



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 297 899 A7

Erteilt gemäß § 13 Absatz 2
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 5/20
A 61 K 39/395
C 12 P 21/08

DEUTSCHES PATENTAMT

(21)	DD C 12 N / 310 129 7	(22)	09.12.87	(45)	30.01.92
(71)	siehe (73)				
(72)	Fiebig, Helmut, Prof. Dr. sc.; Behn, Ingrid, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Hommel, Undine, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Kupper, Hartmut, Dr. med.; Eichler, Wolfram, Dipl.-Biochem., DE				
(73)	Universität Leipzig, Goethestraße 3-5, O - 7010 Leipzig, DE				
(74)	Universität Leipzig, Forschungskontaktstelle, Augustusplatz 10-11, O - 7010 Leipzig, DE				
(54)	Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein 40 kDa Antigen humaner T-Lymphozyten				

(55) Zelloberflächenantigen; monoklonaler Antikörper; humane T-Lymphozyten; Antigenmodulation; Hybridom; Selektionsverfahren; T-Zellspezifität; 40 kDa-Protein; medizinische Diagnostik; T-ALL; Leukämiediagnostik

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper für ein 40 kDa-Zelloberflächenantigen 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 sollen nicht nur eine hohe Spezifität und Affinität, die ihren Einsatz in der Durchflußzytometrie und Immunhistologie gestatten, aufweisen, sondern auch zur Modulation und Eliminierung von T-Lymphozyten geeignet sein. Dazu werden in bekannter Weise Hybridzellen von B-Lymphozyten immunisierter BALB/c-Mäuse erzeugt und Hybridomzellen selektiert, deren monoklonale Antikörper die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Das Selektionsverfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß in einem mehrstufigen Selektionssystem Hybridome erzeugt und kultiviert werden, deren monoklonale Antikörper Pan-T-Zellspezifität, Reaktivität mit kortikalen und medullären Thymozyten sowie neoplastischen T-Zellen (T-ALL), Bindung an ein Zelloberflächenprotein von 40 kDa, ausreichende Affinität für die Anwendung in der Durchflußzytometrie und Immunhistologie sowie zur Modulation und Eliminierung von T-Zellen besitzen. Die monoklonalen Antikörper BL-TP 7 des Hybridoms H-BL-TP 7 weisen die gewünschten Eigenschaften auf. Das Verfahren zur Herstellung der monoklonalen Antikörper beruht auf der *In-vitro*- oder *In-vivo*-Kultivierung des entsprechenden Hybridoms H-BL-TP 7 und der Abtrennung der monoklonalen Antikörper. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein 40-kDa-Antigen humaner T-Lymphozyten durch Immunisierung von Mäusen mit angereicherten humanen T-Lymphozyten, Fusion von B-Lymphozyten mit murinen Myelomzellen, Selektion von Hybridomen, die monoklonale Antikörper mit Pan-T-Zellreaktivität sezernieren, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Hybridom, dessen monoklonaler Antikörper mit einem Glykoprotein von ca. 40 kDa im reduzierten Zustand spezifisch reagiert, dergestalt spezifisch selektiert wird, daß zuerst T-Lymphozyten-spezifische Klone ausgewählt werden, die auch mit der Gesamtheit der Thymozyten, sowohl der medullären als auch der kortikalen, reagieren, anschließend diejenigen Hybridome, deren monoklonale Antikörper mit einem radiomarkierten, durch Detergensbehandlung der T-Zellen solubilisierten Oberflächenprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa im reduzierten Zustand reagieren, selektiert werden, wobei in einem dritten 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 vierten Schritt die Antikörper ihre Eignung zur Markierung der T-Zellen in Kryostatgewebeschnitten bestätigen und durch einen fünften Schritt monoklonale Antikörper selektiert werden, die die Antigenexpression auf T-Zellen modulieren, daß das so determinierte Hybridom H-BL-TP 7 in vitro und in vivo kultiviert wird und der sezernierte monoklonale Antikörper BL-TP 7 isoliert, angereichert und gegebenenfalls mit Markern oder an feste Phasen gekoppelt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die mit einem Zelloberflächenantigen (gp40) humaner T-Lymphozyten reagieren. Die monoklonalen Antikörper können zur medizinischen Diagnostik, besonders zur Bestimmung von T-ALL, und zur Eliminierung von normalen und neoplastischen humanen T-Lymphozyten eingesetzt werden.

Charakteristik 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/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 und OKT1 (US-PS 4381 295). 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.

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, B. F. HAYNES, L. M. NADLER und I. D. BERNSTEIN: Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo 1986).

Auf dem 3. Workshop (Oxford 1986) wurden zusätzlich die Gruppen CD 27 und CD 28 etabliert, die Antikörper enthalten, die hauptsächlich mit T-Zellen reagieren.

In der CD 7-Gruppe sind bisher nur wenige Antikörper eingeordnet worden. Dies sind die monoklonalen Antikörper 3A1D14C2 und G37 (Leukocyte Typing III, Hrsg.: A. J. McMICHAELE et al., Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1987). Für den Nachweis von T-Zellen im Gewebeschnitt sind sie nur bedingt geeignet. Beide monoklonalen Antikörper induzieren eine Neuordnung des CD-7-Antigens auf den Zelloberflächen der reagierenden T-Zellen.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat als Ziel, ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper anzugeben, das in leicht beherrschbarer Weise die kostengünstige Produktion größerer Mengen spezifischer Antikörper für das CD-7-Antigen (Glykoprotein, 40 kDa) der humanen T-Lymphozyten gestattet.

Die monoklonalen Antikörper sollen sich zur qualitativen und quantitativen durch flußzytometrischen 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 sowie die experimentelle Beeinflussbarkeit 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 ein Hybridom erzeugt wird, das leicht und unaufwendig handhabbar ist und dessen Kultivierung in technisch und ökonomisch vorteilhafter Weise möglich ist. Unter Verwendung dieses Hybridoms sollen in anschließenden Verfahrensschritten monoklonale Antikörper erzeugt werden, die mit dem 40-kDa-Glykoprotein 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 Nylonwelle oder E-Rosettenbildung werden daraus T-Lymphozyten gewonnen. Eine zweite Variante der T-Lymphozytengewinnung besteht darin, aus humanem Thymus eine Zellsuspension herzustellen und die Bindegewebsanteile durch Dichtegradientenzentrifugation abzutrennen. 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 (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 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 die 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, Non-B/Non-T-Zellen, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten reagieren. Unter den in solcher Art vorselektierten Hybridomen werden nun erfindungsgemäß solche Klone gesucht, deren Antikörper in der Lage sind, mit einem T-Zelloberflächenprotein zu reagieren, welches nicht nur auf der Mehrheit der normalen peripheren T-Lymphozyten, sondern auch auf neoplastischen Lymphozyten (T-ALL) und der überwiegenden Mehrheit der Thymozyten ausgeprägt ist und ein apparentes Molekulargewicht von ca. 40 kDa (nach Reduktion der Disulfidbrücken) besitzt.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes werden die Oberflächenproteine von nativen humanen T-Lymphozyten nach der Laktoperoxidase-methode radioiodiert (¹²⁵I-Id) 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 freigesprochenen Präzipitate werden in Natriumdodezylsulfat-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 40 kDa aufweisen.

Im dritten 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 vierten Selektionsschritt werden die selektierten Hybridome überprüft, ob sie sich für die Markierung von antigenträgenden Zellen in Kryostatschnitten lymphoider Gewebe eignen und daß sie keine Nebenreaktionen mit anderen Geweben aufweisen.

In einem fünften Selektionsschritt wird überprüft, ob die monoklonalen Antikörper der selektierten Hybridome bei Bindung an die T-Lymphozyten eine Modulation der Antigenexpression induzieren.

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 7 bezeichnet. Die Herstellung des monoklonalen Antikörpers BL-TP 7 basiert auf einem Verfahren, welches auf die In-vitro- oder In-vivo-Kultur des Hybridoms H-BL-TP 7 ausgerichtet ist. Das Hybridom H-BL-TP 7 wird an der Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität Leipzig kultiviert bzw. liegt kryokonserviert vor und ist Interessenten zugänglich. Der monoklonale Antikörper BL-TP 7 hat die Registriernummer ZIM-0090 im Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR erhalten.

Der durch In-vitro- oder In-vivo-Kultur erhaltene monoklonale Antikörper BL-TP 7 reagiert mit Leukozyten, anderen Blutzellen sowie lymphoiden Zellen aus bestimmten Organen in der in Tabelle 1 dargestellten Weise. Das Reaktionsmuster der monoklonalen Antikörper mit permanent wachsenden Zell-Linien ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Der monoklonale Antikörper BL-TP 7 ist in der Lage bei Reaktion mit humanen T-Lymphozyten über 8 bis 16 h bei 37°C die T-Zellen zu modulieren, d. h. das gp-40-Antigen von der Zelloberfläche zu entfernen (Tab. 3). Nach 24 bis 48 h wird das Antigen neu synthetisiert und wieder auf der Zellmembran exprimiert.

Die wichtigsten Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers BL-TP 7 sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Der monoklonale Antikörper BL-TP 7 gehört der IgM-Klasse an.

1. Ausführungsbeispiel

BALB/c-Mäuse werden mit humanen T-Lymphozyten immunisiert. Vier Tage nach der letzten Immunisierung wird die Milz einer solchen Maus entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Davon werden 2×10^8 kernhaltige Zellen mit 2×10^7 Myelomzellen (P3-X63 Ag 8.653) mittels 50%igem Polyethylenglykol (M_r : 4000) fusioniert. Anschließend werden von den Zellen 200- μ l-Kulturen in acht 96-Well-Gewebekulturplatten angelegt.

Die Überstände der die aufwachsenden HAT-resistenten Hybridzellen enthaltenden Kulturen werden auf die Anwesenheit von Antikörpern getestet, die nur mit Zelloberflächenantigenen von humanen T-Lymphozyten reagieren. Nur diejenigen Kulturen werden weiter gezogen, deren Antikörper nicht mit peripheren B-Lymphozyten, wohl aber mit der großen Mehrheit der separierten T-Zellen reagieren. Durch indirekte Immunfluoreszenz wird ausgeschlossen, die mit B-Lymphozyten, LGL-Zellen, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten oder Erythrozyten reagieren.

Unter den so selektierten Hybridomen werden wiederum nur diejenigen weitergezogen, deren Antikörper mit der überwiegenden Mehrheit der humanen Thymozyten und mit den T-Lymphozyten von T-ALL-Patienten reagieren.

Mittels NDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden diejenigen Kulturen aufgedeckt, die Antikörper enthalten, die aus den Triton X-100-Lysaten von radioiodierten T-Lymphozyten ein 40-kDa-Protein spezifisch isolieren.

Unter den so selektierten Kulturen werden alle Hybridome weiterkultiviert, deren Antikörper humane T-Zellen nach indirekter Markierung ausreichend stark anfärben, so daß sich die monoklonalen Antikörper sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Analyse in durchflußzytometrischen Verfahren, wie z. B. der Analyse mit einem fluoreszenzaktivierten Zellsortierer, eingesetzt werden können.

Daran schließt sich eine Überprüfung an, ob die Antikörper T-Zellen in Kryostatsschnitten lymphoider Gewebe markieren und keine Nebenreaktionen mit anderen Geweben aufweisen. Nur solche Kulturen werden weitergezogen, die diesen Anforderungen genügen.

Weiterhin wird überprüft, ob die Antikörper in der Lage sind, T-Zellen zur Modulation des 40-kDa-Antigens anzuregen. Das so selektierte Hybridom H-BL-TP 7 wird rekloniert und hochproduktive Subklone ausgewählt, die die gewünschten monoklonalen Antikörper stabil in hoher Konzentration sezernieren.

Zur Gewinnung des monoklonalen Antikörpers wird das Hybridom in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in Kulturgefäße eingesät und nach jeweils 3 bis 4 Tagen der Überstand teilweise entnommen, wobei mit frischem Kulturmedium ergänzt wird und darauf geachtet wird, daß die Konzentration der Hybridomzellen zwischen 1×10^6 und 10^7 Zellen/ml gehalten wird. Als Kulturmedium dient RPMI-1640, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum.

Die Kulturüberstände enthalten die monoklonalen Antikörper und können entweder direkt für entsprechende indirekte Markierungstechniken eingesetzt werden oder nach einer entsprechenden üblichen Abtrennung aus dem Kulturüberstand isoliert und weiterverwendet werden.

2. Beispiel

Bestimmung der gp40 – positiven Lymphozyten aus dem Blut von Spendern

Mononukleäre Zellen werden aus dem Venenblut von Probanden mittels Dichtegradientenzentrifugation auf Visotrast/Ficoll, wie allgemein bekannt, gewonnen.

5×10^5 Zellen werden in einem V-förmigen Gefäß (Zentrifugentube oder V-Boden-Mikrotiterplatte) mit 100 μ l einer Gebrauchslösung des monoklonalen Antikörpers BL-TP 7, der aus Kulturüberstand gewonnen wird, suspendiert und für 30 Minuten bei 4°C reagieren gelassen. Die Antikörperlösung enthält 0,1% Natriumazid.

Durch Suspendieren, Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes werden die Zellen anschließend dreimal mit 1% FKS/0,15M NaCl, 0,01M Phosphat/0,1% Natriumazid (pH 7,4) gewaschen.

Dann werden die Zellen mit 100 μ l FITC-markiertem Ziege-anti-Mausimmunglobulin für 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Anschließend wird die dreimalige Waschung mit der obengenannten Lösung wiederholt.

Die Zellen werden in gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,4) mit 1% Formaldehyd aufgenommen und sind damit für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung oder für eine durchflußzytometrische Bestimmung vorbereitet, die in der üblichen Art und Weise erfolgen kann.

Tabelle 1

Reaktionsmuster des monoklonalen Antikörpers BL-TP 7 mit humanen Blutzellen und Zellen aus lymphoiden Organen

Zelltyp	Markierte Zellen [%]
PBL	61 $\pm$ 6
T-Lymphozyten (SF-pos.)	85 $\pm$ 8
B-Lymphozyten (SE-neg., mlg-pos.)	< 5
LGL (NK)	30 $\pm$ 6
Monozyten	0
Granulozyten	0
Erythrozyten	0
Lymphoblasten (PHA-stim.)	> 90
Lymphoblasten (BL-TRec-stim.)	> 90
Thymozyten	32 $\pm$ 4
Tonsillenlymphozyten	28 $\pm$ 5

Tabelle 2

Bindungsmuster des monoklonalen Antikörpers BL-TP 7 mit permanent wachsenden humanen Zell-Linien und Leukämien

Zellen	Reaktion der Zellen mit dem monoklonalen Antikörper BL-TP 7
T-Zellen:	
CEM	+++
MOLT-3	+++
MOLT-4	++
JURKAT	+
HSB-2	++
SKW-3	+++
HUT-102	-
B-Zellen:	
RFH	-
RAJI	-
IM-09	-
GM-607	-
HMy-2	-
Myeloide Linie:	
U-937	-
Erythroide Linie:	
K-562	-
Leukämien:	
T-ALL	+++
c-ALL	-
B-CLL	-
Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz:	
	+++; 100 % stark markiert
	++; 100 % schwach markiert
	±; < 25 %
	-; unmarkiert

Tabelle 3

Modulation des gp-40-Antigens von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper BL-TP 7

Behandlung der PBL ¹⁾	Durch mAk markierte Zellen [%] ²⁾	
	BL-TP 7	BL-TP 3
PBS	63	71
BL-TP 7	< 5	72
BL-TP 3	65	< 5
BL-TP 6 a	75	74

1 Inkubation der Zellen (2×10^6) mit jeweils 10 µg monoklonalen Antikörper für 16 h bei 37 °C.

2 Indirekte Immunfluoreszenz; FACS-440 Durchflußzytometrie.

Tabelle 4

Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers BL-TP 7

Isotyp	IgM
Zytotoxizität (mit Komplement)	ja
Modulation	ja
Eignung für:	
Durchflußzytometrie	ja
Immunhistologie	ja
Panning	ja