomas", F. Melchers, M. Potter og N. Warner, Editors, Springer-Verlag, 1978 og de deri angivne referencer, C.J. Barnstable, et al., Cell, 14, 9-20 (maj 1978), P. Parham og W.F. Bodmer, Nature 276, 397-399 (november 1978), Handbook of Experimental Immunology, 3. udgave, bind 2, D.M. Wier, Editor, Blackwell, 1978, kapitel 25, og Chemical and Engineering News, 1. januar 1979, 15-17. Disse referencer indikerer samtidig belønningerne og komplikationerne ved at forsøge at fremstille monoklonalt antistof ud fra hybridomas. Selvom den almene teknik forstås principielt godt, mødes mange vanskeligheder og variationer kræves for hvert specifikt tilfælde. I virkeligheden er der ingen sikkerhed, forud for forsøget på at fremstille et givet hybridoma, for at det ønskede hybridoma vil blive opnået, at det, hvis opnået, vil producere antistof eller at det således fremstillede antistof vil have den ønskede specificitet. Graden af success påvirkes principalt af den anvendte antigen-type og den til isolering af det ønskede hybridoma anvendte udvælgelsesteknik.

Den tilstræbte fremstilling af monoklonalt antistof for humane lymfocyt celle-overflade antigener er kun blevet rapporteret i nogle få tilfælde. Se fx. Current Topics in Microbiology and Immunology, ibid, 66-69 og 164-169 og nedenfor. De i disse rapporterede forsøg anvendte antigener var dyrkede humane lymfoblastoide leukæmia og humane kroniske lymfocytiske leukæmia celle-linier. Mange opnåede hybridomas syntes at danne antistof over for forskellige antigener på alle humane celler. Ingen af disse hybridomas dannede antistof over for en forud defineret klasse af humane lymfocytter.

Det bør forstås, at der findes to principielle klasser af lymfocytter, som er involveret i immunsystemet hos mennesker og dyr. Den

første af disse (den thymusafledte celle eller T-celle) differentieres i thymus fra hæmopoietiske stam-celler. Mens de befinder sig i thymus, kaldes de differentierende celler for "thymocyter". De modne T-celler forlader thymus og cirkulerer mellem væv, lymfekar og blodbaner. Disse
5 T-celler udgør en stor andel af mængden af recirkulerende små lymfocyter. De har immunologisk specificitet og er direkte involveret i cellemedierede immun-reaktioner (såsom transplantationsafvisning) som effektor-celler. Selvom T-celler ikke sekreterer humorale antistoffer, kræves de under tiden for udskillelsen af disse antistoffer af den
10 nedenfor omtalte anden klasse af lymfocyter. Nogle typer af T-celler har en regulerende funktion ved andre aspekter af immun-systemet. Mekanismen for denne proces ved celle-samvirke forstås endnu ikke fuldt ud.

Den anden klasse af lymfocyter (de benmarvs-afledte celler eller B-celler) er de som udskiller antistof. De dannes også fra hæmopoietiske
15 stam-celler, men deres differentiering bestemmes ikke af thymus. I fugle differentieres de i et med thymus analogt organ, kaldet Bursa Fabricii. I pattedyr har man imidlertid ikke oplevet et ækvivalent organ og det antages, at disse B-celler differentierer i benmarven.

Det anerkendes nu, at T-celler kan opdeles i mindst adskillige
20 undertyper, kaldet "hjælpe", "suppressor", og "dræbe" T-celler, der har den funktion (hhv.) at fremme en reaktion, undertrykke en reaktion eller dræbe (lysere) fremmede celler. Disse underklasser forstås godt inden for musefamilien, men er kun for nyligt blevet beskrevet for humane systemer. Se fx. R.L. Evans et al., Journal of Experimental Medicine,
25 bind 145, 221232, 1977 og L. Chess og S.F. Schlossman "Functional Analysis of Distinct Human T-Cell Subsets Bearing Unique Differentiation Antigens", i "Contemporary Topics in Immunobiology", O. Stutman, Editor, Plenum Press, 1977, bind 7, 363379.

Evnen til at identificere klasser eller underklasser af T-celler
30 er vigtig for diagnosen af forskellige immuno-regulatoriske uregelmæssigheder eller tilstande.

Fx. har visse leukæmityper og lymfomas forskellig prognose i afhængighed af, om de er af B-celle eller T-celle oprindelse. Således afhænger vurderingen af sygdomsprognosen af, at man kan skelne mellem
35 disse to klasser af lymfocyter. Se fx. A.C. Aisenberg og J.C. Long, The American Journal of Medicine, 58:300 (marts 1975), D. Belpomme, et al., i "Immunological Diagnosis of Leukemias and Lymphomas", S. Thierfelder, et al., eds, Springer, Heidelberg, 1977, 33-45, og D. Belpomme, et al.,

British Journal of Haematology, 1978, 38, 85.

Visse sygdomstilstande (fx. juvenil rheumatoid arthritis, maligne tilstande og agammaglobulinæmi) hænger sammen med en ubalance af T-celle underklasser. Det er blevet foreslået, at autoimmune sygdomme i
5 almindelighed hænger sammen med et overskud af "hjælpe" T-celler eller mangel på visse "suppressor" T-celler, mens agammaglobulinæmi hænger sammen med et overskud af visse "suppressor" T-celler. I almindelighed hænger maligne tilstande sammen med et overskud af "suppressor" T-celler.

10 I visse leukæmityper produceres overskud af T-celler på et hæmmet udviklingsstade. Diagnosen kan derfor afhænge af muligheden for at påvise sådan ubalance eller overskud. Se. fx. J. Kersey, et al., "Surface Markers Define Human Lymphoid Malignancies with Differing Prognoses" i Haematology and Blood Transfusion, bind 20, Springer-
15 Verlag, 1977, 17-24 og de deri anførte referencer.

Erhvervet agammaglobulæmi, som er en sygdomstilstand, hvor der ikke produceres immunt globulin, omfatter mindst to forskellige typer. I type I skyldes manglen på at producere immunt globulin et overskud af suppressor T-celler, mens den i type II skyldes en mangel på hjælpe T-
20 celler. I begge typer synes der ikke at være nogen defekt eller mangler i patienternes B-celler, lymfocytterne som er ansvarlige for den aktuelle sekretion af antistoffet. Imidlertid er disse B-celler enten undertrykte eller "ikke hjælpe", hvilket fører til stærkt formindsket eller manglende immunglobulin-produktion. Typen af erhvervet agammaglobulinæmi
25 kan således bestemmes ved at teste for et overskud af suppressor T-celler eller et fravær af hjælpe T-celler.

Identifikationen og undertrykkelsen af humane T-celle klasser og underklasser er tidligere sket ved anvendelse af spontane auto-antistoffer eller selektive antisera for humane T-celler opnået ved
30 immunisering af dyr med humane T-celler, tapning af dyrene til opnåelse af serum og adsorption af antiserum med (fx.) autologe, men ikke allogene B-celler til fjernelse af antistoffer med uønskede reaktiviteter. Fremstillingen af disse antisera er særdeles vanskelig, især i adsorptions-og rensningstrinnene. De adsorberede og rensede antisera
35 kan endog indeholde mange urenheder foruden det ønskede antistof, af adskillige grunde. For det første indeholder serum millioner af antistof-molekyler, selv før T-celle-immuniceringen. For det andet bevirker immuniceringen dannelse af antistoffer mod en lang række

antigener, som findes på alle injicerede humane T-celler. Der er ingen selektiv dannelse af antistof over for et enkelt antigen. For det tredje er titeren af specifikt antistof opnået ved sådanne metoder sædvanligvis meget lav (fx. inaktiv ved fortyndinger på mere end 1:100) og forholdet
5 mellem specifikt og non-specifikt antistof er mindre end $1/10^6$, se fx. den ovenfor omtalte artikel af Chess og Schlossman (side 365 og følgende) og den ovenfor omtalte artikel i Chemical and Engineering News, hvor manglerne ved hidtil kendte antisera og fordelene ved monoklonalt antistof er beskrevet.

10 En af de T-celle delmængder, som identificeres ved sådanne hidtil kendte antisera, har fået navnet TH_2^+ delmængden og har vist sig at indeholde både de cytotoxiske effektor-celler for celle-medieret lympholyse og de immuno-regulatoriske suppressor T-celler, som undertrykker både T-celle og B-celle funktion. Denne delmængde indeholder ca.
15 20%-30% humane perifere T-celler. Se fx. artikler af E.L. Reinherz, et al., i J. Immunol. 123:83 (1979) og New Engl. J. Med. 300:1061 (1979).

Det er kendt, jf. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 76, No. 8, side 4061-4065, august 1979, at fremstille et monoklonalt antistof kaldet OKT4 ved hjælp af en hybridomacellelinie. Dette monoklonale antistof
20 OKT4 reagerer med i det væsentlige alle normale humane perifere hjælpe T-celler.

Der er nu fundet en ny hybridomacellelinie, som er i stand til at producere hidtil ukendt monoklonalt antistof kaldet OKT5 over for et antigen, som findes på normale humane perifere cytotoxiske og suppressor
25 TH_2^+ T-celler (ca. 20% af normale humane perifere T-celler). Det således dannede antistof er monospecifikt for en enkelt determinant på normale, humane cytotoxiske og suppressor TH_2^+ T-celler og indeholder i det væsentlige ingen anden antihuman immunglobulin, i modsætning til tidligere kendte antisera (som nødvendigvis er kontamineret med antistof,
30 der er reaktivt over for talrige humane antigener) og til hidtil kendte monoklonale antistoffer (der ikke er monospecifikke for et humant cytotoxisk/suppressor T-celle antigen). Endvidere kan dette hybridoma dyrkes til fremstilling af antistof uden nødvendigheden af at immunisere og dræbe dyr, efterfulgt af de trivielle adsorptions- og rensningstrin,
35 som er nødvendig for at opnå blot de urene antisera ifølge den kendte teknik.

En prøve af den omhandlede hybridomacellelinie deponeredes ved American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville,

MD, 20852 d. 18. september 1979 og 28. september 1979 og har fået tildelt hhv. ATCC accessionsnummer CRL 8013 og CRL 8016.

Det monoklonale antistof ifølge opfindelsen af klasse IgG er i overensstemmelse hermed ejendommeligt ved, at det er identisk med det
5 monoklonale antistof der fremstilles af hybridomacellelinie ATCC nr. CRL 8013 eller 8016, og at det

- a) reagerer med mere end 90% af cytotoxiske suppressor TH_2^+ T-celler (ca. 2030% af alle normale humane perifere T-celler), men ikke med normale humane perifere B-celler,
10 nul-celler eller makrofager,
- b) reagerer med ca. 80% af normale humane thymocyter,
- c) ikke reagerer med TH_2 T-celler eller $OKT4^+$ T-celler, men reagerer med ca. 68% af $OKT4$ T-celler.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af nævnte
15 monoklonale antistof er ejendommelig ved, at man dyrker hybridomacellelinien ATCC nr. CRL 8013 eller 8016 in vitro i et egnet medium eller indfører den intraperitonealt til mus og udvinder antistoffet fra supernatanten fra in vitro dyrkningen eller fra maligne ascites eller serum fra musene.

20 Den omhandlede hidtil ukendte hybridomacellelinie ATCC nr. CRL 8013 eller 8016 er blevet fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Milstein og Kohler. Efter immunisering af mus med normale humane thymocyter, fusioneredes de immuncerede mus' milt-celler med celler fra en muse-myeloma-linie og de resulterende hybridomas
25 mas screenedes for sådanne med supernatanter indeholdende antistof, som gav selektiv binding til normale E-roset positive humane T-celler. De ønskede hybridomas blev derefter klonet og karakteriseret. Som resultat opnåedes hybridomacellelinien ATCC nr. CRL 8013 eller 8016, som danner antistof (kaldet $OKT5$) over for et antigen på normale humane cytotoxiske
30 og suppressor TH_2^+ T-celler. Ikke alene reagerer dette antistof med normale humane perifere cytotoxiske og suppressor TH_2^+ T-celler, men det reagerer heller ikke med andre normale perifere blod-lymfoide celler, inklusive hjælpe T-celler. Endvidere påvises det celle-overfladeantigen, som erkendes af dette antistof, på omkring 80% af normale humane
35 thymocyter.

I betragtning af de anførte vanskeligheder ved den kendte teknik og manglen på succes, som er rapporteret ved anvendelse af maligne cellelinier som antigen, var det selvom hybridomacellelinien er opnået på i

og for sig kendt måde ikke til at forudsige, om det var muligt at til-
vejebringe det ønskede hybridoma. Det skal understreges, at den ufor-
udsigelige natur af hybrid-celle fremstilling ikke gør det muligt at
ekstrapolere fra et antigen eller celledsystem til et andet. Det har
5 endda i forbindelse med den foreliggende opfindelse vist sig, at
anvendelse af en T-celle malign celle-linie som antigen bevirkede
dannelse af hybridomas, som ikke dannede det ønskede antistof. Forsøg
på at anvende rensede antigener adskilt fra celle-overfladerne, var
også uden gunstigt resultat.

10 Fremstillingen og karakteriseringen af det omhandlede hybridoma
og det resulterende antistof vil blive nærmere forklaret i det føl-
gende.

Fremgangsmåden til fremstilling af det omhandlede hybridoma
omfatter følgende trin:

15

A. Man immuniserer mus med normale, humane thymocyter.

B. Miltene fjernes fra de immuniserede mus og der fremstilles
en milt-suspension i et passende medium.

20

C. De suspenderede milt-celler fusioneres med muse-myeloma-
celler fra en passende celle-linie ved anvendelse af en
passende fusionspromoter.

25

D. Man fortynder og dyrker i separate beholdere blandingen
af ufusionerede milt-celler, ufusionerede myeloma-celler og
fusionerede celler i et selektivt medium, som ikke nærer
de ufusionerede myeloma-celler i et tidsrum, som er til-
strækkelig til at de ufusionerede celler dør.

30

E. Man vurderer supernatanten i hver beholder (fordybning),
som indeholder et hybridoma, for tilstedeværelsen af anti-
stof mod E-roset positive rensede humane T-celler.

35

F. Man udvælger (fx. ved begrænsningsfortynding) og kloner
hybridomas, som producerer det ønskede antistof.

Det monoklonale antistof kan produceres på én af to måder. Det reneste monoklonale antistof dannes ved in vitro dyrkning af det omhandlede hybridoma i et egnet medium i et passende tidsrum efterfulgt af udvinding af det ønskede antistof fra supernatanten. Det egnede medium og den egnede dyrkningstid kendes eller kan let bestemmes. Denne in vitro metode danner i det væsentlige monospecifikt monoklonalt antistof, der er i det væsentlige frit for andet specifikt antihuman immun-globulin. Der er en lille smule andet immun-globulin til stede eftersom mediet indeholder xenogent serum (fx. foetalt kalveserum). Denne in vitro metode kan imidlertid ikke producere en tilstrækkelig mængde eller koncentration af antistof til visse formål, eftersom koncentrationen af monoklonalt antistof kun er ca. 50 µg/ml.

Til fremstilling af en meget større koncentration af en smule mindre rent monoklonalt antistof kan det omhandlede hybridoma injiceres i mus, fortrinsvis syngeniske eller semi-syngeniske mus. Hybridomaet vil bevirke dannelse af antistof-producerende tumorer efter en passende inkubationstid, som vil resultere i en høj koncentration af det ønskede antistof (ca. 5-20 mg/ml) i blodbanerne og peritonealt exudat (ascites) hos værtsmusene. Selvom disse værtsmus også har normale antistoffer i deres blod og ascites, er koncentrationen af disse normale antistoffer kun ca. 5% af den monoklonale antistof-koncentration. Da disse normale antistoffer endvidere er ikke antihumane med hensyn til deres specificitet, er det fra udvundet ascites eller fra serum opnåede monoklonale antistof i det væsentlige fri for noget forurenende antihumant immun-globulin. Dette monoklonale antistof har høj titer (aktiv ved fortyndinger på 1:50.000 eller mere) og højt forhold mellem specifikt og non-specifikt immun-globulin (ca. 1/20). Immun-globulin produceret under inkorporering af de såkaldte "κ light" myeloma-kæder er non-specifikke "nonsens" peptider, som blot fortynder det monoklonale antistof uden at nedsætte dets specificitet.

Eksempel 1

Fremstilling af monoklonale antistoffer

35 A. Immunisering og somatisk celle-hybridisering

CAF₁-mus af hunkøn (Jackson Laboratories, 6-8 uger gamle) immuniseredes intraperitonealt med 2×10^7 humane thymocyter i 0,2 ml fosfat-forpufret saltopløsning med 14 dages intervaller. Fire dage

efter den tredje immunicering fjernedes miltet fra musene og en enkelt celle-suspension fremstilledes ved at presse vævet gennem et rustfrit stålnet.

Celle-fusion foretoges iht. den af Kohler og Milstein udviklede metode. 1×10^8 splenocyter fusioneredes i 0,5 ml fusionsmedium indeholdende 35% polyethylenglycol (PEG 1000) og 5% dimethylsulfoxid i "RPMI 1640" medium (Gibco, Grand Island, NY) med 2×10^7 P3X63Ag8U1 myeloma-celler leveret af Dr. M. Scharff, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY. Disse myeloma-celler sekretorer IgG₁ κ light kæder.

B. Udvalgelse og vækst af hybridoma

Efter celle-fusion dyrkedes celler i HAT medium (hypoxanthin, aminopterin og thymidin) ved 37°C med 5% CO₂ i en fugtig atmosfære. Adskillige uger senere tilsattes 40 til 100 μ l supernatant fra kulturer indeholdende hybridomas til en tablet af 10^6 perifere lymfocytter adskilt i E-roset positive (E⁺) og E-roset negative (E⁻) populationer, som var fremstillet ud fra blod af sunde humane donorer som beskrevet af Mendes (J. Immunol. III:860, 1973). Påvisning af muse-hybridoma-antistoffer, som binder til disse celler, bestemtes ved indirekte immunofluorescens. Celler inkuberet med dyrknings-supernatenter stænkedes med et fluoresceret gede-anti-muse IgG (G/M FITC) (Melo Laboratory, Springfield, VA, F/p = 2,5) og de fluorescerende antistof-belagte celler analyseredes dernæst på cytofluorograf "FC200/4800A" (Ortho Instruments, Westwood, MA) som beskrevet i eksempel 2. Hybridoma-kulturer indeholdende antistoffer, der reagerede specifikt med E⁺ lymfocytter (T-celler) udvalgte og klonedes to gange ved begrænsnings-fortyndingsmetoder i nærværelse af føde-celler. Derefter overførtes klonerne intraperitonealt ved injektion af 1×10^7 celler af en given klon (0,2 ml volumen) i CAF₁-mus, der var forbehandlet med 2,6,10,14-tetramethylpentadecan leveret af Aldrich Chemical Company under navnet "Pristine". De maligne ascites fra disse mus anvendtes dernæst til karakterisering af lymfocytter som beskrevet nedenfor i eksempel 2. Det pågældende hybrid-antistof OKT5 blev ved standardteknik påvist at være af IgG₁ underklasse.

Eksempel 2Karakterisering af OKT5 reaktivitetA. Isolering af lymfocyt-populationer

- 5 Humane perifere blod-mononukleære celler isoleredes fra raske frivillige donorer (alder 15-40) ved hjælp af "Ficoll-Hypaque" densitets-gradient-centrifugering (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) efterfulgt af teknikken beskrevet af Boyum i Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97):77, (1968). Ufraktionerede mononukleære
- 10 re celler opdeltes i overflade Ig^+ (B) og Ig^- (T plus nul) populationer ved hjælp af "Sephadex G-200" anti-F(ab')₂ søjlekromatografi som tidligere beskrevet af Chess, et al., J. Immunol. 113:1113 (1974). T-celler blev vundet ved E-rosetting af Ig^- populationen med 5% fåre-erythrocyter (Microbiological Associates, Bethesda, MD).
- 15 Den rosetterede blanding lagdeltes over Picoll-Hypaque og den vundne E^+ -tablet behandlet med 0,155M NH_4Cl (10 ml per 10^8 celler). Den således opnåede T-celle population var mindre end 2% EAC-roset positiv og mere end 95% E-roset positiv bestemt ved standardmetoder. Endvidere blev den non-rosetterende Ig^- (nul-celle) population ud-
- 20 vundet fra Ficoll-interfladen. Denne sidstnævnte population var mindre end 5% E^+ og mindre end eller lig 2% s Ig^+ . Overflade Ig^+ (B) populationen opnåedes fra "Sephadex G-200" kolonnen efter eluering med normal human gamma-globulin som tidligere beskrevet. Denne population var mere end 95% overflade Ig^+ og mindre end 5% E^+ .
- 25 Normale humane makrofager opnåedes fra den mononukleære population ved vedhæftning til polystyren. Således resuspenderedes mononukleære celler i slut-kulturmedier (RPMI 1640, 2,5 mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinpropan-sulfonsyre] puffer, 0,5% natriumbicarbonat, 200 mM L-glutamin og 1% penicillin-streptomycin,
- 30 tilsat 20% varme-inaktiveret humant AB serum) ved en koncentration på 2×10^6 celler og inkuberedes i formstof-petriskåle (100 x 20 mm) (Falcon Tissue Culture Dish, Falcon, Oxnard, CA) ved 37°C natten over. Efter grundig udvaskning til fjernelse af ikke vedhæftende celler, frigjordes den vedhæftende population ved rigelig udvaskning
- 35 med koldt serum-frit medium indeholdende 2,5 mM EDTA og lejlighedsvis skrabning med gummi-spidsen af stemplet for en éngangs-sprøjte. Mere end 85% af celle-populationen var i stand til at indtage latex-partikler og havde monocytes-morfologiske egenskaber ved

Wright-Giemsa pletning.

B. Isolering af thymocyter

Normal human thymus-kirtel opnåedes fra patienter med en alder
5 mellem 2 måneder og 14 år, som var under korrektiv kardial-kirurgi.
Frisk opnåede portioner af thymus-kirtlen anbragtes straks i 5% foe-
talt kalve-serum i medium "199" (Gibco) fint parteret med forceps
og saks, og tildannedes derefter til enkeltcelle-suspensioner ved
presning gennem trådnæt. Cellerne lagdeltes dernæst over Ficoll-
10 Hypaque og spunnet og vasket som beskrevet i afsnit A ovenfor.
De således opnåede thymocyter var mere end 95% levende og mere
end eller lig 90% E-roset positiv.

15 C. Celle-linie

En Epstein-Barr Virus (EBV) transformeret B-celle-linie fra et
normalt individ (Laz 156) leveredes af Dr. H. Lazarus, Sidney
Farber Institute, Boston, MA.

20 Cytofluorografisk analyse og celledeling

Cytofluorografisk analyse af monoklonale antistoffer med alle cel-
le-populationer foretoges ved indirekte immunofluorescens med fluo-
rescein-konjugeret gede-anti-muse IgG (G/M FITC) (Meloy Laborato-
ries) under anvendelse af en cytofluorograf "FC200/4800A" (Ortho
25 Instruments). I korte træk behandledes 1×10^6 celler med 0,15 ml
OKT5 ved 1:500 fortynding, inkuberedes ved 4°C i 30 minutter og
vaskedes to gange. Cellerne reagerede dernæst med 0,15 ml af en
1:40 fortynding G/M FITC ved 4°C i 30 minutter, centrifugeredes
og vaskedes 3 gange. Celler analyseredes dernæst på cytofluorogra-
30 fen og fluorescens-intensiteten per celle registreredes på en impuls-
højde-analysator. Et tilsvarende reaktivitetsmønster iagttoges ved en
fortynding på 1:10.000, men yderligere fortynding bevirkede tab af
reaktivitet. Baggrundspletning opnåedes ved at substituere en 0,15
ml portion 1:500 ascites fra en CAF₁ mus, der var intraperitonealt
35 injiceret med en non-producerende hybrid klon. Reaktivitet af lymfo-
ide populationer med heste-anti-TH₂ og normalt heste-IgG bestemtes
som tidligere beskrevet i de ovenfor nævnte artikler af Reinherz,
et.al.

I forsøg, der var udformet til at skille T-celle delmængder, mærkedes 100×10^6 ufraktionerede T-celler med 4 ml af en 1:500 fortynding af OKT4 eller OKT5 og udvikledes med G/M FITC. OKT4 havde tidligere vist sig at være reaktiv især med 55-60% af perifere blod T-lymphocytter, som repræsenterer de humane hjælpe delmængder. Under anvendelse af fluorescens-aktiveret celle-sorterer (FACS-I) (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) deltes T-celler i $OKT4^+$ og $OKT4^-$ delmængder samt $OKT5^+$ og $OKT5^-$ delmængder fra det samme individ. Levedygtigheden efter sortering var mere end 95% ved Trypan-blå eksklusion i alle tilfælde. Renheden af alle separerede populationer var mere end eller lig 95%.

Analyse af T-celle delmængder med heste anti- TH_2

På lignende måde som ovenfor anvendtes heste anti- TH_2 til separering af TH_2^+ og TH_2^- T-celler på FACS ved at mærke 60×10^6 ufraktionerede T-celler med 0,12 ml heste anti- TH_2 og 0,1 ml R/H FITC (Cappel Laboratories, Downington, PA) som tidligere beskrevet af Reinherz, et.al. Renhed og levedygtighed af sorterede celler lignede de ovenfor beskrevne sorterede populationer. FACS-sorterede T-celle delmængder isoleret med heste anti- TH_2 , OKT4 eller OKT5 anbragtes i kultur i 48 timer ved $37^{\circ}C$ i 5% CO_2 fugtig atmosfære med RPMI 1640 indeholdende 20% humant AB-serum, 1% penicillin-streptomycin, 200 mM L-glutamin, 25 mM HEPES puffer (Microbiological Associates) og 0,5% natriumbicarbonat. Disse kultiverede celler analyseredes dernæst som ovenfor beskrevet på Cytofluorografen. Baggrunds-pletning bestemtes ved substituering af normal heste IgG for specifikt antistof og pletning som ovenfor.

Funktionelle studier

30

A. Formeringsstudier

Den mitogene reaktion af 10^5 useparerede og FACS-fraktionerede T-lymfocytter testedes i mikrokultur for optimale doser af Concanavalin A (Con A) (Calbiochem, La Jolla, CA) og fytohæmagglutinin (PHA) (Burroghs-Wellcome Company, Greenville, NC). Alloantigen proliferativ reaktion målt samtidig for disse samme populationer med mitomycin-behandlet Laz 156, en EBV-transformeret human B lymfoblastoid cellelinie stimulus. Proliferering med tetanus-toxoid (Massachusetts

Department of Public Health Biological Laboratories, Boston, MA) og fåresyge-antigen (Microbiological Associates) testedes under anvendelse af hhv. en 10 µg/ml slutkoncentration og en 1:20 fortynding. 5% makrofager opnået på den ovenfor beskrevne måde sættes til alle

5 populationer ved initieringen af in vitro kulturer. Mitogen-stimulerede kulturer impulseredes efter 4 dage med 0,2 µCi af ³H-thymidin (³H-TdR; 1,9 Ci/mM specifik aktivitet) (Schwarz-Mann, Division of Becton, Dickinson, Orangeburg, NY) og udvalgte 18 timer senere på et "MASH II" apparat (Microbiological Associates). ³H-TdR inkorporering målt på en

10 "Packard Scintillation Counter" (Packard Instrument Company, Downer's Grove, IL). Baggrunds ³H-TdR-inkorporation opnåedes ved at substituere medium for mitogen. Opløselige og celle-overflade alloantigen kulturer impulseredes efter 5 dage med ³H-TdR i 18 timer, udvandedes og taltes som beskrevet ovenfor.

15

B. Cytotoxiske studier

Sensitiviseringskulturer for celle-medieret lymfolyse (CML) etableredes ved at anbringe ufraktionerede T-celler med mitomycin-behandlede stimulator-celler, alle med 2×10^6 celler per ml, i et antal

20 mikrotiter plade-fordybninger. Efter 5 dages forløb fraktioneredes de ufraktionerede T-celler i OKT5⁺ og OKT5⁻ T-celle delmængder på FACS. Disse T-celle delmængder sættes dernæst til ⁵¹Cr natriumchromat-mærkede angrebsceller og specifik cytotoxicitet bestemtes efter 6 timers celle-inkubation. Den procentuelle cytotoxicitet bestemtes ved hjælp af

25 følgende formel:

$$\frac{\frac{^{51}\text{Cr frigjort ved forsøg}}{^{51}\text{Cr frigjort ved frysetørring}} - \frac{^{51}\text{Cr frigjort spontant}}{^{51}\text{Cr frigjort spontant}}}{\frac{^{51}\text{Cr frigjort spontant}}{^{51}\text{Cr frigjort spontant}}} \times 100$$

30 Alle prøver foretoges in triplo og resultaterne udtryktes som gennemsnit ± standard afvigelse.

C. Con A aktivering af suppressor celler og undertrykkelse af MLC

Ufraktionerede T-celler aktiveredes med 20 µg Concanavalin A

35 (Con A) (Calbiochem) per 10^6 celler. Disse Con A behandlede celler dyrkedes opret i vævskulturkolber med et overfladeareal på 25 cm² (Falcon, Oxnard, CA) i RPMI 1640 (Grand Island Biological Company) indeholdende 20% humant AB-serum, 1% penicillin-streptomycin, 200 mM

- L-glutamin, 25 mM HEPES puffer (Microbiological Associates) og 0,5% natriumbicarbonat i 48 timer ved 37°C i en fugtig atmosfære indeholdende 5% CO₂. Ubehandlede kontrol T-celler dyrkedes på identisk måde, men uden Con A. Dernæst centrifugeredes cellerne, vaskedes fem gange og sættes
- 5 til friske autologe responder-celler i envejs-blandet lymfocytkultur (MLC) som ovenfor beskrevet. I undertrykkelses-forsøg tilvejebragtes envejs-MLC'er i mikrotiter-plader med rund bund (Linbro Chemical Company, New Haven, CT) og tredobbelte fordybninger, som hver indeholdt 0,05 x 10⁶ responder-lymfocytter (hele mononukleære), 0,05 x 10⁶ enten
- 10 uaktiverede eller Con A aktiverede autologe ufraktionerede eller fraktionerede T-celler og 0,1 x 10⁶ mitomycin-behandlede stimulerede celler (Laz 156). Efter fem dage impulsbehandlede kulturer med 0,2 µCi af ³H-TdR og udvandedes efter 18 timer som ovenfor beskrevet. Inhibering i procent af MLC-formering beregnedes dernæst under anvendelse af
- 15 formlen:

$$\text{inhibering \%} = \left(1 - \frac{\text{cpm Con A}^+}{\text{cpm}} \right) \times 100$$

- 20 hvori cpm Con A⁺ betegner resultaterne af ³H-TdR inkorporering i MLC, når der tilsættes Con A aktiverede autologe T-celler eller T-celle delmængder, og hvori cpm betegner resultater, når der tilsættes uaktiverede autologe T-celler.

Der henvises i det følgende til tegningen.

- 25 Figur 1 viser det på cytofluorografen opnåede fluorescens-mønster efter reaktion af normale humane, perifere T-celler, B-celler, nøj-celler og makrofager med OKT5 ved 1:1000 fortynding og G/M FITC i den øvre række. Til sammenligning er resultater med heste anti-TH₂ vist i den nedre række.
- 30 Figur 2 viser det på cytofluorografen opnåede fluorescens-mønster efter reaktion af humane thymocyter med OKT5 og G/M FITC(A) og med heste anti-TH₂(B).
- Figur 3 viser det på cytofluorografen opnåede fluorescens-mønster efter reaktion af heste anti-TH₂ separerede T-celle mængder med OKT5.
- 35 Figur 4 viser det på cytofluorografen opnåede fluorescens-mønster efter reaktion af OKT4 separerede T-celle delmængder med OKT5.
- Figur 5 viser den cytotoxiske kapacitet af ufraktionerede T-celler og T-celle delmængder separeret med OKT5 efter allo-sensibilisering i

MLC.

Som vist i den øvre række i figur 1 er omtrentlig 20% af den humane perifere blod T-celle population hos et givet normalt individ reaktiv med OKT5, mens hele mængden af B-celle, nul-celle og makrofag populationer isoleret fra samme individ, er ureaktive med OKT5. På tilsvarende måde reagerer heste anti-TH₂ med 24% af perifere T-celler og er også ureaktiv med B-celler, nul-celler og makrofager. Det monoklonale antistof er derfor karakteriseret ved, at det er reaktivt med et antigen indeholdt på overfladen af ca. 20% af normale humane perifere T-celler, men ureaktivt med alle antigener på overfladen af de tre andre ovenfor omtalte celle-typer. Som det vil blive omtalt nedenfor, er OKT5⁺-andelen af den humane perifere T-celle inkluderet i den cytotoxiske og suppressor T-celle delmængde. Denne differentielle reaktivitet udgør én test ved hjælp af hvilken det omhandlede antistof OKT5 kan påvises og skelnes fra andre antistoffer.

Som vist i figur 2, er omkring 80% af normale humane thymocyter fra et 6 måneder gammelt barn reaktive med OKT5. Tilsvarende resultater (ca. 80% reaktivitet) opnåedes ved anvendelse af yderligere thymus-prøver fra normale individer af en alder på to måneder til 19 år. Denne værdi er den samme som for heste anti-TH₂. Reaktivitetsmønsteret i figur 2 tilvejebringer en anden metode til påvisning af det omhandlede antistof OKT5 og til at skelne det fra andre antistoffer.

Som vist i figur 3 reagerer det pågældende antistof med TH₂⁺, men ikke med TH₂⁻ T-celler. Ca. 5-10% af TH₂⁺ delmængden reagerede ikke med OKT5. Reaktivitetsmønsteret i figur 3 tilvejebringer en tredje metode til påvisning af det pågældende antistof OKT5 og til at skelne det fra andre antistoffer.

Som vist i figur 4 reagerer OKT4⁺ T-celle delmængden overhovedet ikke med OKT5. I modsætning hertil er OKT4⁻ T-celle delmængden hovedsagelig OKT5⁺ (6.800 ud af 10.000 testede celler). Disse resultater viser, at OKT5⁺ delmængden af T-celler, ligesom den tidligere bestemte TH₂⁺ delmængde, er reciprok og forskellig fra OKT4⁺ delmængden. Mens OKT4⁺ delmængden indeholder hjælpe T-cellerne, indeholder OKT5⁺ delmængden (ligesom TH₂⁺ delmængden) cytotoxiske og suppressor T-celler. Dette reaktivitetsmønster i figur 4 giver en yderligere metode til bestemmelse af OKT5 antistof og til at skelne det fra andre antistoffer.

Figur 5 viser, at OKT5⁺ T-celle delmængden har indflydelse på CML. Graden af lysis, som medieres ved denne population, er større end den,

som medieres ved den ufraktionerede T-celle population. I modsætning hertil er OKT5⁻ T-celle populationen minimalt lytisk. Efter aktivering i MLC over for Laz 156 separeredes de ufraktionerede T-celler i OKT5⁺ og OKT5⁻ delmængder. Både ufraktionerede og fraktionerede T-celler

5 analyseredes i CML over for ⁵¹Cr mærkede Laz 156 mål ved forskellige effektor:mål (E:T) forhold. OKT5⁺ T-celle delmængderne indeholdt effektor-populationen i celle-medieret lymfolyse. Ved et E:T forhold på 5:1, 10:1 og 20:1 tilvejebragte OKT5⁺ T-celle populationen hhv. 40%, 58% og 77% specifik lysis. Den lytiske kapacitet af den isolerede OKT5⁺

10 delmængde var betydeligt højere end den ufraktionerede T-celle populations. Ydermere tilvejebragte OKT5⁻ T-celle populationen betydeligt mindre lysis ved de testede E:T forhold. Ser man på den tidligere iagttagelse, at TH₂⁺ T-celle delmængden i mennesket tilvejebringer CML, vil de foreliggende resultater støtte den antagelse, at

15 TH₂⁺ og OKT5⁺ T-celle delmængderne definerer lignende populationer af funktionelt aktive T-lymfocytter. Denne differentielle cytotoxiske kapacitet giver endnu en metode til bestemmelse af OKT5 antistof og til at skelne det fra andre antistoffer.

Funktionelle studier foretoges på lymfoide populationer, som var

20 blevet adskilt på en fluorescens-aktiveret celle-separator (FACS). Resultaterne af disse studier er vist i tabel (I) til (III) nedenfor og giver yderligere basis for den tidligere beskrevne karakterisering af det pågældende monoklonale antistof.

Ved disse studier behandledes en ufraktioneret T-celle population

25 med en 1:500 fortynding af OKT5 og G/M FITC og separeredes på FACS i OKT5⁺ og OKT5⁻ delmængder. Med renheden af de opnåede populationer givet (mere end eller lig 95%) sættes 5% makrofager til de separerede populationer før dyrkning in vitro. Den ufraktionerede T-celle population og de isolerede OKT5⁺ og OKT5⁻ T-celle delmængder

30 stimuleredes dernæst med PHA, Con A, opløselige antigener og allo-antigener til bestemmelse af deres in vitro formeringsreaktioner.

Formeringsreaktionen af de ufraktionerede T-celle populationer på PHA og Con A er vist i tabel (I). En maksimal formeringsreaktion hos den ufraktionerede T-celle population opnås med 1 µg per 10⁶

35 celler med formindskede reaktioner ved 0,5 µg og 0,1 µg PHA per 10⁶ celler. Behandling af de ufraktionerede T-celler med OKT5 og gede-muse FITC uden efterfølgende fraktionering ændrede ikke formeringsreaktionen. I modsætning hertil opnåedes forskelle i reaktio-

nen på PHA med de separerede OKT5⁺ og OKT5⁻ T-celle delmængder. OKT5⁻ populationen reagerede på alle doser af PHA på tilsvarende måde som den useparerede T-celle population. Formeringsreaktionen af OKT5⁺ celler var imidlertid signifikant mindre ved alle testede doser af PHA. Endvidere
 5 formerede OKT5⁺ T-cellerne sig overhovedet ikke ved en PHA dosis på 0,1 μ g per 10⁶ celler, hvorimod OKT5⁻ T-celle delmængden og de ufraktionerede celler stadig reagerede. Formeringsreaktionen for disse delmængder på Con A var derimod ens og de to delmængder af celler kunne ikke skelnes fra hinanden eller fra den ufraktionerede T-celle
 10 population.

Reaktionerne på alloantigen i MLC og på opløselige antigener undersøgtes dernæst. Som vist i tabel (II) reagerede den ufraktionerede T-celle population, den med OKT5 og G/M FITC behandlede ufraktionerede T-celle population og både OKT5⁺ og OKT5⁻ T-celle delmængderne på ens
 15 måde i MLC over for Laz 156. I modsætning hertil gav formeringsreaktioner på opløselige antigener den klareste skelnen mellem disse delmængder. I alle undersøgte tilfælde formerede OKT5⁺ T-celle delmængden sig minimalt over for opløselige antigener, tetanustoxoid og fåresyge, hvorimod OKT5⁻ T-celle delmængden reagerede godt.

20 Tidligere undersøgelser viste, at TH₂⁺ populationen af T-lymfocytter kunne induceres med Con A til at undertrykke autologe lymfocytter i MLC. For at bestemme, om OKT5⁺ T-celle delmængde på tilsvarende måde kunne udtrykke suppressor-funktion, aktiveredes T-celler i 48 timer med Con A og sorterades dernæst med OKT5 og OKT4 monoklonalt antistof i bestemte
 25 T-celle delmængder. Dernæst sattes disse separerede T-celle subpopulationer til autolog reagerende lymfocytter ved indledningen af MLC. Som vist i tabel III, undertrykte med Con A aktiverede ufraktionerede T-celler autolog celle-formering i MLC. Behandling med monoklonalt antistof og G/M FITC ændrede ikke dette resultat. Selvom både OKT4⁺ og
 30 OKT5⁺ T-celler formerede sig med Con A, virkede kun OKT5⁺ T-celler undertrykkende, når disse aktiveredes med Con A. OKT4⁺ delmængden virkede ikke undertrykkende. Derudover virkede OKT5 subpopulationen, som indeholder både OKT4⁺ og OKT4⁻ TH₂⁻ subpopulationer, minimalt undertrykkende, når den sammenlignedes med den stærkt undertrykkende OKT5⁺
 35 population.

Tabel (IV) viser sammenhængen mellem niveauet af perifere T-celler og T-celle delmængder og forskellige sygdomstilstande. Denne sammenhæng kan anvendes til diagnostiske formål (fx. for at påvise akut infektiøs

mononukleosis) ved at analysere blodprøven af et individ, som mistænkes for at have en af disse sygdomstilstande, for at bestemme niveauet af T-celler og T-celle delmængder. De i tabel (IV) viste sammenhænge er en anden måde, på hvilken OKT5 antistof kan påvises og skelnes fra andre antistoffer.

Tabel I

Mitogen reaktion af ufraktionerede og OKT5 monoklont antistof separerede T-celle delmængder

Proliferativ stimulus	T-celler	T-celler behandlet med OKT5 og G/M FITC	OKT5 ⁺ T-celler	OKT5 ⁻ T-celler
PHA (1 µg/ 10 ⁶ celler)	61.149 ± 6.235	54.479 ± 1.003	11.419 ± 989	58.695 ± 3.228
PHA (0,5 µg/ 10 ⁶ celler)	48.935 ± 5.699	47.101 ± 3.365	7.821 ± 1.057	51.963 ± 6.811
PHA (0,1 µg/ 10 ⁶ celler)	19.754 ± 2.177	21.681 ± 869	839 ± 70	25.696 ± 2.782
Con A (250 µg/10 ⁶ celler)	101.771 ± 2.693	87.899 ± 9.288	94.063 ± 1.651	88.269 ± 7.115
Con A (125 µg/10 ⁶ celler)	44.460 ± 2.713	47.924 ± 1.056	37.709 ± 3.180	39.507 ± 4.268
Con A (50 µg/10 ⁶ celler)	38.577 ± 5.169	42.605 ± 4.773	36.833 ± 3.982	40.051 ± 1.666
Mediakontrol	81 ± 7	151 ± 29	136 ± 12	127 ± 22

Tabel II

Formeringsreaktion af ufraktionerede T-celler og monoklont antistof separerede T-celle delmængder
over for opløselige antigener og alloantigener

Proliferativ stimulus	T-celler	T-celler behandlet med OKT5 og G/M FITC	OKT5 ⁺ T-celler	OKT5 ⁻ T-celler
		<u>Forsøg 1</u>		
MLC	106.547 ± 12.638	91.914 ± 2.790	116.838 ± 5.707	105.636 ± 3.013
Tetanustoxoid	21.206 ± 3.656	25.782 ± 2.615	992 ± 788	29.309 ± 2.154
Fåresyge	29.300 ± 1.761	24.590 ± 3.586	1.339 ± 273	21.518 ± 3.509
Media	186 ± 34	137 ± 21	79 ± 10	84 ± 13
		<u>Forsøg 2</u>		
MLC	93.623 ± 2.798	92.721 ± 4.623	114.822 ± 7.800	98.136 ± 5.587
Tetanustoxoid	65.328 ± 7.549	67.776 ± 10.671	1.975 ± 221	69.047 ± 7.100
Fåresyge	16.591 ± 1.959	18.222 ± 2.168	322 ± 44	37.654 ± 3.176
Media	64 ± 11	79 ± 7	58 ± 9	61 ± 1

Tabel III

OKT5⁺ T-celler mediat Con A-induceret undertrykkelse af MLC

Celler tilsat MLC	Forsøg 1		Forsøg 2	
	³ H-thymidin	Inhibering %	³ H-thymidin	Inhibering %
Ufraktionerede T-celler alene	78.374 ± 4.928	-----	89.199 ± 10.053	-----
(Ufraktionerede T-celler) _{Con A}	21.065 ± 1.716	73	25.788 ± 3.554	71
(Ufraktionerede T-celler + (monoklont antistof + G/M FITC) _{Con A}	29.003 ± 2.788	63	18.393 ± 2.776	79
(OKT5 ⁺) _{Con A}	14.781 ± 1.236	81	19.711 ± 875	78
(OKT4 ⁺) _{Con A}	79.954 ± 4.782	-2	87.629 ± 10.655	2
(OKT5 ⁻) _{Con A}	67.158 ± 5.839	15	70.335 ± 8.904	21

Tabel IV

Perifere T-celle niveauer ved sygdomstilstande

<u>Sygdomstilstand</u>		<u>OKT3⁺</u>	<u>OKT4⁺</u>	<u>OKT5⁺</u>
	Primær galdecirrose (2)	N	+	-
5	Dissemineret sclerose (fremskredet sygdom) (8)	-	N	-
	Myasthenia Gravis (begyndende, ubehandlet) (3)	0	0	0
	Akut transpl./vært (3)	0 til -	-	0
10	Erhvervet agammaglobulinæmia			
	type I			+
	type II		0	
	Hyper-IgE (4)	-	N	0 til -
	Akut infektiøs mononukleose (4)*	+	0 til --	++
15	Hodgkins sygdom			
	I. og II. stadium	N	N	N
	III. og IV. stadium	--	N	N

N = inden for normale grænser

20 0 = fraværende

+ = over normal

++ = meget over normal

- = under normal

-- = meget under normal

25

* disse niveauer vender tilbage til normal ca. en uge før de kliniske symptomer forsvinder

"Tallene i parentes angiver antallet af vurderede patienter."

30

Det blev påvist, at det omhandlede antistof OKT5 hører til underklassen IgG₁, som er én af de fire underklasser af muse-IgG. Disse underklasser af immunoglobulin G afviger fra hinanden i de såkaldte "fikserede" områder, idet dog et antistof for et specifikt antigen vil have et såkaldt "variabelt" område, som er funktionelt identisk uanset hvilken underklasse af immunoglobulin G det tilhører. Det pågældende antistof kan anvendes til påvisning af for høj cytotoxisk eller suppressor T-celle aktivitet ved reaktion af et T-celle præparat fra et individ med OKT5 antistof. For høj cytotoxisk eller suppressor T-celle aktivitet vil blive påvist ved tilstedeværelsen af mere end 20-30% af den totale perifere T-celle population, som reagerer med OKT5. Denne diagnostiske teknik kan benyttes ved anvendelse af OKT5 antistof alene eller i kombination med andre antistoffer (fx. OKT3 og OKT4) som vist i tabel IV. Reaktivitetsmønstre med et udvalg af antistoffer til T-celler og T-celle delmængder muliggør en mere nøjagtig påvisning af visse sygdomstilstande end det ville være muligt ved hjælp af tidligere diagnostiske metoder.

PATENTKRAV

1. Monoklonalt antistof af klasse IgG, KENDETEGNET ved, at det er identisk med det monoklonale antistof, der fremstilles af hybridomacellelinien ATCC nr. CRL 8013 eller 8016, og at det

- 5 a) reagerer med mere end 90% af cytotoxiske og suppressor TH_2^+ T-celler (ca. 20-30% af alle normale humane perifere T-celler), men ikke med normale humane perifere B-celler, nul-celler eller makrofager,
- b) reagerer med ca. 80% af normale humane thymocyter,
- 10 c) ikke reagerer med TH_2^- T-celler eller $OKT4^+$ T-celler, men reagerer med ca. 68% af $OKT4^-$ T-celler.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af det monoklonale antistof ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at man dyrker hybridomacellelinien ATCC nr. CRL 8013 eller 8016 in vitro i et egnet medium eller indfører den

15 intraperitonealt til mus og udvinder antistoffet fra supernatanten fra in vitro dyrkningen eller fra maligne ascites eller serum fra musene.

20

25

30

35

Fig. 1.

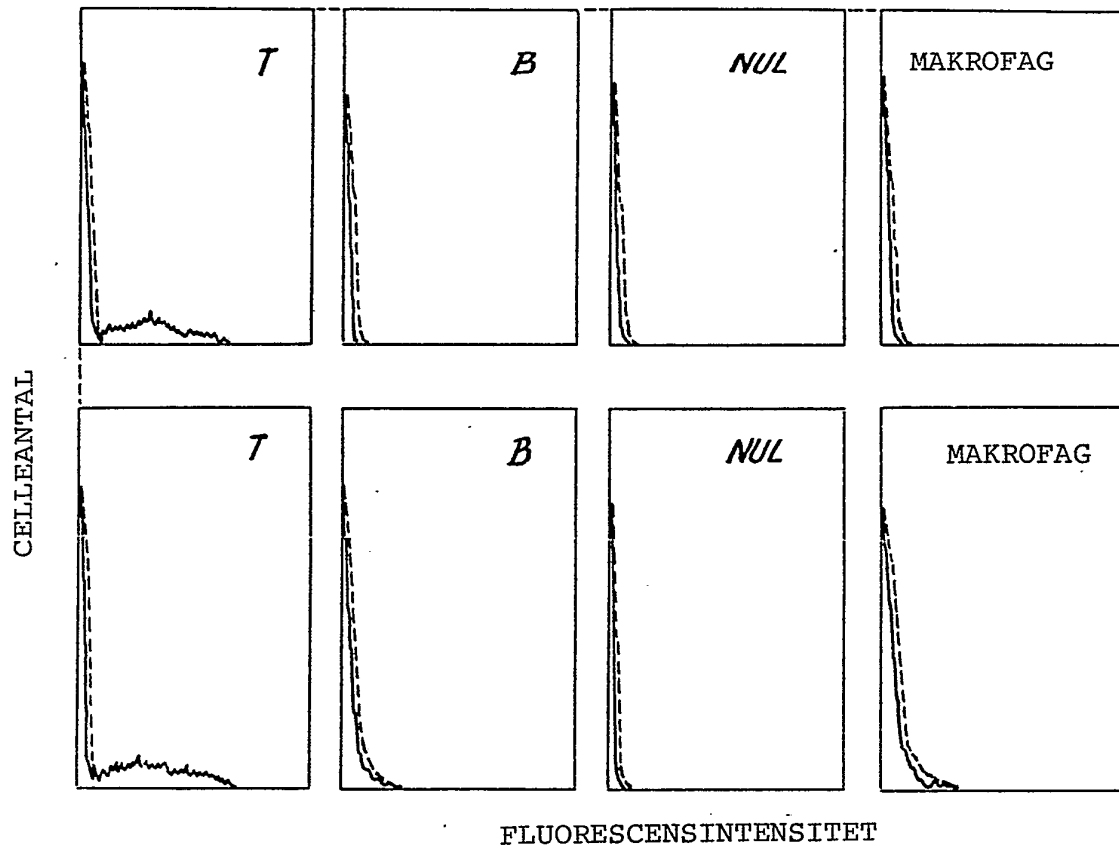


Fig. 5.

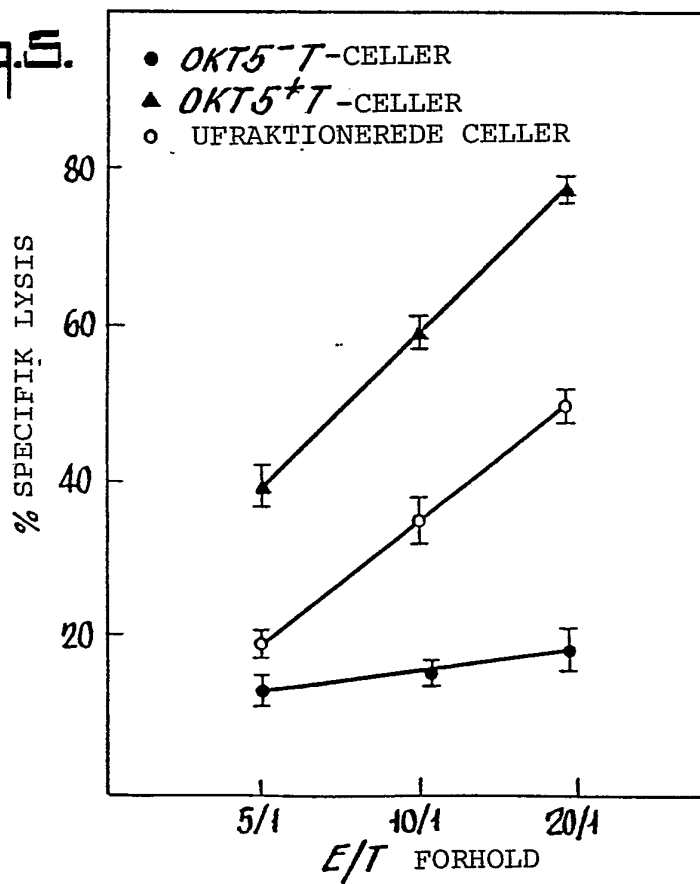


Fig. 2.

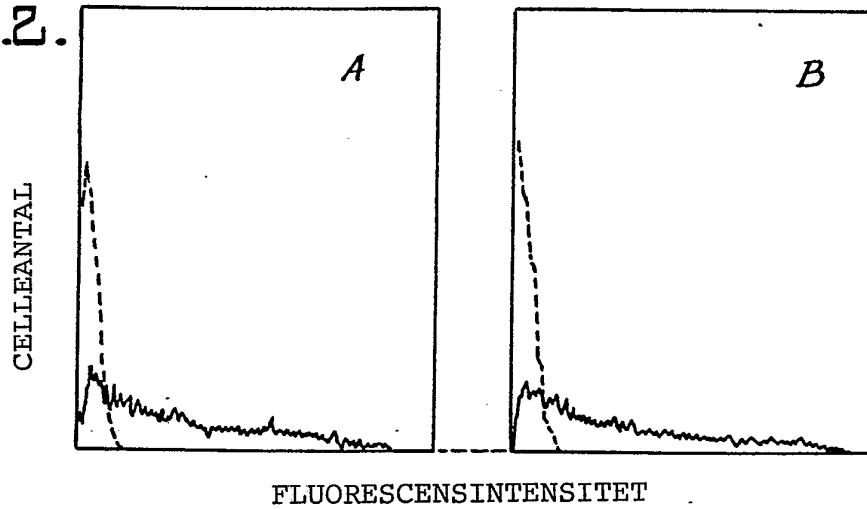


Fig. 3.

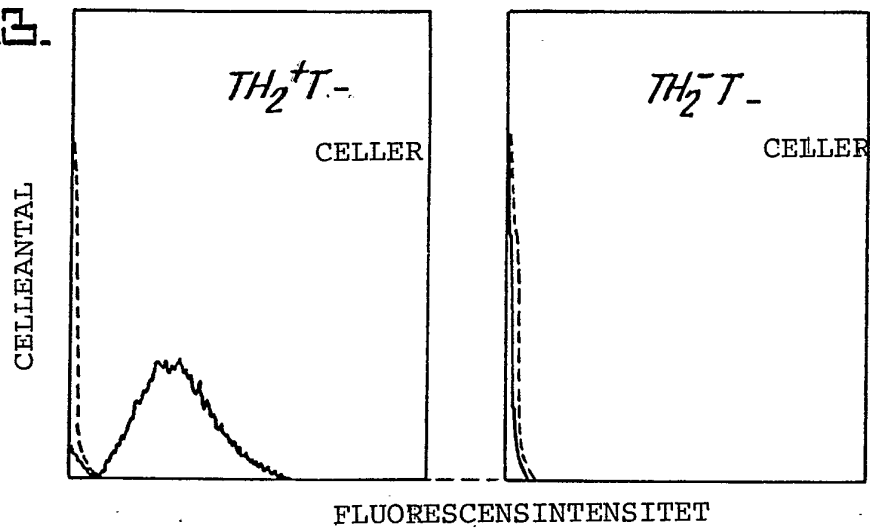


Fig. 4.

