



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 267 738 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) WPC 12 N / 310 130 3

(22) 09.12.87

(44) 10.05.89

(71) Karl-Marx-Universität Leipzig, Goethestraße 3-5, Leipzig, 7010, DD

(72) Fiebig, Helmut, Prof. Dr. sc. Dipl.-Biol.; Behn, Ingrid, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Hommel, Undine, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Kupper, Hartmut, Dr. med., DD

(54) Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein gp 120 Antigen humaner T-Lymphozyten

(55) Zelloberflächenantigen, monoklonale Antikörper, humane T-Lymphozyten, Antigenmodulation, Hybridome, Selektionsverfahren, Pan-T-Zellspezifität, 120 kDa-Protein, medizinische Diagnostik, Leukämiediagnostik, Chronische Lymphoblastische Leukämie, B-Zellsubpopulation

(57) Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper für ein 120 kDa-Zelloberflächenantigen normaler 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 aufgefunden und kultiviert werden, deren monoklonale Antikörper Pan-T-Zellspezifität, Bindung an ein Zelloberflächenprotein von 120 kDa, ausreichende Affinität für die Anwendung in der Durchflußzytometrie und Immunhistologie sowie zur Modulation und Eliminierung von T-Zellen besitzen. Die monoklonalen Antikörper der Hybridome H-BL-TP 6a, b und c weisen die gewünschten Eigenschaften auf. Das Verfahren zur Herstellung der monoklonalen Antikörper beruht auf der In-vitro- oder In-vivo-Kultivierung der entsprechenden Hybridome H-BL-TP 6a, b und c und der Abtrennung der monoklonalen Antikörper. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein gp-120-Antigen humaner T-Lymphozyten durch Immunisierung von Mäusen mit angereicherten humanen T-Lymphozyten, Fusion von aus der Milz der Mäuse gewonnenen B-Lymphozyten mit murinen Myelomzellen, Selektion von Hybridomen, die monoklonale Antikörper mit Pan-T-Zellreaktivität sezernieren, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hybridome, deren monoklonale Antikörper mit einem Glykoprotein von etwa 120 kDa im reduzierten Zustand spezifisch reagieren, dergestalt spezifisch selektiert werden, daß zuerst T-Lymphozyten-spezifische Klone ausgewählt werden, anschließend diejenigen Hybridome, deren monoklonale Antikörper mit einem radiomarkierten, durch Detergensbehandlung der T-Zellen solubilisierten Oberflächenprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 120 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 einzelne Glieder der Serie monoklonaler 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 die so determinierten Hybridome H-BL-TP 6a, b und c in vitro und in vivo kultiviert werden und die sezernierten monoklonalen Antikörper BL-TP 6a, b und c isoliert, angereichert und gegebenenfalls mit Markern oder an feste Phasen gekoppelt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die mit einem Zelloberflächenantigen (gp 120) humaner T-Lymphozyten reagieren. Die monoklonalen Antikörper können zur medizinischen Diagnostik und zur Eliminierung von humanen T-Lymphozyten eingesetzt werden.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Es ist bereits bekannt, monoklonale Antikörper herzustellen. Die Prinziplösung 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 und OKT4 (US-PS 4381295). 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 davon 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 in Oxford wurden zusätzlich die Gruppen CD27 und CD28 etabliert, die Antikörper enthalten, die hauptsächlich mit T-Zellen reagieren.

In der CD6-Gruppe sind bisher nur wenige Antikörper eingeordnet worden. Dies sind die monoklonalen Antikörper (T12/3Pt12B8 (IgM) und 12.1.5. (IgG2a) (siehe Leukocyte Typing II). Beide Antikörper weisen eine niedrige Affinität gegenüber humanen T-Zellen auf, so daß sie sich für einen diagnostischen Einsatz nicht gut eignen. Für den Nachweis von T-Zellen im Gewebeschnitt sind sie ebenfalls nicht geeignet. Beide monoklonalen Antikörper induzieren keine Neuordnung des CD6-Antigens auf den Zelloberflächen der reagierenden T-Zellen und lösen keine Aktivierung der behandelten Zellen aus.

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 das CD6-Antigen (Glykoprotein, 120 kDa) der humanen T-Lymphozyten gestattet.

Die monoklonalen Antikörper sollen sich zur qualitativen und quantitativen durchflußzytometrischen Analyse, zum immunhistologischen Nachweis von T-Zellen in Kryostatgewebeschnitten sowie zur Eliminierung von T-Zellen aus Lymphozytenpräparationen eignen. Die monoklonalen Antikörper sollen unterschiedliche biologische Funktionen einleiten können. Wünschenswert ist es, daß sie mit unterschiedlichen Epitopen des CD6-Antigens reagieren und die Modulation dieses Oberflächenantigens der T-Zellen induzieren.

Die monoklonalen Antikörper sollen stabil und lagertfähig sein. Glieder der Serie sollen sich auch zur direkten Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen eignen.

Durch die Bereitstellung solcher monoklonaler 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 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 dem 120kDa-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 Nylonwolle 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 (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 200µl-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 oder nur mit einem geringen Prozentsatz der 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 von etwa 120kDa (nach Reduktion der Disulfidbrücken) zu reagieren.

Dazu 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 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 120kDa aufweisen.

Im dritten Selektionsschritt werden davon alle die Hybridome weiterkultiviert, deren Antikörper humane T-Lymphozyten 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 (FACS 440), eingesetzt werden können.

In einem vierten Selektionsschritt werden die selektierten Hybridome überprüft, ob sie sich für die Markierung von antigenträgenden Zellen in Kryostat Schnitten lymphoider Gewebe eignen und daß sie keine Nebenreaktionen mit anderen Geweben aufweisen. Wenigstens ein Glied der erhaltenen Serie monoklonaler Antikörper sollte diesen Anforderungen entsprechen.

In einem fünften Selektionsschritt wird überprüft, ob die monoklonalen Antikörper der selektierten Hybridome bei Bindung an die T-Lymphozyten eine Modulation der Antigenexpression induzieren. Mindestens ein Glied der erhaltenen Serie monoklonaler Antikörper sollte modulierende Eigenschaften gegenüber T-Zellen 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-TP6 bezeichnet. Die Herstellung der monoklonalen Antikörper der Serie BL-TP6, deren einzelne Glieder die zusätzliche Bezeichnung „a“, „b“ und „c“ erhalten, basiert auf einem Verfahren, welches auf die In-vitro- oder In-vivo-Kultur der Hybridome H-BL-TP6a, b oder c ausgerichtet ist. Die Hybridome H-BL-TP6a, b und c werden an der Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität Leipzig kultiviert bzw. liegen kryokonserviert vor und sind Interessenten zugänglich. Die monoklonalen Antikörper BL-TP6a, b und c haben die Registriernummern ZIM-0154, ZIM-0155 und ZIM-0227 im Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR erhalten. Die durch In-vitro- oder In-vivo-Kultur erhaltenen monoklonalen Antikörper BL-TP6a, b und c reagieren mit Leukozyten, anderen Blutzellen sowie lymphoiden Zellen aus bestimmten Organen in der Tabelle 1 dargestellten Weise. Das Reaktionsmuster der monoklonalen Antikörper mit permanent wachsenden Zell-Linien ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Der monoklonale Antikörper BL-TP6b 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-120-Antigen von der Zelloberfläche zu entfernen (Tab. 3). Nach 24 bis 48 h wird das Antigen neu synthetisiert und wieder auf Zellmembran exprimiert. Die Behandlung von humanen T-Lymphozyten mit dem monoklonalen Antikörper BL-TP6b leitet eine Aktivierung dieser Zellen ein. Die wichtigsten Eigenschaften der monoklonalen Antikörper BL-TP6a, b und c sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Ausführungsbeispiele

1. Beispiel

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 Ag8.653) mittels 50%igem Polyethylenglykol (M_r : 4000) fusioniert. Anschließend werden von den Zellen 200 µl-Kulturen in acht 96-Well-Gewegekulturplatten 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 oder nur mit einem geringen Prozentsatz der peripheren B-Lymphozyten, wohl aber mit der großen Mehrheit der Blutlymphozyten und allen separierten T-Zellen reagieren. Durch indirekte Immunfluoreszenz wird ausgeschlossen, daß Kulturen weitergezogen werden, die Antikörper enthalten, die mit LGL-Zellen, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten oder Erythrozyten reagieren.

Mittels NDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden diejenigen Kulturen aufgedeckt, die Antikörper enthalten, die aus den Triton X-100-Lysaten von radioiodierten T-Lymphozyten ein 120 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 Kryostatschnitten 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 120-kDa-Antigens anzuregen.

Die so selektierten Hybridome H-BL-TP6a, 6b und 6c werden rekloniert und hochproduktive Subklone ausgewählt, die die gewünschten monoklonalen Antikörper stabil in hoher Konzentration sezernieren.

Zu Gewinnung der monoklonalen Antikörper werden die Hybridome 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 gp-120-positiven Lymphozyten aus dem Blut von Spendern

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

5×10^6 Zellen werden in einem V-förmigen Gefäß (Zentrifugentube oder V-Boden-Mikrotiterplatte) mit 100 µl einer Gebrauchslösung der monoklonalen Antikörper BL-TP6a, 6b oder 6c, die z. B. aus Kulturüberstand gewonnen werden, 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/0,15 M NaCl, 0,01 M Phosphat/0,1% Natriumazid (pH 7,4) gewaschen.

Dann werden die Zellen mit 100 µl 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 gepuffert. 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 der monoklonalen Antikörper BL-TP6a, b und c mit humanen Blutzellen und Zellen aus lymphoiden Organen**

Zelltyp	Durch mAk markierte Zellen (%) ¹⁾		
	BL-TP6a	BL-TP6b	BL-TP6c
Blutlymphozyten	72 ± 8	71 ± 6	72 ± 10
T-Lymphozyten (SE-positiv)	> 95	> 95	> 95
B-Lymphozyten (SE-negativ)	< 5	< 5	< 5
LGL (NK)	< 5	< 5	< 5
Monozyten	0	0	0
Granulozyten	0	0	0
Thrombozyten	0	0	0
Erythrozyten	0	0	0
Lymphoblasten (PHA stimul.)	> 95	> 95	> 95
Lymphoblasten (BL-TRec stimul.)	> 95	> 95	> 95
Thymozyten	32	24	28
Tonsillenlymphozyten	35	30	33

1) Entwicklung durch FITC-anti-Mausimmunglobulin; FACS-440 Durchflußzytometrie

Tabelle 2**Bindungsmuster der monoklonalen Antikörper BL-TP6a, b und c mit humanen permanent wachsenden T- und B-Zell-Linien**

Linie	Bindung der monoklonalen ¹⁾ Antikörper		
	BL-TP6a	BL-TP6b	BL-TP6c
T-Zellen:			
CEM	++	++	++
MOLT-3	++	++	++
MOLT-4	+++	++	+++
JURKAT	-	-	-
HSB-2	+/-	+/-	+/-
SKW-3	+++	++	+++
HUT-102	-	-	-
B-Zellen:			
REH	-	-	-
RAJI	-	-	-
IM-9	-	-	-
GM-607	-	-	-
HMy-2	-	-	-

1) Indirekte Immunfluoreszenz: +++ = 100% stark markiert
 ++ = 100% schwach markiert
 + = < 100%, > 20%
 +/- = < 20%, > 0%
 - = unmarkiert

Tabelle 3**Modulation der gp 120-Expression von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper BL-TP6b**

Behandlung der PBL ¹⁾	Durch mAk markierte Zellen (%) ²⁾			
	BL-TP6a	BL-TP6b	BL-TP6c	BL-TP3
PBS	73	70	72	69
BL-TP6a	74	72	71	70
BL-TP6c	72	70	69	68
BL-TP6b	< 5	< 5	< 5	70
BL-TP3 (CD3)	74	71	73	< 5

1) Inkubation der Zellen (2 x 10⁶) mit jeweils 10 µg monoklonalem Antikörper für 16 h bei 37°C

2) Indirekte Immunfluoreszenz: FACS-440 Durchflußzytometrie

Tabelle 4
Eigenschaften der monoklonalen Antikörper BL-TP6a, b und c

Eigenschaft	Monoklonaler Antikörper		
	BL-TP6a	BL-TP6b	BL-TP6c
Isotyp	IgG 1	IgG 1	IgM
Modulation	nein	ja	nein
Zytotoxizität (mit Komplement)	nein	nein	ja
Eignung für:			
Durchflußzytometrie	sehr gut	gut	gut
Immunhistologie	sehr gut	gut	gut