

ANGEWANDTE CHEMIE

97. Jahrgang 1985

Heft 3

Seite 141-240

Monoklonale Antikörper: Chemie, Funktion und Anwendungsmöglichkeiten

Von Friedrich Robert Seiler*, Peter Gronski, Roland Kurrle, Gerhard Lüben,
Hans-Peter Harthus, Wolfgang Ax, Klaus Bosslet und Hans-Gerhard Schwick

Professor Rolf Sammet zum 65. Geburtstag gewidmet

Im Dezember vergangenen Jahres wurde der Nobel-Preis für Medizin oder Physiologie an die Naturforscher *N. K. Jerne*, *C. Milstein* und *G. Köhler* verliehen. Diese drei Immunologen haben grundlegend zum Verständnis der Antikörpersynthese durch die einzelne Immunzelle beigetragen. Die in den sechziger Jahren aufgestellte Regel, *aus einer Immunzelle geht nur ein Antikörpertyp hervor*, wurde von ihnen allgemein bestätigt und gilt heute als Dogma. *Jerne* erarbeitete wesentliche Erkenntnisse über die Antikörpervielfalt, und mit seinem *Jerne-Plaque-Test* (1963) wurde die Darstellung und Analyse einer einzelnen, antikörperproduzierenden Immunzelle *in vitro* ermöglicht. Damit hatte das Studium der Immunzellinteraktion und der Kooperation von Lymphozytensubpopulationen, die zur Antikörperförmung führt, entscheidende Impulse und wichtige methodische Voraussetzungen erhalten. *Köhler* und *Milstein* gelang es 1975, die Antikörperproduktion einer schon immunologisch spezifisch geprägten, sterblichen Immunzelle durch Zellverschmelzung (*Hybridisierung*) mit einer unsterblichen, krebsartigen Immunzelle (Myelomzelle) auf Dauer zu stabilisieren, d. h. zu *immortalisieren*. Die Hybridzelle und der daraus gezüchtete Hybridzellklon erzeugen praktisch unbegrenzt und unabhängig von einem animalen Organismus in Zellkultur einen homogenen Antikörper mit der jeweils gewünschten, konstanten Bindungsspezifität, einen *monoklonalen Antikörper*. Dieser wissenschaftliche Durchbruch war der Anfang einer neuen und enorm stimulierenden, biotechnologischen Entwicklung, die sich mit rasantem Tempo in Laboratorien verschiedener Fachrichtungen ausbreitete und die es heute ermöglicht, naturwissenschaftliche, technische und medizinische Probleme aufzugreifen und teilweise schon zu lösen, die bisher nicht analysiert werden können.

1. Einleitung

Antikörper als Träger der Immunität wurden vor 95 Jahren von *Emil von Behring* im Serum eines gegen ein toxisches Agens gefeierten Organismus entdeckt^[1]. Für den medizinisch-therapeutischen Erfolg mit dem Immunserum

von zuvor spezifisch geimpften Tieren erhielt er 1901 den ersten Nobelpreis für Medizin. Doch erst in den Jahren zwischen 1950 und 1970, als die Proteinstrukturchemie und die Immunchemie durch viele neue analytische und präparative Methoden beflogt wurden, die Anwendung der Immundiagnostik mit Antikörpern sich durchsetzte und die immunologische Forschung durch neue medizinische Probleme wie beispielsweise das der Transplantatabstoßung gefordert wurde, erst lange nach der Entdeckung also konnte die Struktur der Antikörpermoleküle aufge-

[*] Dr. F. R. Seiler, Dr. P. Gronski, Dr. R. Kurrle, Dr. G. Lüben,
Dr. H.-P. Harthus, Prof. Dr. W. Ax, Dr. K. Bosslet,
Prof. Dr. H.-G. Schwick
Forschungslabore der Behringwerke AG
Postfach 1140, D-3550 Marburg

klärt und ein besseres Verständnis ihrer Funktionsbreite erreicht werden.

1972 wurden *G. M. Edelman*^[2] und *R. R. Porter*^[3] für ihre Beiträge zur Aufklärung der Antikörperstruktur mit dem Nobel-Preis ausgezeichnet. Bei ihren Arbeiten war auch die Analyse pathologisch vorkommender Myelomproteine hilfreich, die sich als Antikörpermoleküle, -teilmoleküle oder -fragmente monoklonaler Herkunft herausstellten, die jeweils von einem entarteten Immunzellklon unkontrolliert produziert werden und in ungewöhnlich hohen Konzentrationen im Serum oder im Urin der Patienten vorkommen. Dem Immunologen wiederum waren die malignen Zellen, die diese Proteine pathologisch produzieren, die *Myelomzellen*, wichtiges Hilfsmittel, um ihr Ziel, die Entwicklung *immortalisierter Immunzellhybride* und die technische Gewinnung *monoklonaler Antikörper* in vitro, zu erreichen. Insofern reiht sich die letztjährige Würdigung der Arbeiten von *N. K. Jerne*^[4] sowie *C. Milstein* und *G. Köhler*^[5] mit dem Nobel-Preis in diese fast hundertjährige Entwicklung ein.

Mit diesem Aufsatz über monoklonale Antikörper wollen wir nun aber nicht versuchen, die immense und immer noch steigende Flut von Publikationen auf diesem neuen Gebiet zu referieren. Vielmehr sollen die Besonderheiten von *monoklonalen* Antikörpern hervorgehoben und den *heteroklonalen* sowie den *polyklonalen* Antikörpern gegenübergestellt werden, um beispielhaft deutlich werden zu lassen, welche neue Dimension beim Verständnis der Antikörperfamilie und -funktion mit den monoklonalen Antikörpern erreicht worden ist. Es soll demonstriert werden, wie sich ein monoklonaler Antikörper als Einzelstruktur aus dem zuvor nur integriert überschaubaren Verband einer Antikörperfamilie mit in Grenzen variierenden Strukturen und Eigenschaften herauslösen läßt und damit plötzlich eine eigene Bestimmung, Bedeutung und Verwendung erhalten kann. Vor allem soll hier anhand von Beispielen auf die neuen technischen und medizinischen Anwendungsmöglichkeiten aufmerksam gemacht werden, die sich schon heute ergeben haben oder gegenwärtig abzeichnen.

2. Antikörperbildung

2.1. Antikörperbildung *in vivo*

Dringen fremde Substanzen oder Infektionserreger in den Organismus von Wirbeltieren ein oder werden Organe von einem Spender- auf ein Empfängerindividuum verpflanzt, so wehrt sich der Körper über seinen Immunapparat mit Abwehrreaktionen, die normalerweise zur Elimination der Fremdstoffe aus dem Körper führen. Die Träger des Immunsystems sind die weißen Blutkörperchen, die Immunzellen. Das sind einerseits phagozytierende Zellen wie *Granulozyten* und *Makrophagen* und andererseits die *Lymphozyten*, die in zwei Gruppen aufgeteilt werden, die *T-Lymphozyten* (Thymus-geprägt) und die *B-Lymphozyten* (Knochenmark-abgeleitet; Bursa-fabrichius-geprägt). Aus den ruhenden B-Lymphozyten entstehen im Verlauf einer Immunantwort über mehrere Entwicklungsstufen, meist unter Einwirkung von T-Lymphozyten und ihrer hormonartigen Immunfaktoren, schließlich die enddifferenzierten *Plasmazellen*, deren Aufgabe nur noch die Antikörpersynthese ist. *Antikörper* sind Proteine und gehören zur großen

Gruppe der Immunglobuline (siehe Abschnitt 3). Sie sind in der Lage, sich mit Teilstrukturen (Determinanten) auf der Oberfläche der Fremdstoffe, der *Antigene*, hochspezifisch zu verbinden und damit deren Elimination aus dem Körper in Gang zu bringen^[6,7].

Antikörper sind von V-Genen (variabler Teil; siehe Abschnitt 3) und von C-Genen (konstanter Teil) auf der DNA codiert. Beide Gengruppen sind auf *einem* Chromosom lokalisiert, aber durch ein Intron getrennt, das für die Synthese keine Rolle spielt. Zur Synthese wird erst der komplette DNA-Abschnitt samt Intron in RNA transkribiert; das Intron wird dann herausgeschnitten, wodurch der verkürzte RNA-Strang, die mRNA, entsteht. Diese mRNA codiert die Sequenz der Aminosäurekette eines Antikörpermoleküls, das an den Ribosomen synthetisiert wird. Nach der Vereinigung von meist zwei schweren und zwei leichten Ketten über Disulfidbrücken und der Glykosylierung der schweren Ketten wird das fertige Antikörpermolekül aus der Plasmazelle geschleust.

Ein entscheidendes Funktionsmerkmal eines Antikörpermoleküls ist seine Spezifität für nur *eine* Determinante auf *einem* Antigen. Das heißt auch, daß eine immunologisch geprägte, enddifferenzierte B-Zelle und ihr korrespondierender Antikörperproduzent, die Plasmazelle, nur einen Antikörpertyp einer Spezifität herstellt, sozusagen einen *monoklonalen* Antikörper. Der Organismus produziert auf einen Antigenreiz aber immer eine Antikörperfamilie mit verwandtem Reaktions- und Spezifitätsmuster, also *heteroklonale* Antikörper; er ist damit wirkungsvoller in seiner Abwehr und vielfach abgesichert. Zu einer solchen Familie zählen Antikörper verschiedener Spezifitäten gegen unterschiedliche Determinanten auf einem Antigen, aber auch solche, die sich in der Paßform und dann auch in der Bindungsstärke unterscheiden. Es ist deshalb fast unmöglich, aus einem heteroklonalen Serum einen monoklonalen Antikörper zu isolieren, da sich in der Regel diese spezifitätsverwandten Antikörpermoleküle in ihren proteinchemischen Eigenschaften zu sehr gleichen. Die Isolierung einer Plasmazelle und die Anzüchtung eines Klons daraus zur Produktion einheitlicher (monoklonaler) Antikörper ist nicht möglich, da diese Zellen in Nährmedium nicht sehr lange überleben.

2.2. Antikörperbildung *in vitro*

Erst die bahnbrechenden Arbeiten von *G. Köhler* und *C. Milstein*^[5] haben die *in-vitro*-Synthese eines monoklonalen Antikörpers mit gewünschter Spezifität in praktisch beliebiger Menge möglich gemacht. Sie haben spezifisch gegen das zelluläre Antigen Schaferythrozyten geprägte B-Lymphozyten aus der Milz immunisierter Mäuse gewonnen, sie mit einer Maus-Myelomzelllinie (X63-Ag8) unter Zusatz eines fusionsfördernden Agens (Sendai-Virus, Polyethylen-glykol 4000; Dimethylsulfoxid) in engen Kontakt gebracht und damit eine Zellverschmelzung (*Hybridisierung*) erreicht. Das Fusionsgemisch wurde in einem selektiven Nährmedium (HAT-Medium, enthält Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) kultiviert, in dem nur *Hybridomazellen* wachsen können^[8,9].

Die Myelomzelle ist als Tumorzelle zwar unsterblich und wächst in Nährmedium, ihr fehlt aber das Enzym Hy-

poxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), und sie kann in HAT-Medium nicht überleben. Aminopterin, ein Antagonist der Folsäure-Reduktase, blockiert den Hauptsyntheseweg für Purine und Thymidin. Somit können sich in HAT-Medium nur Zellen vermehren, die das Enzym HPRT besitzen, das für den Seitenweg der DNA-Synthese exogen zugeführtes Hypoxanthin brauchbar macht. Hybridomazellen sind HPRT⁺ und enthalten außerdem auch das Enzym Thymidin-Kinase (sie sind TK⁺), womit sie exogen zugeführtes Hypoxanthin und Thymidin über den Syntheseseitenweg verwerten können. Dies ist auch bedeutsam für Varianten von Myelomlinien, die auf einen Thymidin-Kinase-Defekt hin selektiert worden sind^[8, 10].

Die Hybridzellen sind nicht alle automatisch brauchbare Produzenten für monoklonale Antikörper, denn sie enthalten Chromosomen beider Elternlinien und können prinzipiell je zwei Arten schwerer und leichter Antikörperketten herstellen. Ein monoklonaler Antikörper besteht aber nur aus je einer Art schwerer und leichter Ketten, die nur von den Chromosomen der Milzzelle codiert werden sollten, denn über die Spezifität der fusionierten Milzzelle wird die Antikörperspezifität selektiert. Während der ersten Zellteilungen verlieren Hybridzellen Chromosomen, es verringert sich die Chromosomenzahl von etwa 112 (40 vom B-Lymphoblasten und 72 von der Myelomzelle) auf eine stabile Anzahl von etwa 70 bis 80. Damit können die Proteine nicht mehr synthetisiert werden, die auf den verlorengegangenen Chromosomen codiert sind; es findet also ein Reinigungsprozeß während dieser Phase der Klonierung statt. Daher muß man besonders sorgfältig auf brauchbare Klone selektieren, um die gewünschten Hybridome und monoklonalen Antikörper zu erhalten. Die selektierten und stabilisierten Klone werden schließlich nach Elimination und Absterben aller unerwünschten Zellen und unbrauchbaren Hybridzellen kontinuierlich in Gewebekultur oder in der Bauchhöhle der Maus (höhere Antikörperausbeute) vermehrt. Zur Stammhaltung werden Anteile in flüssigem Stickstoff eingefroren; sie können so praktisch unbegrenzt aufbewahrt und jederzeit wieder in Zellkultur genommen werden.

3. Antikörper: Grundstruktur und Funktion

Die Strukturaufklärung der Antikörpermoleküle von der Primärstruktur bis hin zum exakten dreidimensionalen Aufbau^[11-13] brachte Erkenntnisse über ihre Biosynthese und ihre genetische Determination und ermöglichte ein weiterführendes Verständnis ihrer biologischen Bedeutung und Funktion.

Alle Antikörpermoleküle sind nach dem gleichen Schema aufgebaut, wobei sie vier Strukturbesonderheiten gemeinsam haben (Abb. 1)^[14, 15]:

- Antikörper sind symmetrisch und bestehen beim Immunglobulin G (IgG) aus zwei gleichlangen, schweren H-Ketten (50 kDa) sowie aus zwei gleichlangen, leichten L-Ketten (25 kDa). Die L-Ketten flankieren die H-Ketten von deren Aminoende her; L- und H-Ketten sind über verschiedene Bindungsarten miteinander verknüpft. Es konstituieren sich so zwei antigenbindende Molekülbereiche, die Fab-Teile (*Fragment antigen binding*).

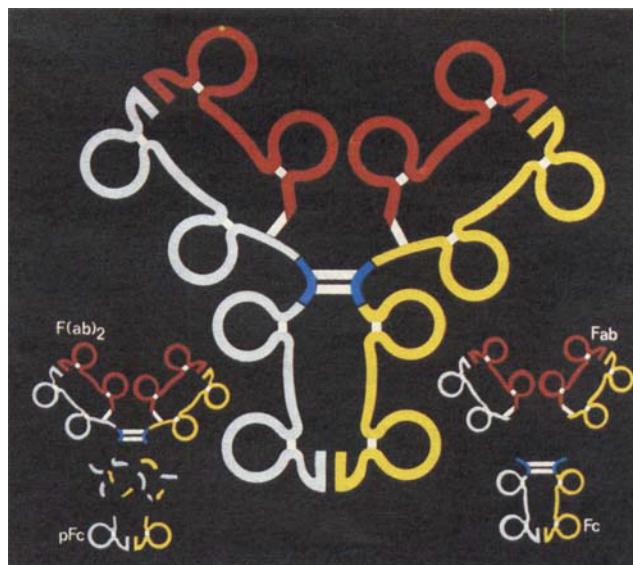


Abb. 1. Modell eines Immunglobulin G-Moleküls. Rot: leichte Ketten (L-Ketten); hellblau und gelb: schwere Ketten (H-Ketten); dunkelblau: Gelenkstück (hinge-Region); weiß: Disulfidbrücken. Links unten: Ergebnis der Spaltung mit Pepsin [F(ab')₂ und pFc]. Rechts unten: Ergebnis der Spaltung mit Plasmin oder Papain [Fab und Fc]. Weitere Details siehe Text.

ding). Die noch freien Hälften der H-Ketten verbinden sich miteinander und bilden den Molekülstamm (Fc-Bereich; *Fragment crystallizable*). Die Gesamtstruktur hat dann die T- oder die bekanntere Y-Form (Abb. 1).

- Sowohl die H- als auch die L-Ketten setzen sich aus einem Grundbaustein zusammen, bei dem es sich um eine in ungefähr gleicher Weise gefaltete Polypeptidkette (Faltblattstruktur) mit jeweils etwa 110 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 12 kDa handelt. Die L-Ketten bestehen immer aus zwei solcher Grundbausteinen (Domänen), die H-Ketten von IgG beispielsweise aus vier und die von IgM aus fünf. Die Domänen sind über kurze, bewegliche Polypeptidstücke (*switch region*) verbunden, die im Bereich der Verknüpfung der H-Ketten über Disulfidbrücken das funktionell wichtige Gelenkstück (*hinge region*) des Antikörpermoleküls enthalten. Diese Region erlaubt eine große Beweglichkeit der Fab-Arme bei der Interaktion mit dem Antigen; sie ist aber auch besonders exponiert für den Angriff von Proteasen. So spalten die Enzyme Plasmin, Papain und bestimmte Leukozyten-Proteasen das IgG-Molekül in einen Fc- und zwei Fab-Fragmente (Abb. 1, unten rechts). Pepsin und bestimmte Gewebskathepsine spalten IgG in das noch bivalent bindungsfähige F(ab')₂- und in das pFc-Fragment (Abb. 1, unten links).
- In den jeweils ersten N-terminalen Domänen der H- und L-Ketten gibt es variable Sequenzen (V-Domänen), während alle übrigen Domänen einer jeweiligen Immunglobulinklasse weitgehend konstante Aminosäuresequenzen haben (C-Domänen). Die C-Domänen garantieren somit die strukturelle und funktionelle Einheitlichkeit einer Ig-Klasse, während die V-Domänen mit den jeweils drei oder vier hypervariablen Regionen die Spezifitätsvielfalt für die Bindung aller möglichen Antigene bedingen. Zur Bindung eines Antigens bilden die V-Domänen von H- und L-Ketten zusammen eine Paßform, die sozusagen als Hand des Antikörpermoleküls das Antigen greifen und festhalten.

- Ein wesentliches und stabilisierendes Strukturmerkmal sind die Disulfidbrücken. Jede Domäne enthält eine intrachenare Brücke im Faltblattbereich. Die L-Ketten sind mit den H-Ketten und diese auch miteinander in der hinge-Region über interchenare Disulfidbrücken verknüpft. Innerhalb der Subklassen variiert die Anzahl der Brücken zwischen den H-Ketten. Kohlenhydratreste sind in der C_{H2}-Domäne lokalisiert; sie verhindern eine intensive Protein-Protein-Interaktion in diesem Domänenbereich.

3.1. Human-Immunglobuline

Wie die Zusammenstellung der Human-Immunglobuline in Abbildung 2 zeigt, gibt es bei aller Einheitlichkeit im Aufbau der Immunglobuline auch deutliche Unterschiede: in der Anzahl der die H-Ketten bildenden Domänen, der Anzahl und Lokalisierung von Disulfidbrücken und im Zusammenbau der Grundmoleküle, beispielsweise zu Dimeren (IgA) oder Pentameren (IgM). Die Immunglobulinklassen werden als IgG, IgA, IgM, IgD und IgE entsprechend ihrer unterschiedlich aufgebauten H-Ketten und der damit verschiedenen Gesamtstruktur definiert; die H-Ketten wiederum werden mit den korrespondierenden griechischen Buchstaben benannt (γ , α , μ , δ und ϵ -Kette). Für die L-Ketten aller Immunoglobulinklassen und -subklassen (z. B. IgG1 bis IgG4) gibt es nur zwei Varianten, Kappa- und Lambda-Ketten (κ und λ).

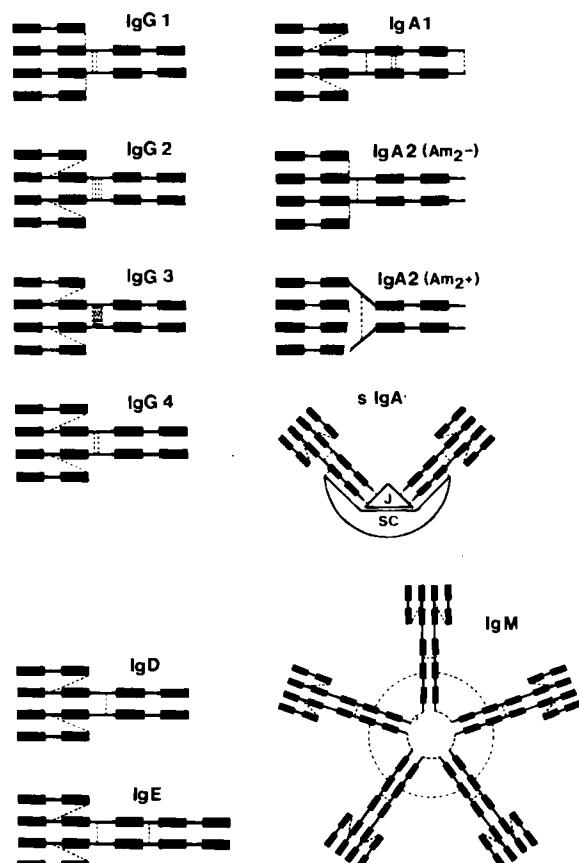


Abb. 2. Modellstrukturen der Klassen der Human-Immunglobuline und der Subklassen von IgG und IgA. Die Ketten setzen sich aus gleichartigen, aneinander gereihten Bauelementen, den Domänen (■) zusammen; diese sind über Switch-Peptide (—) und Disulfidbrücken (---) verbunden. J: J-Kette; SC: sekretorische Komponente. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die fünf immunologisch und biochemisch gut unterscheidbaren Klassen von Antikörpermolekülen kommen im Organismus in stark unterschiedlichen Mengen vor und erfüllen dort auch verschiedene Funktionen. Neben den unterschiedlichen Molekulargewichten, den verschiedenen Halbwertszeiten etc. sind vor allem die immunologischen Besonderheiten der einzelnen Ig-Klassen hervorzuheben: IgE ist der Hauptmediator der Allergie, IgD wahrscheinlich ein wichtiger Rezeptor auf lymphoiden Zellen in der Frühphase der Differenzierung, IgM der natürliche Antikörper der ersten Abwehrphase in der sogenannten Primärreaktion mit besonderer Bedeutung für die Lyse von Bakterien, IgA der Hauptträger der Abwehr in Sekreten und auf Schleimhäuten mit auffälligen Aktivitäten gegen Viren und das sekretorische IgA der wichtigste Antikörper im Colostrum. Für IgA gibt es einige Strukturvarianten, die auch funktionelle Bedeutung haben. Das IgA-Dimer, über eine J-Kette verbunden und mit einer *sekretorischen Komponente* versehen, ist die säureresistente Form von IgA. IgG, das fast alle Funktionsmerkmale von Antikörpern aufweist, hat darüber hinaus noch die Aufgabe des passiven Immunschutzes beim Föten wahrzunehmen, da es als einziges Immunglobulin die Placentaschanke passieren kann. IgG macht 75 bis 80% der Immunglobuline im Organismus aus: Etwa 180 g Blut mit 80 g zellfreiem Plasma enthalten rund 1.3 g Immunglobuline; davon ist rund 1 g IgG.

Neben Strukturvarianten von IgA gibt es auch vier Subklassen von IgG, die sich hauptsächlich durch Anzahl und Lage der Disulfidbrücken unterscheiden. Bemerkenswerte funktionelle Unterscheidungsmerkmale sind derzeit noch kaum bekannt. IgG1 macht etwa 60%, IgG2 etwa 30% des Gesamt-IgG aus, und nur je 5% entfallen auf IgG3 und IgG4.

3.2. Maus-Immunglobuline

Wegen Schwierigkeiten bei der Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern (siehe Abschnitte 5.4.4) spielen Antikörper der Maus noch die Hauptrolle. Eine Zusammenstellung der Maus-IgG-Subklassen, die als mo-

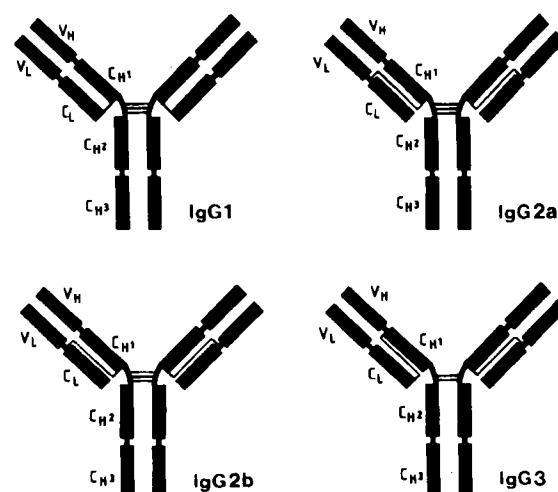


Abb. 3. Modellstrukturen der IgG-Subklassen der Maus. Vergleiche auch mit Abbildung 2.

noklonale Antikörper bekannt sind, findet sich in Abbildung 3, wobei IgM nicht enthalten ist. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, daß Kenntnisse über Human-Antikörper wegen der Strukturverwandtschaft grundsätzlich auf die der Maus übertragbar sind; sekundäre Funktionen, die über den Fc-Teil der Antikörper verursacht werden, unterscheiden sich jedoch wesentlich, wie dies ja auch innerhalb der humanen Ig-Klassen gilt. Bei der in-vivo-Anwendung von Maus-Immunglobulinen am Menschen spielt die Reaktivität des Fc-Teils mit humanen Fc-Rezeptorstrukturen eine wichtige Rolle.

Fc-vermittelte Antikörperwirkungen

Früher dachte man bei Antikörpern vor allem an spezifische Abwehr und Kontrolle von infektiösen Erregern und Giften. Heute weiß man, daß es notwendig ist, Folgereaktionen zu berücksichtigen, die überwiegend Fc-vermittelt sind. Diese Reaktionen haben kontrollierende und regulatorische Funktionen (Tabelle 1). Außerdem sind Antikörper nicht nur humoral aktiv, sondern sie vermitteln auch zwischen zellulärer und humoraler Immunität über Fc-be dingte Mechanismen.

Tabelle 1. Fc-vermittelte Reaktionen und Funktionsmerkmale von IgG, die meist erst durch Antigen-Antikörper-Interaktion induziert werden.

Bindung an Fc-Rezeptoren im Organismus
Regulation der IgG-Synthese: positive/negative Rückkopplung
Komplementaktivierung über C1q (klassisch)
Phagozytose (wenn über Fc-Rezeptoren vermittelt)
Thrombozytenaktivierung und -aggregation
Antikörper-vermittelte zelluläre Cytotoxizität (ADCC)
biologische Halbwertszeit der Antikörper (durch Kohlenhydrat der Cy2-Domäne)
Placentalpassage (passive Immunität des Foetus)

Zur Induktion der Fc-Aktivität bedarf es zunächst der Bindung des Antikörpers an das passende Antigen, die üblicherweise zur Vernetzung oder Polymerisierung im Antigen-Antikörper-Komplex führt, oder einer antigenunabhängigen, artifiziellen in-vitro-Aggregation, die gewöhnlich während der üblichen Isolierungsverfahren für IgG aus dem Serum geschehen kann. Jedenfalls müssen die Fc-Teile mehrerer Immunglobulinmoleküle zusammenkommen, damit Reaktionsfolgen initiiert werden.

Der Fc-Stamm bindet an den Fc-Rezeptor, der auf sehr unterschiedlichen Kompartimenten des Körpers zu finden ist. Am besten bekannt ist sein Vorkommen auf den Oberflächenmembranen verschiedener Zellen. Gut untersucht sind beispielsweise bestimmte Lymphozytenpopulationen, Granulozyten, Makrophagen, Thrombozyten und Mastzellen.

Eine wichtige Rolle spielt der Fc-Rezeptor und damit der Fc-Teil des Antikörpers in der Steuerung der Antikörperf bildung; so ist für IgG eine negative Rückkopplung auf die Synthese nachgewiesen worden.

Zu den wichtigen Sekundärfunktionen als Folge der Bindung von Antikörpern an das Antigen gehört die Aktivierung des Komplementsystems. Dies ist ein Plasmaproteinsystem aus mittlerweise gut charakterisierten Einzelkomponenten (je nach Betrachtungsweise zehn bis zwanzig); dazu zählen Proenzyme und Enzyme, Aktivatoren und Inhibitoren, die durch Aktivierung der Starterkomponenten (C1 oder C3) in einer kaskadenartigen Reaktionsfolge eine Reihe wichtiger biologischer und physiologischer Prozesse

steuern. Diese können humoraler (besonders über die Anaphylatoxine C3a und C5a) oder zellulärer Art sein (Übersichten in: [6,7]). Am wichtigsten ist meist die lytische Zerstörung der betroffenen Zellen, zellulären Organismen oder Bakterien.

Die Aktivierung des Komplementsystems geschieht entweder auf dem *klassischen Weg*, wobei C1 aktiviert wird und C1q zunächst an die Fc-Teile (z. B. von Immunkomplexen) gebunden werden muß, oder über den *alternativen Weg* („Properdin-Weg“), der erst mit der Spaltung von C3 in C3b und C3a beginnt, nicht Fc-abhängig ist und auch als zellständiger Mechanismus in Verbindung mit Makrophagen gesehen werden kann [16,17]. Demnach mündet der klassische Weg über die für ihn spezifische Startreaktionssequenz (C1→C4→C2) in den alternativen. Eine Spaltung von C3 und damit eine Aktivierung des alternativen Wegs ist jedoch auch durch einige Enzyme, z. B. Plasmin, Thrombin, Gewebs- und Bakterienproteasen, sowie durch verschiedene andere Substanzen möglich.

Eine vereinfachte und noch sehr vorläufige Zusammenstellung einiger Fc-Funktionen der Maus-IgG-Subklassen findet sich in Tabelle 2. Vor allem für die Reaktion von Maus-IgG mit humanen Zellen, die Fc-Rezeptoren tragen, gibt es nur spärliche Informationen vergleichender Untersuchungen; diese Angaben sind obendrein nur schematisiert zu bewerten. Es sind einige Fc-Funktionen ausgewählt, die bei den später zu behandelnden technischen und medizinischen Anwendungen wichtig sind.

Tabelle 2. Fc-abhängige Effektorfunktionen von Immunglobulin-Subklassen der Maus.

Sub- klassen	Komplement-Lysis (Kaninchen-C)	Staphylokokken-Protein A Bindung	Elution bei pH	Fc-Rezeptor (human)
IgG 1	—	+	6.0	+/-
IgG 2a	++	++	4.5-5.0	+
IgG 2b	+++	+++	3.0-3.5	+/-
IgG 3	+	++	4.0-4.5	+

4. Reinigung und Fragmentierung von Antikörpern

4.1. Isolierung

Hybridzellen, die monoklonale Antikörper produzieren, werden entweder in speziellen Nährmedien, die neben essentiellen Aminosäuren, Vitaminen und Salzen das Serumprotein Albumin oder fötales Kälberserum enthalten, oder in der Bauchhöhle von Mäusen vermehrt. Während in Zellkulturüberständen meist Antikörperkonzentrationen von 1–20 µg/mL erzielt werden, sind die in der serösen Flüssigkeit der Bauchhöhle (Ascites-Flüssigkeit) erreichbaren Werte bis um den Faktor 1000 höher. Da bei der Antikörperisolierung aus Zellkulturüberständen sehr große Volumen bewältigt werden müssen, wird manchmal trotz schwierigerer Trennprobleme aufgrund der viel größeren Produktvielfalt der zweite Kultivierungsmodus bevorzugt. Bei der Gewinnung aus Ascites-Flüssigkeit muß der monoklonale Antikörper aus einem Proteingemisch, das eine serumähnliche Zusammensetzung aufweist, isoliert werden (Abb. 4). Hierfür werden auch erfolgreiche Methoden eingesetzt, die sich bei der Reinigung polyklonaler Antikörper bewährt haben [18].

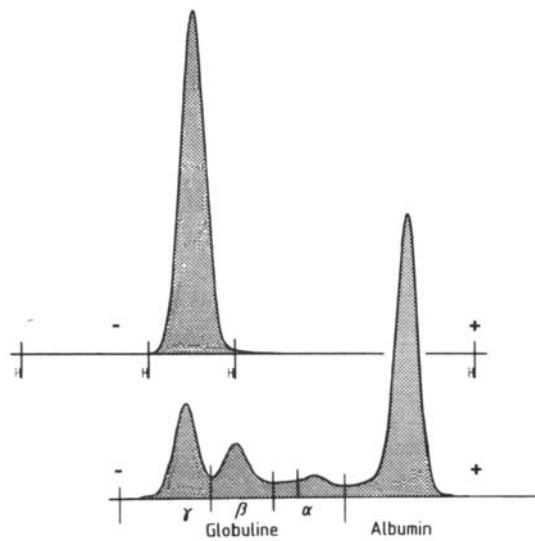


Abb. 4. Mikrozonenelektrophorese von Ascites-Flüssigkeit der Maus (unteres Profil) und der daraus isolierten IgG-Fraktion (oberes Profil).

Weil die etablierten Verfahren jedoch für polyklonale Immunglobulingemische optimiert wurden, können sich bei den monoklonalen Antikörpern dann besondere Probleme ergeben, wenn das Produkt eines Klons proteinchemisch beträchtlich von den Durchschnittseigenschaften eines heteroklonalen Gemischs abweicht. Deshalb empfiehlt es sich, bei der Isolierung eines monoklonalen Antikörpers Trennmethoden und -bedingungen spezifisch auf seine Eigenschaften hin auszuwählen und anzupassen^[19]. Die Gelfiltration, der die Molekülgöße als Trennprinzip zugrunde liegt, ist häufig ein geeigneteres Reinigungsverfahren als die Anionenaustauschchromatographie, bei der die zum Teil recht unterschiedliche Ladung der Antikörpermoleküle zur Anreicherung genutzt wird. Ebenso hat sich auch die fraktionierende Präzipitation mit Hilfe eines Neutralsalzes wie Ammoniumsulfat oder bei monoklonalen Antikörpern der Klasse IgG die Verwendung vonträgergebundenem Staphylokokken-Protein-A bewährt. Daran binden die IgG-Subklassen mit teilweise recht hoher Affinität, so daß die Trennung von anderen Proteinen der Ascites-Flüssigkeit in einem eleganten Einstufenverfahren erfolgen kann (siehe auch Tabelle 2)^[20-22].

Da die Ascites-Flüssigkeit eine serumähnliche Protein Zusammensetzung aufweist und somit auch polyklonale Immunglobulinanteile der „produzierenden“ Maus enthält, können sich weitere Probleme ergeben. Denn bei einem Klon von nur mäßiger Produktivität wird die spezifische Aktivität der die monoklonalen Antikörper enthaltenen Fraktion durch die nicht abtrennbaren polyklonalen Immunglobuline erniedrigt. Für die Herstellung sogenannter *Immunoxine* (siehe Abschnitt 5.4.2) sind diese Produkte weniger geeignet.

4.2. Enzymatische Fragmentierung

Bei der Herstellung bestimmter Antikörperfragmente mit Hilfe von Proteasen wie Pepsin, Plasmin oder Papain spielt die Subklassenzugehörigkeit eine wichtige Rolle (siehe Abb. 1). So führt im allgemeinen die klassische Methode, nach der aus humanem polyklonalem IgG natürlicher Subklassenzusammensetzung mit einer Pepsinfermen-

tation F(ab')₂-Fragmente gewonnen werden^[23], auch bei Mäuse-Antikörpern der Subklasse IgG2 zum Erfolg.

Aus der Subklasse IgG1 kann mit voraktiviertem Papain in einem thiolfreien Reaktionsmilieu nach vorheriger Optimierung von Enzymmenge und Fermentationsdauer, von Antikörper zu Antikörper durchaus variierende Parameter, eine F(ab')₂-Präparation hergestellt werden^[19]. Die Abwesenheit von SH-Agentien, die üblicherweise zur Papainaktivierung eingesetzt werden (Cystein, Mercaptoethanol, Dithiothreitol etc.), empfiehlt sich wegen der sonst möglichen Heterogenität der Reaktionsprodukte nach partieller Spaltung der drei Disulfidbrücken, die die schweren Ketten verknüpfen. Aus F(ab')₂-Präparationen können nun leicht durch eine reduzierende Spaltung der hinge-Region-Disulfidbrücken die monovalenten Fab'-Fragmente hergestellt werden. Eine Kombination aus Anionenaustausch- und Gelpermeationschromatographie ermöglicht meist in befriedigender Weise eine Trennung der IgG, F(ab')₂, Fab', Fc und Papain enthaltenden Reaktionsansätze.

Die Aussagen zur Isolierung und enzymatischen Spaltung monoklonaler Antikörper verdeutlichen, daß kein für alle Fälle gültiges Standardverfahren existiert, sondern daß individuelle, den gegebenen proteinchemischen Eigenschaften der betreffenden monoklonalen Immunglobuline angepaßte Methoden eingesetzt werden müssen.

5. Anwendungen monoklonaler Antikörper

5.1. Anwendung in Biochemie und Biotechnologie

Monoklonale Antikörper sind für vielfältige Anwendungen in der Grundlagenforschung verfügbar. Abgesehen von ihrer direkten medizinischen Verwendbarkeit (Abschnitt 5.4) wie beispielsweise der Herstellung von Antikörper-Arzneimittel-Konjugaten (z. B. Immunoxine; Abschnitt 5.4.2), sind vor allem die analytischen Möglichkeiten für alle naturwissenschaftliche Fachrichtungen enorm ausgeweitet worden; hierauf kann nur teilweise eingegangen werden (Abschnitte 5.2 und 5.3).

An eine feste Phase gebundene monoklonale Antikörper eignen sich in der Affinitätschromatographie als Hilfsmittel zur Isolierung bestimmter Antigene aus einer heterogenen Mischung. Die Isolierung von Interferon oder anderen Immunfaktoren sei als Beispiel hierfür erwähnt^[24]. Ebenso werden monoklonale Antikörper in der Gentechnologie zu diesem Zweck verwendet. So kann man mit ihrer Hilfe über Genbanken, die in *E. coli* oder λ-Phagen kloniert wurden, DNA-Fragmente isolieren, die interessant erscheinende Epitope (Antigendeterminanten) viraler Hüllproteine codieren^[25].

Die Kombination monoklonaler Antikörper verschiedener Spezifitäten erlaubt häufig aufgrund charakteristischer Reaktionsmuster die Unterscheidung und Klassifizierung von Antigenen. In diesem Zusammenhang sei auch auf die Charakterisierungsmöglichkeit diverser Zellsubpopulationen hingewiesen (siehe Abschnitt 5.3)^[26, 27].

Häufig werden in der Proteinchemie Konformationsänderungen als auslösendes Prinzip bestimmter Reaktionsfolgen diskutiert. Als Beispiel sei hier die Aktivierung der ersten Komplementkomponente, des C1-Komplexes, auf dem klassischen Weg angeführt. Dieser Aktivierungsvor-

gang kann durch eine Wechselwirkung der C1q-Subkomponente mit Antigen-Antikörper-Komplexen ausgelöst werden. Primär ändert sich die Konformation der Subkomponente, wobei ein Epitop freigelegt wird, dessen Nachweis erst kürzlich mit Hilfe eines monokonalen Antikörpers gelang^[28].

Nicht nur Konformationsänderungen, sondern auch enzymatische Spaltungen sind für viele kaskadenartig ablaufende Reaktionsfolgen eine notwendige Voraussetzung (Komplementaktivierung, Blutgerinnung etc.). Bei derartigen Prozessen wird meist ein Reaktionspartner, der keine enzymatische Aktivität aufweist (*Zymogen*), durch eine spezifische Protease gespalten, die ihm in der Aktivierungskaskade eine Stufe vorgelagert ist. Durch diesen Vorgang wird das Zymogen zu einem Enzym, das die Reaktionsfolge fortsetzen kann. Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 5 skizziert. Das Zymogen sei ein typisches Protein mit einem Satz antigener Determinanten (A, B, C und D), die sich mit entsprechenden monokonalen Antikörpern gut einzeln nachweisen und identifizieren lassen. Nach enzymatischer Spaltung und der damit verbundenen Strukturänderung entstehen neue Epitope (E und F), gegen die wiederum monoklonale Antikörper produziert werden können. Mit deren Hilfe lassen sich nun die neu entstandenen Enzyme selektiv und spezifisch nachweisen, was mit polyklonalen Antikörpern oft nicht oder nur unter erheblich größeren Schwierigkeiten möglich wäre.

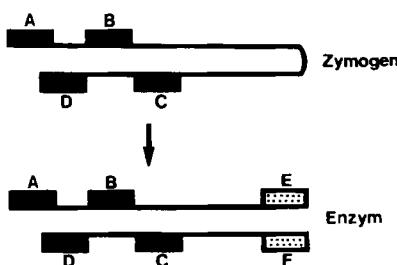


Abb. 5. Oben: Schematische Darstellung einer Polypeptidkette mit vier verschiedenen Epitopen (A, B, C und D). Unten: Durch eine enzymatische Spaltung der Kette entstehen zwei neue antigenen Determinanten (E und F).

Antikörper können als meist bivalente Moleküle mit Antigenen genügender Größe und ausreichender Zahl antigener Determinanten präzipitierende Immunkomplexe bilden. Der Einfluß molekularer Parameter, wie Konzentration, Affinität oder Heterogenität der verschiedenspezifischen, am Präzipitationsvorgang beteiligten Antikörperfpopulationen ist mit polyklonalen Antikörpermischungen nur bedingt zu untersuchen. Definierbare Reaktionsbedingungen sowie monoklonale Immunglobuline und Kombinationen davon können auch hier helfen, ungelöste Probleme zu bearbeiten.

Auch das Studium der Antikörperstruktur und -vielfalt, der Variabilität der Antigenbindungsstellen sowie spezieller Molekülbereiche (z. B. des Fc-Teils), an die häufig Effektorfunktionen geknüpft sind, wird durch monoklonale Antikörper möglich. Damit können Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung sowie der genetischen Determination und der individualspezifischen Bedeutung besser untersucht werden.

Diese Beispiele sollten nur einen kleinen Eindruck von den vielen Verwendungsmöglichkeiten monoklonaler Anti-

körper vermitteln und verdeutlichen, welch wertvolles Werkzeug dem Naturwissenschaftler damit zur Verfügung steht.

5.2. Allgemeine Diagnostik

5.2.1. Vorteile monoklonaler Antikörper bei Immunoassay-Systemen

Polyklonale Antiseren sind durch ihre Heterogenität charakterisiert. Die Benutzung hochreiner Antigene zur Immunisierung, die spezielle Auswahl von Tieren und Immunadsorptionstechniken haben zwar schon in der Vergangenheit die Entwicklung von sensitiven Testsystemen mit hoher Spezifität und Reproduzierbarkeit ermöglicht, die Probleme blieben jedoch bei diesen Antiseren: So unterscheiden sich Serumcharge, die von verschiedenen Tieren oder Tiergruppen oder von einem Tier zu verschiedenen Zeiten gewonnen werden, in ihrer Antikörperzusammensetzung; sie zeigen in der Regel keine identischen Reaktionsmuster. Darüber hinaus ist der niedrige Anteil von spezifischen Antikörpern (ca. 1–15%) sehr oft von Nachteil.

Aufgrund ihrer großen Spezifität, Identität und unbegrenzten Verfügbarkeit bieten sich monoklonale Antikörper heutzutage als diagnostische Reagenzien an. Speziell für Immunoassay-Systeme haben sie zahlreiche Vorteile. Am meisten werden *kompetitive Bindungstests* (RIA, EIA; Abb. 6a) sowie *Sandwich-Tests* (IRMA, ELISA; Abb. 6b) benutzt. In kompetitiven Tests werden markierte Antigene, in Sandwich-Tests markierte Antikörper verwendet. Bis jetzt sind beide Systeme mit wesentlichen Nachteilen behaftet. Die kompetitiven Tests benötigen reines Antigen, welches ohne Änderung der Immunreakтивität markiert

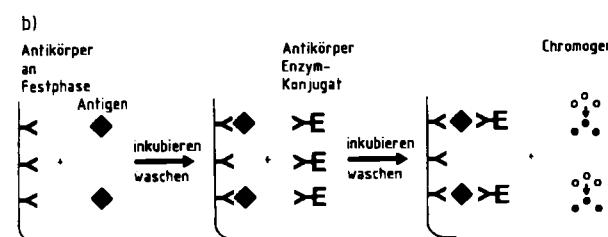
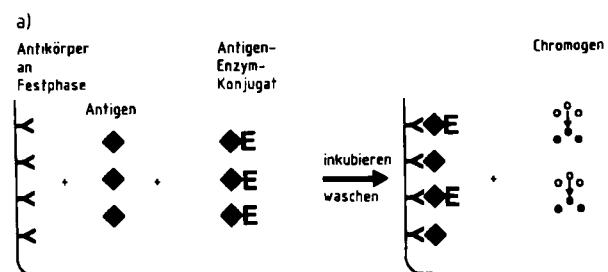


Abb. 6. a) Prinzip der kompetitiven Immunoassays: RIA = Radioimmunoassay; EIA = Enzymimmunoassay. Das mit einem Enzym E markierte Antigen und unmarkiertes Antigen reagieren kompetitiv mit dem trägegebundenen Antikörper, so daß sich die unbekannte Menge Antigen bestimmen läßt, wenn zum Vergleich eine Reaktion mit reinem Antigen bekannter Konzentration durchgeführt wird. Ein Reagensüberschuß ist zu vermeiden. b) Prinzip der Sandwich-Immunoassays: IRMA = Immunoradiometrischer Assay; ELISA = Enzyme-linked-immunosorbent-assay. Das zu bestimmende Antigen wird vom trägegebundenen Antikörper gebunden und durch einen enzymmarkierten Zweitantikörper quantitativ bestimmt. Diese Testsysteme benötigen größere Mengen an gereinigtem (hochspezifischem) Antikörper und können mit einem Reagensüberschuß ablaufen.

werden muß, die Referenzkurve ist nicht linear, und die Reaktion kann nicht in Gegenwart eines Überschusses an Reagens ablaufen.

Beim Sandwich-Test benötigt man große Mengen affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper. Da eine Mischung von Antikörpern unterschiedlicher Affinitätskonstanten vorliegt, ist die Eichkurve nur in einem schmalen Testbereich linear. Ein Vorteil gegenüber kompetitiven Tests ist die Möglichkeit, Festphase und markierte Antikörper im Überschuß einzusetzen, wodurch für den Test eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden kann. IRMA und ELISA sind daher Testsysteme, die die Vorteile monoklonaler Antikörper, nämlich Spezifität, Identität und unbeschränkte Verfügbarkeit, voll ausschöpfen können.

Beim Sandwich-Test (Abb. 6b) wird die Festphase (Mikrotiterplatten, Röhrchen, Glas- und Plastikperlen) mit monoklonalen Antikörpern beschichtet. Im ersten Schritt reagiert das Antigen mit dem an die Festphase gebundenen Antikörper. Im zweiten Inkubationsschritt reagiert ein isotopenmarkierter oder enzymmarkierter monoklonaler Antikörper mit dem Festphasen-Antikörper-Antigen-Komplex. Die Proben werden in einem γ -Szintillationszähler ausgewertet, oder es wird eine Substratlösung zu den Proben zugegeben und die Enzymaktivität bestimmt. Die Antigenkonzentration wird mittels einer Referenzkurve ermittelt.

Die Vorteile von monoklonalen Antikörpern bei Immunoassay-Systemen können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Einheitliche Affinitätskonstanten und Homogenität des Materials ermöglichen meist kürzere Inkubationszeiten.
- Ausgezeichnete Standardisierung der Reagenzien erlaubt eine höhere Reproduzierbarkeit.
- Durch die homogene Affinität monoklonaler Antikörper wird die Festphase optimaler ausgenutzt. Verfälschungen (high-dose hook effects), die bei hohen Antigenmengen in Testproben auftreten können, werden teilweise vermieden.
- Hat man zwei monoklonale Antikörper gefunden, die zwei Epitope eines Antigens erkennen und in einem Sandwich-Assay zusammenwirken, dann reicht ein Inkubationsschritt, da die an die Festphase gebundenen Antikörper und die markierten Antikörper nicht um die Bindungsstellen konkurrieren.
- Die Eichkurven sind über einen größeren Meßbereich linear, so daß die Zahl der Eichpunkte verringert werden kann.
- Mit monoklonalen Antikörpern unterschiedlicher Affinitätskonstanten können die Empfindlichkeit und der Meßbereich des Testsystems variiert werden^[29].

5.2.2. Anwendungsbeispiele

Wirkstoffnachweis (drug monitoring)

Der erste Immunoassay für einen Wirkstoff wurde ungefähr 15 Jahren für Digoxin, ein Herzglykosid, beschrieben. Heute ist der Nachweis von Substanzen im nanomolaren Bereich möglich, und die aktive Form eines Wirkstoffs kann von nahe verwandten Metaboliten unter-

schieden werden. Es gibt schon zahlreiche Veröffentlichungen, die die Anwendung monoklonaler Antikörper für das *drug monitoring* beschreiben. Wiederum zuerst wurde Digoxin untersucht, da es ein ungeladenes und chemisch gut definiertes Hapten ist. Margolis et al. und Mudgett et al.^[30,31] erhielten hochaffine monoklonale Antikörper, die eine Molekülunterscheidung erlaubten, wie sie mit konventionellen Digoxin-spezifischen Antiseren nicht möglich gewesen war.

Kato et al.^[32] haben monoklonale Antikörper gegen das Antitumormittel Methotrexat (MTX) hergestellt. Kompetitive Bindungs-RIAs ergaben, daß die Spezifitätsmuster für monoklonale und konventionelle Antikörper für MTX und Strukturanaloga ähnlich waren, obwohl die monoklonalen Antikörper weniger stark mit Folsäure und anderen Derivaten kreuzreaktierten. Hoebeke et al.^[33] konnten hochaffine monoklonale Antikörper gegen β -adrenerge Liganden und tricyclische Antidepressiva (Alprenolol, Nortriptylin) herstellen. Außer für das Studium der Rezeptor-Ligand-Strukturbeziehungen könnten die Antikörper auch zur quantitativen Bestimmung dieser Substanzen in biologischen Flüssigkeiten verwendet werden.

Tumormarker-Diagnostik

Monoklonale Antikörper sind besonders für die Tumordiagnostik und den Nachweis tumorassozierter Antigene geeignet (Abschnitt 5.3). Gegen die bereits existierenden Marker, wie das carcinoembryonale Antigen (CEA), α -Fetoprotein (AFP), Choriogonadotropin (human chorion gonadotropin, hCG), β_2 -Mikroglobulin (β_2 M), Ferritin und die saure Prostata-Phosphatase sind schon häufig monoklonale Antikörper hergestellt worden, und es gibt gute Hinweise, daß damit in der Tumordiagnose und -überwachung eine höhere Spezifität und Empfindlichkeit erreicht werden kann (siehe auch Abschnitt 5.4.1)^[34-36].

Weitere und neue Antigene werden mit monoklonalen Antikörpern erfassbar (siehe auch Abschnitte 5.3.4 und 5.4). Koprowski et al. beschrieben einen monoklonalen Antikörper, der spezifisch mit einem Oberflächenantigen auf colorectal Tumorzellen reagiert^[37]. Dieses Antigen wurde später als Kohlenhydratantigen CA 19-9 bezeichnet. Mit einem Inhibition-RIA konnten die Autoren zeigen, daß erhöhte CA-19-9-Spiegel nur in Seren von Patienten mit Tumoren im colorectal Bereich, im Magen und im Pankreas auftreten. CA 19-9 könnte also ein nützlicher Tumormarker sein. Dies gilt ebenfalls für CA 125, ein weiteres Kohlenhydratantigen. Bast et al. haben einen monoklonalen Antikörper gegen dieses Antigen beschrieben, das auf den meisten nicht-mucösen, epithelialen Ovarialcarcinenomen exprimiert ist^[38].

Polypeptidhormone

Ein weiterer wichtiger Anwendungsbereich ist der spezifische Nachweis von Polypeptidhormonen. Die Hypophysenhormone Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH), Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) sowie hCG sind komplexe Moleküle mit einer Vielzahl von Antigendeterminanten. Diese Glykoproteine haben die gleichen α -Untereinheiten und unterscheiden sich nur in Teilen ihrer β -Untereinheiten. Durch die Schwierigkeiten, spezifische Antiseren gegen sie herzustel-

len, war es bis jetzt kaum möglich, gute immundiagnostische Testsysteme zu entwickeln.

Heute gibt es monoklonale Antikörper mit Spezifität für die α - oder β -Untereinheit^[39] und für Konformationsepitope^[40], die nur mit dem intakten Molekül reagieren. Durch Kombination dieser drei Antikörpertypen können Testsysteme entwickelt werden, in denen entweder nur das intakte Molekül oder nur die freie Untereinheit nachgewiesen wird.

Frühere Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern ließen einige Nachteile im Präzipitations- und Agglutinationsverhalten erwarten. In den letzten Jahren wurden jedoch auch solche beschrieben, die sehr wohl zur Präzipation und Agglutination in der Lage sind^[41]. Rahamim et al. erhielten einen monoklonalen Antikörper gegen die β -Untereinheit von hCG, der hCG-beschichtete Erythrozyten agglutiniert. Aufgrund der Empfindlichkeit, Spezifität und Affinität eignet sich dieser monoklonale Antikörper zum Nachweis von hCG in biologischen Flüssigkeiten sehr gut. Weitere interessante monoklonale Antikörper wurden auch gegen L-Thyroxin, T4, und L-Triiodthyronin, T3, entwickelt^[42]. Sie haben eine verbesserte Spezifität und werden schneller gebunden.

Mikrobiologische Diagnostik

Wichtig sind monoklonale Antikörper für die differentielle Diagnose viraler, bakterieller und parasitärer Infektionskrankheiten geworden, da mit ihnen die Erreger spezifisch nachgewiesen werden können. Es wurden sogar völlig neue Diagnosemöglichkeiten erschlossen. So konnten Wiktor et al.^[43] an Gehirnzellausstrichen Tollwut-infizierte Tiere zuverlässig erkennen. Auch die Diagnose von Krankheiten, die durch sexuellen Kontakt übertragen werden, wie *Herpes*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* wurde erleichtert^[44]. Bis vor kurzem war der direkte Nachweis von Chlamydia-Infektionen überhaupt noch nicht möglich. Mit monoklonalen Antikörpern ergeben urethrale und cervicale Ausstriche mit der Immunfluoreszenztechnik für Chlamydia-Infektion bereits nach 30 min charakteristische Reaktionsmuster. Diese Resultate wurden durch Ruijs et al.^[45] bestätigt, die den raschen Nachweis von *C. trachomatis* aus urethralen Ausstrichen und Harnsedimenten durch monoklonale Antikörper mit konventionellen Kulturmethoden verglichen.

Auch die Klassifizierung von Herpes-simplex-Viren (HSV) in zwei Subgruppen erbrachte, wie Nowinski et al.^[44] über Immunfluoreszenzstudien mit HSV-I- und -II-spezifischen, monoklonalen Antikörpern zeigten, eine völlige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Restriktionsendonuclease-Analyse der viralen DNA. Franz^[46] gelang ebenfalls eine Differenzierung von HSV I und II in einem ELISA-Test.

Manchmal haben monoklonale Antikörper bei viralen oder bakteriellen Infektionen eine zu hohe Spezifität, insbesondere, wenn bei einer Vielzahl von Stämmen keine gemeinsame Antigendeterminante vorhanden ist. Dann kann jedoch oft eine Mischung von monoklonalen Antikörpern zur Immundiagnose angewendet werden. Beispielsweise haben Nowinski et al. eine Mischung von drei monoklonalen Antikörpern für ihre Studien mit *Neisseria gonorrhoeae* genutzt^[44]. Diese Mischung identifizierte 99.6% der getesteten Proben ohne Kreuzreaktion mit 17 anderen Neisseria-verwandten Spezies.

Weiterhin werden monoklonale Antikörper in IgM-Antikörpertests benutzt: Die Bestimmung von viruspezifischen IgM-Antikörpern ist oft vorteilhafter für den Nachweis von frischen Virusinfektionen als die Messung des IgG-Antikörpertiteranstiegs (siehe Abschnitt 3.1). Die Antikörper werden als Antihuman-IgM-Fängerantikörper auf der Festphase eingesetzt^[47].

Wands et al.^[48] verbesserten mit hochaffinen monoklonalen Antikörpern den Nachweis des Hepatitis-B-Oberflächenantigens (HBsAg) in Humanseren. Richman et al.^[49] konnten Influenzaviren in Zellkulturen nachweisen, die zuvor mit Untersuchungsproben von erkrankten Patienten infiziert worden waren. Mit monoklonalen Antikörpern sollte auch der Nachweis der Antigenvariation auf Influenzavirusmolekülen möglich sein; dies wäre von sehr großem epidemiologischen Interesse.

5.2.3. Heterobispezifische Antikörper

Heterobispezifische Antikörper (Hybridantikörper) sind durch zwei Bindungsstellen charakterisiert, die von zwei verschiedenen Immunglobulinen herrühren. Die beiden Bindungsstellen können gegen unterschiedliche Epitope eines Antigens gerichtet sein, oder sie zeigen ähnliche Spezifität bei unterschiedlichen H-Ketten aufgrund der Zusammensetzung aus verschiedenen Subklassen. Hybridantikörper können sehr große Vorteile bei Immuntests, in der Immunhistochemie und in der Immuntherapie aufweisen.

Bis vor kurzem konnten Hybridantikörper nur auf chemischem Weg hergestellt werden. Disulfidbrücken wurden durch vorsichtige Reduktion selektiv gespalten, und die dissozierten Halbmoleküle von zwei unterschiedlichen Immunglobulinen wurden dann wieder – ebenfalls vorsichtig – oxidativ verknüpft.

Ein neuer, eleganter Weg wurde durch die Hybridomatechnik gangbar. Wenn Zellen zweier Hybridklone fusioniert werden, sind die daraus entstehenden Hybrid-Hybridoma befähigt, Hybrid-Antikörpermoleküle zu produzieren, wobei die synthetisierten Immunglobulinketten durch die Gene beider Fusionspartner bestimmt werden^[5, 50]. Eine Anwendung dieser Technik für eine spezielle immunhistochemische Methode wurde von Milstein und Cuello^[51] beschrieben, die einen bispezifischen, Anti-Somatostatin-Anti-Peroxidase-Antikörper herstellen konnten.

Hybridantikörper könnten viele Anwendungsmöglichkeiten finden. Nicht zuletzt sollten sie einen Einschritt-Immunoassay ermöglichen, bei dem der bispezifische Antikörper das Antigen auf der einen Seite und das Indikatormolekül (Peroxidase, Phosphatase) auf der anderen Seite bindet. Heterobispezifische Antikörper könnten auch besondere Vorteile als Immuntoxine (Abschnitt 5.4.2) haben: Als Antigen gebundene Toxine könnten zum Ziel der zweiten Antikörperbindungsstelle transportiert werden^[52]. Weitere Beispiele für die Herstellung von Hybridantikörpern durch Zellfusion wurden von Martinis et al. beschrieben^[53].

5.2.4 Perspektiven

Die absolute Epitopspezifität monoklonaler Antikörper ermöglicht durch eine Auswahl von zwei oder drei mono-

klonalen Antikörpern, die mit eng benachbarten Antigen-determinanten reagieren, die Konzipierung neuer Immun-analysen, beispielsweise auf der Grundlage von Fluoreszenzanregung durch Energietransfer^[54]: Zwei monoklonale Antikörper, die benachbarte Epitope erkennen, werden mit zwei Indikatormolekülen konjugiert, wobei für Fluoreszenzlösung Rhodamin und Fluorescein benutzt werden können. Auch die Verwendung von zwei Enzymen wäre denkbar, wobei das erste Enzym das Substrat für das zweite produzieren muß.

5.3. Zelldiagnostik

Zweifellos wird derzeit die Zelldiagnostik durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern besonders tiefgreifend verändert. Es eröffnete sich ein Zugang zu biologischen Strukturen, die mit klassischen biochemischen und immunologischen Verfahren überhaupt nicht oder nur äußerst mühsam nachweisbar waren. Wie in Abbildung 7 schematisch gezeigt, ist es zum einen möglich, beispielsweise neue, auf einer Zellmembranoberfläche exprimierte Strukturen zu entdecken, hochspezifisch nachzuweisen und biochemisch zu charakterisieren; zum anderen kann man mit entsprechend vielen verschiedenen Antikörpern die Oberfläche einer Zelle durchmustern und neu beschreiben. Man kann nun Strukturen definieren, die erst in Verbindung mit einer Zellaktivierung, mit einem Zellwachstum oder mit einer Zelldifferenzierung exprimiert werden. Bei Immunzellen wird man bald in der Lage sein, alle Zellpopulationen und Subpopulationen charakterisieren und gegebenenfalls neu zuordnen zu können, die zwischen der ursprünglichen Knochenmarksstammzelle und den enddifferenzierten, funktionsbestimmten Immunzellen liegen (siehe Abschnitte 5.3.1 und 5.3.2). Mit diesem enorm wirksamen Instrument zur Differenzierung der Zellpopulationen des Immunsystems hofft man Informationen zu gewinnen, mit denen wertvolle Rückschlüsse auf Immunreaktionen gezogen werden können^[55].

In gleicher Weise wird heute versucht, spezifische Wachstums-, Differenzierungs- und Aktivierungsmarker auf Tumorzellen zu finden und zu charakterisieren, strukturell und funktionell verstehen zu lernen, um damit vielleicht neue Erkenntnisse über Entstehung und Ausbreitung von Tumoren zu gewinnen sowie über Regulations- und mögliche Gegenregulationsmechanismen (siehe Abschnitte 5.3.3 und 5.3.4).

5.3.1. Methoden und Anwendungsbereiche

Antikörper binden an Oberflächendeterminanten auf Zellen und in Geweben. Man kann die Antikörper zum Nachweis direkt markieren; indirekt gelingt der Nachweis durch Fluoreszenzfarbstoff- oder enzymmarkierte Anti-Maus-Immunglobuline (Immunhistochemie; siehe auch Abb. 6-9). Komplement-aktivierende monoklonale Antikörper sind auch für die Komplement-vermittelte Cytolyse geeignet, die als Mikromethode bei Histokompatibilitäts-tests eine Rolle spielt (Abb. 7).

Beim direkten Nachweis zellulärer Antigene über Immunfluoreszenz werden Fluorescein- oder Rhodamin-markierte monoklonale Antikörper benutzt; beim indirekten

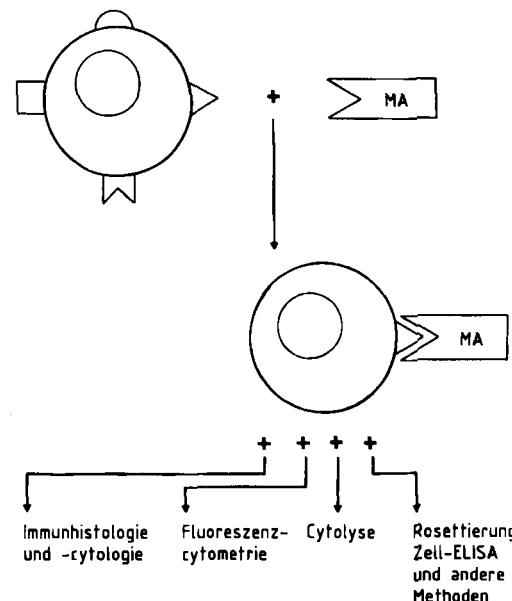


Abb. 7. Schematische Darstellung von Testmethoden für monoklonale Antikörper gegen zellständige Antigene: Eine Zelle, die in diesem Beispiel schematisch vier verschiedene Antigene auf der Zelloberfläche exprimiert, von denen beispielsweise nur ein Antigen zellpopulationsspezifisch sein soll, wird von einem spezifischen monoklonalen Antikörper (MA) erkannt, gebunden und damit quantifizierbar; das Antigen als Zelloberflächendeterminante ermöglicht damit auch die Bestimmung der Anzahl der dieses Antigen tragenden Zellen. Dazu ist entweder der MA direkt markiert (*direkte Methode*), oder ein markierter Zweitantikörper, in diesem Fall ein *Anti-MA*, bindet zusätzlich an den schon gebundenen MA (*indirekte Methode*). Da der MA meist ein Maus-IgG ist, ist der Zweitantikörper z. B. ein Kaninchen-Anti-Maus-IgG. Unter Rosettierung versteht man die ringförmige Anlagerung von Erythrozyten um Leukozyten herum.

Immunfluoreszenznachweis werden markierte Zweitantikörper verwendet. Die Auswertung geschieht durch Auszählen unter dem Mikroskop oder heute zunehmend automatisch an einem Durchflusscytofluorimeter.

In der Immunhistologie und -cytologie werden monoklonale Antikörper an Kryostatschnitten, an Cytozentrifugen- und Ausstrichpräparaten sowie an Paraffinschnitten eingesetzt. Dabei ist auffallend, daß alle bekannten monoklonalen Antikörper sich für die Anwendung am Kryostatschnitt eignen, ein Teil erlaubt die Verwendung an Cytozentrifugen- und Ausstrichpräparaten, aber nur ganz wenige eignen sich für eine Anwendung an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Schnitten. Rosettierung, Zell-ELISA und Zell-RIA sind aufwendige und sehr spezielle Methoden, die sich noch nicht für die Routineanwendung empfehlen lassen (Abb. 7).

Monoklonale Antikörper ermöglichen die Beobachtung von Strukturen an lebenden Zellen und die gleichzeitige Erkennung von deren Funktion im Immunsystem. Dieses war mit anderen Mitteln bisher nicht möglich. Mit monoklonalen Antikörpern können auch die menschlichen lymphoiden und myeloiden Zellpopulationen in lymphatischen Geweben und bei Infiltration in erkrankten Organbereichen identifiziert werden. Der Pathologie und Histologie eröffnet sich damit die vereinfachte Beurteilung histologischer Schnitte, da nicht mehr allein anhand der Morphologie und des Färbeverhaltens bewertet werden muß.

Zahlreiche systemische Erkrankungen beruhen auf Fehlregulationen des Immunsystems oder gehen mit Störungen

der zellulären Immunität einher. Dazu zählen primäre Immunodefizienz, erworbene Immunodefekte (z. B. „Acquired Immune Deficiency Syndrom“ (AIDS)), Autoimmunerkrankungen, Leukämien, Lymphome und Infektionskrankheiten. Fehlfunktionen im Immunsystem hängen meist mit Veränderungen in den unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen zusammen. Sowohl die Aktivierbarkeit der Lymphozyten als auch ihre Effektorfunktionen können gleichermaßen beeinträchtigt sein.

Tabelle 3. Monoklonale Antikörper zur Klassifizierung von Humanleukozyten [a, b].

Differenzierungscluster (CD)	Zelltyp und Antigen	Charakterisierte Zellpopulation	ausgewählte Antikörper mit Cluster-Spezifität
CD 1	Thy, p45–12 [c]	corticale Thymozyten	T6; M241; SK9/Leu 6
CD 2	T, p50	E-Rosetten bildende T-Lymphozyten	T11; 9.6; S2/Leu 56
CD 3	T, p19–29	reife T-Lymphozyten	T3, BW 264/56 (BMA 030); SK7/Leu 4
CD 4	T, p55	T-Zellsubpopulation; überwiegend T-Helfer-Lymphozyten	T4; BW 264/123 (BMA 041); MT321 (BMA 040)
CD 5	T, p67	Pan-T-Lymphozyten; B-Zellsubpopulation	T1; T101; UCHT2
CD 6	T, p120	reife T-Lymphozyten; B-Zellsubpopulation	T12.1; T411; 12.1.5
CD 7	T, p41	Pan-T-Lymphozyten	3A1A; 4A; 4H9/Leu 9
CD 8	T, p32–33	überwiegend T-Suppressorzellen und cytotoxische T-Lymphozyten	T8; BW 135/80 (BMA 081); UCHT4
CD 9	nT-nB, p24	Monozyten	BA2
CD 10	nT-nB, p100	Prä-B-Zellen, Polymorphe kernige (CALLA)	J5, VIL-A1
CD 11	M, G	Monozyten Granulozyten; einige Knochenmarkzellen	Ki-M5 (BMA 0350); VIM-12
CD 15	G	Granulozyten	VIM-C6 (BMA 0200)
CD 16	G, NK	Granulozyten, NK-Zellen (Fc-Rezeptor)	BW 243/41; VEP13 (BMA 070); BW 209/2
CD 25	T	aktivierte T-Lymphozyten	TAC; TIA

[a] Modifiziert nach [65]. Ergänzungen: Ergebnisse des 2. Int. Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Boston 1984. [b] Abkürzungen: Thy = Thymozyten; T = T-Lymphozyten; nT-nB = non-T-non-B-Zellen; M = Monozyten, Makrophagen; G = Granulozyten; NK = natürliche Killerzellen; p = Protein. Die Abkürzungen in der letzten Spalte sind die ursprünglichen individuellen Labor-, Instituts- oder Firmenabkürzungen, die derzeit noch gebräuchlich und auch in Publikationen zu finden sind. Die Klone sind durch die Workshop-Komitees als Referenzklone deklariert worden. [c] Molekulargewicht in kDa.

Die Phänotypcharakterisierung von Thymozyten, Knochenmarkzellen und peripheren Lymphozyten mit monoklonalen Antikörpern ermöglicht bei Patienten mit primärer Immunodefizienz eine bessere Definition dieser komplexen Erkrankungen. Bei Immunodefizienz und Autoimmunerkrankungen ist oftmals das Verhältnis von T-Helfer-

zellen (T4) zu T-Suppressorzellen (T8) gestört. Bei AIDS ist beispielsweise die Konzentration der T-Helferzellen stark erniedrigt und bei Autoaggressionserkrankungen oftmals die der T-Suppressorzellen.

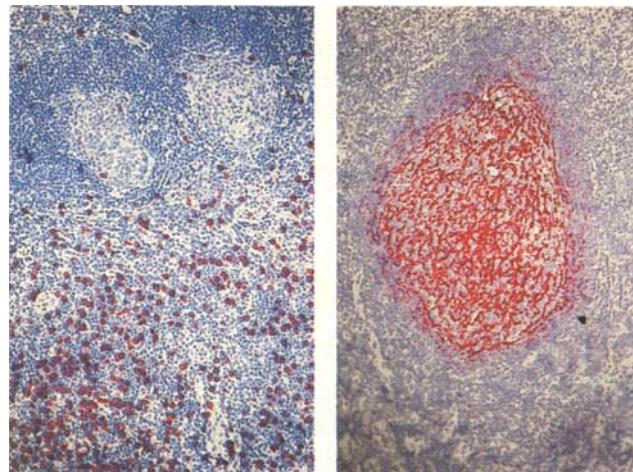


Abb. 8. Alkalische-anti-alkalische Phosphatase-Reaktion (APAAP) mit einem monokonalen anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper und einem unkonjugierten Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-Brückenantikörper (rotblaue Fast-Red/Hämalaun-Methode). Kryostatschnitt einer menschlichen Tonsille. Links: T8-positive Suppressor-T-Lymphozyten im paracorticalen Bereich; rechts: dendritische Reticulumzellen im Keimzentrum eines Follikels (Vergrößerung ca. 250fach; Präparation: Institut für Pathologie der Universität Kiel).

Die Bedeutung der monoklonalen Antikörper für die Diagnose liegt also auf dem Gebiet der Zellcharakterisierung. Man kann Zellen, die morphologisch nur schwer oder überhaupt nicht sicher zu erkennen und einzuordnen waren, nunmehr auffinden und definieren. Mit T-Lymphozytenmarkern (Tabelle 3) ist es möglich geworden, die Reifung der T-Lymphozyten vom Knochenmark bis hin zum peripheren Blut zu verfolgen und weitgehend zuverlässig Differenzierungsstadien zuzuordnen. Analog möchte man nur zu gerne die Differenzierung und das Wachstum von Tumorzellen und anderen sich differenzierenden zellulären Systemen beobachten. Für die Hämatologen werden die Marker für B-Zellen zunehmend an Bedeutung gewinnen, denn der Großteil der malignen lymphatischen Erkrankungen des Menschen entsteht aus der unregulierten Proliferation von B-Lymphozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Reife B-Lymphozyten wurden und werden noch immer über zelloberflächenmembranständige Immunglobuline nachgewiesen. Frühe Entwicklungsstadien von B-Lymphozyten im Knochenmark, in denen Oberflächenimmunglobuline noch nicht exprimiert sind, können mit monoklonalen Antikörpern identifiziert werden. Außer den im Blut zirkulierenden B-Lymphozyten lassen sich auch die B-Lymphozyten in den peripheren lymphatischen Organen, besonders in deren Keimzentren, erkennen. Hierdurch sind weitere Differenzierungsantigene, die besonders für die Lymphomforschung von Bedeutung sind, erkennbar geworden (Abb. 8).

Für die Charakterisierung von myelomonozytären Zellen hat sich durch die Hybridoma-Technologie ein völlig neues Bild ergeben; wir verfügen heute bereits über eine Vielzahl monoklonaler Antikörper gegen myeloische Differenzierungsantigene, wobei man grob drei Antikörpergruppen unterscheidet: Antikörper, die mit Granulozyten und mit Monozyten, solche, die nur mit Granulozyten und solche, die nur mit Monozyten reagieren (siehe auch Tabelle 3).

Auch Thrombozytenantigene können heute mit monoklonalen Antikörpern bei der Charakterisierung unreifer Blasen eingesetzt werden. So ist es möglich geworden, unreife und atypische Vorstufen der Thrombozyten zu identifizieren, die bisher höchstens elektronenmikroskopisch erkannt werden konnten.

5.3.2. Lymphozyten und Immunologie

Die Aktivierung des Immunsystems als Antwort auf die Konfrontation mit einem natürlichen Immunogen ist eine äußerst komplexe Reaktion. Selbst unter in-vitro-Bedingungen ist eine wirksame Stimulation der zellulären Komponenten des Immunsystems nur dann möglich, wenn alle Parameter berücksichtigt werden, die für den kaskadenartigen Ablauf einer Immunreaktion notwendig sind. Einerseits sind die zellulären Wechselwirkungen sowohl auf der Induktions- und Differenzierungsebene als auch in der Effektorphase von den im Haupthistokompatibilitätskomplex codierten Strukturen abhängig und werden auf diese Weise genetisch kontrolliert. Andererseits werden wesentliche Signale, die eine Differenzierung von immunreaktiven Zellen ermöglichen, erst durch verschiedene Immunmediatoren vermittelt^[56, 57]. Sowohl die Kenntnisse der Kontrolle zellulärer Immunreaktionen als auch der Nachweis der an den jeweiligen Immunreaktionen beteiligten Immunfaktoren ermöglichte die Aufklärung grundlegender Immunmechanismen. Durch eine Vielzahl sehr aufwendiger Experimentalssysteme konnten die beteiligten Zellpopulationen definiert und ihre Funktion beschrieben werden.

Mit den klassischen Methoden der Leukozytendifferenzierung war es meist nicht möglich, anhand der Zellmorphologie eine Funktionszuordnung auf der Ebene der einzelnen Zellen durchzuführen. Die Beschreibung der Lymphozytenpopulationen war somit für T-Zellen auf funktionelle Systeme (Induktion der DNA-Synthese durch die Mitogene Phytohämagglobulinin (PHA) und Concanavalin A; durch Antikörper-vermittelte zelluläre Cytotoxizität (ADCC), natürliche Killerzellen (NK), cytotoxische T-Lymphozyten (CTL)) oder auf phänotypische Marker eingeschränkt. Die Bestimmung des Differenzierungsgrades von B-Lymphozyten beruhte in analoger Weise auf der Interaktion mit verschiedenen Aktivatoren (Lipopolysaccharid (LPS), Pokeweed Mitogen (PWM), *Staphylococcus aureus*, Convan I (SAC) u. a.) und dem Nachweis von cytoplasmatischem oder Oberflächenimmunglobulin. Erst mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern gelang die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen dem Phänotyp eines Lymphozyten und seiner Funktion^[58–60]. Inzwischen

konnte mehrfach gezeigt werden, daß das durch den monoklonalen Antikörper erkannte Antigen nicht nur eine Markerstruktur für die jeweilige Funktion der Zelle ist, sondern daß es selbst an Zelfunktionen (z. B. als Rezeptor) beteiligt ist^[61–64].

Um eine internationale Vergleichbarkeit von monoklonalen Antikörpern zu gewährleisten, die zur Differenzierung von Humanleukozyten eingesetzt werden können, wurde 1982 in Paris auf dem *Ersten internationalen Workshop für Humanleukozyten-Differenzierungsantigene* eine Zuordnung zu charakteristischen Differenzierungsantigenen vorgenommen^[65]. Die Charakterisierung unterschiedlicher Differenzierungsstadien durch monoklonale Antikörper wurde auf dem Folgekongreß 1984 in Boston weiter ausgearbeitet, was sich in neu formulierten *Differenzierungsclustern* ausdrückte (Tabelle 3).

Die Spezifität eines Antileukozyten-Antikörpers und damit die Zugehörigkeit zu definierten Clustern berücksichtigt jedoch nur partiell die Anforderungen an monoklonale Antikörper für therapeutische Zwecke (siehe Abschnitt 5.4.3).

Monoklonale Antikörper, die an den T3-Komplex binden, sind als T-Lymphozyten-aktivierend beschrieben worden^[66], wenn sie auch an den Fc-Rezeptor von Monozyten binden können^[67–69]. Wir konnten jedoch vier monoklonale Antikörper gegen den T3-Komplex isolieren, von denen nur die Antikörper BW 264/56 (CD3b) und BW 242/55 (CD3a) humane T-Zellen aktivieren können, während BW 239/347 (CD3b) und BW 242/412 dies nicht vermögen. Die Spezifität dieser Antikörper wurde an isolierten Zellpopulationen mit Doppelmarkierungs- und Comodulationsexperimenten sowie durch kompetitive Bindungstests bestimmt. Die Aktivierung von T-Zellen führt zur Modulation des T3-Komplexes, zur Induktion der DNA-Synthese, zur Freisetzung von Immunmediatoren wie Interleukin-2 und γ-Interferon und zur IgM-Synthese in vitro (Tabelle 4). Übereinstimmend zeigte sich in allen Testsy-

Tabelle 4. Aktivierung der T-Zellen durch CD3-Antikörper [a].

Anti-körper [b]	Isotyp	Mitogenität		Induktion der IgM-Synthese		T3-Modulation	
		R	NR	R	NR	R	NR
Leu 4	IgG 1	+	–	+	–	+	–
BW 264/56	IgG 2a	+	+	+	+	+	+
OKT3	IgG 2a	+	+	+	+	+	+
BW 239/347	IgG 2b	–	–	–	–	–	–
BW 242/412	IgG 2b	–	–	–	–	–	–
BW 242/55	IgG 3	+	+	+	+	+	+

[a] Peripherie Blutzlymphozyten von gesunden Blutspendern wurden entsprechend ihrer Reaktivität mit Anti-T3-Antikörpern der IgG1-Subklasse als reaktiv (R) oder nicht reaktiv (NR) klassifiziert [146]. [b] BW: Firma Behringwerke; Leu 4: Firma Becton Dickinson; OKT3: Firma Ortho.

stehen, daß nur die Bindung von Anti-T3-Antikörpern der Isotypen IgG2a und IgG3 zu einer T-Zellaktivierung führen, während die entsprechenden Antikörper des Isotyps IgG2b dies nicht bewirken können^[70].

Bei der therapeutischen Verwendung von monoklonalen Maus-Antikörpern müssen somit auch Fc-vermittelte Im-

munreaktionen berücksichtigt werden. Für die Verwendung von monoklonalen Antikörpern des Clustertyps CD3, die T-Zellen aktivieren, muß dies zumindest dann berücksichtigt werden, wenn sie zur Immunsuppression, z. B. bei Organ- und Knochenmarktransplantationen eingesetzt werden sollen (siehe Abschnitt 5.4.3).

5.3.3. Leukämien und Lymphome

Die vergleichende Phänotypcharakterisierung von normalen und malignen Zellen des hämatopoetischen Systems mit Hilfe monoklonaler Antikörper ist ein entscheidender Fortschritt bei der Suche nach dem zellulären Ursprung lymphatischer Erkrankungen und deren Klassifizierung und damit auch bei Prognosestellung und Therapie. Maligne lymphatische Erkrankungen entstehen durch unkontrollierte Expansion eines neoplastischen lymphatischen Zellkons, der in einem bestimmten Stadium der Reifung steckengeblieben ist. Die Zellen eines solchen Kons exprimieren die Oberflächenmarker des entsprechenden normalen Zelltyps, wodurch sie mit monoklonalen Antikörpern leicht zu identifizieren sind. Selten treten zusätzliche Merkmale fremder Zelllinien auf.

Die akuten lymphatischen Leukämien (ALL) werden entsprechend dem Differenzierungsstadium der beteiligten Zelltypen in fünf Hauptgruppen aufgeteilt: 1. Undifferenzierte ALL, 2. Common-ALL (cALL), 3. prä-B-ALL, 4. B-ALL und 5. T-ALL. 60–70% aller ALL-Fälle lassen sich der Common-ALL zuordnen. Bei dieser Leukämieform wurde auf der Membran der Blasen mit monoklonalen Antikörpern (der bekannteste ist VIL-A1) ein Differenzierungsantigen mit einem Molekulargewicht von ca. 100 000 Da nachgewiesen, das erstmals 1975 als *Common acute lymphatic leukemia antigen* (CALLA) bezeichnet wurde (Tabelle 3). Es handelt sich hierbei nicht um ein leukämiespezifisches, sondern um ein normales Differenzierungsantigen, das in Spuren auch bei normalen Knochenmarkslymphozyten nachgewiesen werden kann.

Bei der *undifferenzierten ALL* wird kein CALLA exprimiert, die Zellen der prä-B-Zell-Leukämien werden durch den Nachweis intracytoplasmatischer Immunglobulinketten (μ -Ketten) charakterisiert. Akute Leukämien vom B-Zell-Typ sind selten (1–5%). Man findet auf den Blasen B-Lymphozyten-Antigene, wie sie auch bei reifen B-Zellen zu finden sind und zusätzlich Membranimmungglobuline auf der Oberfläche der Zellen (meist vom IgM-Isotyp).

Mit ca. 20% stellen die *T-ALL* die zweitgrößte Gruppe der akuten lymphatischen Leukämien. Auf den Blasen bei dieser Leukämieform findet man mit monoklonalen Antikörpern typische Marker der T-Zell-Differenzierung, wie das T11-Antigen und den E-Rezeptor, oder bei der corticothymozytären Form den normalen, kortikalen Thymozytenmarker T6. Zusätzlich können die Marker T9 (Transferin-Rezeptor) und T10 (hämatopoetische Vorläuferzelle) nachgewiesen werden.

Chronische lymphatische Leukämien (CLL) entstehen aus der malignen, monoklonalen Proliferation von B-Lymphozyten, die in ihrer Entwicklung angehalten wurden. Lediglich 5% der CLL-Fälle stammen aus dem peripheren T-

Zell-Kompartiment; sie tragen die Marker T3, T10 und entweder T4 oder T8.

Die sogenannten *Non-Hodgkin-Lymphome* gliedern sich nach ihren Oberflächenmarkern in eine heterogene Gruppe der lymphoblastischen Lymphome, die Antigene des Thymus exprimieren oder, wie z. B. das Burkitt-Lymphom, eindeutig zum B-Zelltypus gehören mit Oberflächen-IgM und Epstein-Barr-Virus-typischem Membranantigen. T-Lymphome der Haut und das Sezary-Syndrom entstehen durch maligne Proliferation der Helfer-T-Lymphozyten (T4).

Die *myeloischen Leukämien* werden nach morphologischen Kriterien beurteilt. Intensiv gesucht werden monoklonale Antikörper, die unreife myeloische Blasen erkennen können; zur Zeit ist man noch gezwungen, mit einer Kombination von Antikörpern zu arbeiten, z. B. den Antikörpern VIM C6 und VIM D2, mit denen man alle myeloischen Leukämien erfassen kann. Zur Unterscheidung von monozytärer und granulozytärer Form einer Leukämie können die Antikörper VIM C6 oder VIM D2 schon heute eingesetzt werden (siehe Tabelle 3).

5.3.4. Immunhistochemie und Tumor

Die histologische Diagnose der aus soliden Geweben entstandenen Tumoren ist hauptsächlich von der Interpretation der Gewebschnitte durch den Pathologen abhängig. Werden konventionelle, histomorphologische Methoden zur Klassifizierung benutzt, treten insbesondere dann bei verschiedenen Beobachtern Diskrepanzen auf, wenn zur Untersuchung nur sehr wenig Biopsiematerial zur Verfügung steht. Aber auch bei Routineuntersuchungen sind, speziell bei Lungencarcinomen unterschiedlicher Histologie zweifelhafte Interpretationen möglich^[71]; hier könnten Marker für eine Unterscheidung zwischen Adenocarcinomen der Lunge und Mesotheliomen sehr hilfreich sein^[72].

Reagentien zur Klassifizierung von Metastasen, die sich von nicht entdeckten Primärcarcinomen, Sarcomen oder Melanomen unterschiedlichster Herkunft ableiten, würden die Auswahl einer adäquaten, patientenspezifischen Therapie erleichtern^[73]. Voraussetzung für die Entwicklung von solchen Reagentien ist die selektive Verteilung von Antigenen oder Antigendeterminanten (Epitopen) auf denjenigen Gewebetypen, die es zu unterscheiden gilt. Monoklonale Antikörper sind dann ideale Reagentien für den immunhistochemischen Nachweis von Markerepitopen, wenn sie mit Strukturen reagieren, die auf bestimmten Tumortypen sehr stark exprimiert sind, jedoch nicht oder nur in geringem Ausmaß auf anderen.

Die indirekte Immunperoxidase-Methode^[74] und die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode^[75] sind die am häufigsten benutzten Techniken zur Beurteilung der Gewebeverteilung von Epitopen, die mit monoklonalen Antikörpern definiert wurden. Besonders wenn mit Formalin-fixierten Gewebschnitten gearbeitet wird, ergeben diese Techniken eine sehr präzise histochemische Farbreaktion in einer gut erhaltenen Gewebestruktur. Die Farbstoffverteilung ermöglicht quantitative Reaktivitätsunterschiede in definierten Kompartimenten der Gewebschnitte, z. B. in Tumorzellbereichen, Stromakomponenten oder in nicht-malignen Strukturen, zu bestimmen.

Mit dieser Methodik kann die Feinspezifität von monoklonalen Antikörpern auf allen verfügbaren Humangeweben überprüft werden, weil unerwünschte Reaktivitäten entdeckt werden. Extensive Spezifitätsanalysen wurden bisher nur mit einigen wenigen monoklonalen Antikörpern durchgeführt, die Formalin-resistente Epitope erkennen^[76-80].

Mit derartigen Antikörpern können indirekte Immunperoxidase-Tests an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben durchgeführt werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 9 gegeben, wo der monoklonale Antikörper BMA 130b (Behring-Diagnostika) mit einem Pankreascarcinom reagiert (Braunfärbung an den Tumorzellarealen), jedoch keine Reaktion mit dem Gewebe einer chronischen Pankreatitis zeigt. Monoklonale Antikörper, die Formalin-sensitive Epitope erkennen, können nicht in gleicher Weise getestet werden, da frisches oder gefrorenes Humangewebe nur in eingeschränktem Umfang zur Verfügung steht^[81-83].

5.4. Medizinische Anwendungsmöglichkeiten

5.4.1. Tumorlokalisation: Radioimmunszintigraphie von Tumoren

Bei der in-vivo-Diagnostik bösartiger Tumoren versucht man seit mehreren Jahrzehnten mehr oder weniger erfolglos, szintigraphische Methoden einzusetzen. Dabei werden dem Patienten gammastrahlende Substanzen intravenös verabreicht in der Hoffnung, daß diese durch die Blutzirkulation an den Tumor herangetragen werden, sich dort anreichern und dann mit einem Strahlendetektor nachgewiesen werden können. Für den Radioaktivitätsnachweis stehen mit sogenannten Gammakameras ausgeklügelte Techniken zur Verfügung.

Die Idee, die Spezifität von Antikörpern gegen Tumoren in vivo für die Radioaktivitätsanreicherung im betreffenden Tumor zu nutzen, geht auf Pressman zurück; er fand, daß man ein Antikörpermolekül unter Erhalt seines Bin-

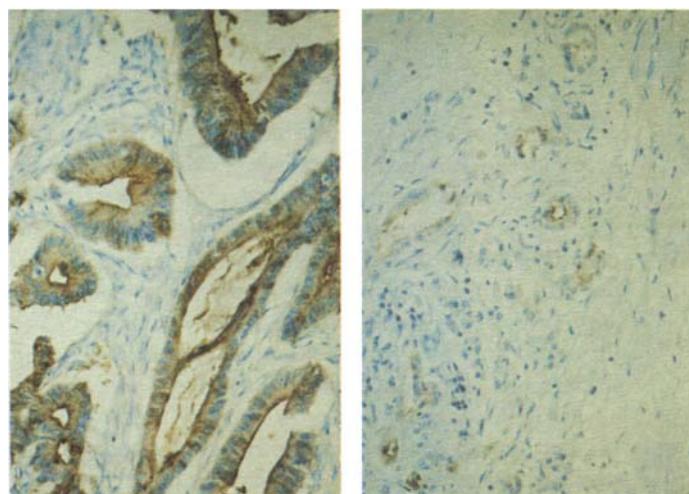


Abb. 9. Links: Indirekte Immunperoxidase-Färbung an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von einem Pankreascarcinom. Die Braunfärbung zeigt die Reaktion mit den Tumorzellarealen an. Rechts: Keine Reaktion mit dem Gewebe einer chronischen Pankreatitis. Leichte Gegenfärbung des Gewebes mit Hämatoxilin (Vergrößerung ca. 250fach).

Die Mehrzahl der bisher existierenden monoklonalen Antikörper, die unter Verwendung von Zelllinien induziert und selektiert wurden, binden an Formalin-sensitive Epitope, wodurch die Analyse der Feinspezifität auf vielen Humangeweben kaum durchgeführt werden kann^[84-87]. Diese Antikörper spielen insbesondere bei der Aufklärung der physiologischen Funktionen von Zelloberflächenantigenen eine Rolle. Beispiele dafür sind die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, für Hormone und für Anhaftungsfaktoren^[88-90]. Ebenso kann die Verteilung von Antigenen auf Zellmembranen oder die Heterogenität von Zellpopulationen untersucht werden^[91-93].

In Verbindung mit Makrophagen und Killerzellen vermögen monoklonale Antikörper unterschiedlicher Isotypen, die Glycoproteine oder Glycolipidmoleküle auf Tumorzellmembranen erkennen, in extrem unterschiedlichem Maße Zielzellen zu lysieren^[94,95]. Monoklonale Antikörper, die mit Isotopen, Toxinen, Cytostatica oder immuno-genen Molekülen gekuppelt sind, werden voraussichtlich eine bedeutende Rolle beim in-vivo-Nachweis und bei der Therapie von Tumorerkrankungen spielen (siehe Abschnitte 5.4.1 und 5.4.2).

dungsvermögens mit radioaktivem Iod markieren kann^[96] und daß sich gegen einzelne Organe gerichtete Antikörper nach *Radioiodmarkierung* und in-vivo-Applikation im betreffenden Organ, beispielsweise der Niere, anreichern^[97]. Der Weg zur Auswertung dieses Prinzips für den Tumornachweis schien offen, er scheiterte jedoch zunächst an dem damals noch unüberwindbaren Problem der unspezifischen Bindung an nicht zum Tumor gehörigen Gewebe. Auch war die Anreicherung meist nicht durch Antigene des Tumors, sondern durch Fibrin bedingt, das sich im Tumorbereich aufgrund der dort ablaufenden entzündlichen Vorgänge vermehrt ablagerte. Aus dieser Beobachtung entstand die Idee, spezifische Anti-Fibrin-Antikörper^[98] zu verwenden; jedoch brachte auch dies nicht den erhofften Durchbruch bei der Tumordarstellung.

Schon damals war klar, daß eine der wichtigsten Bedingungen für eine erfolgreiche Immunszintigraphie die Reinheit des eingesetzten Antikörpers ist. Bisher standen jedoch nur Hyperimmunseren zur Verfügung, deren Immunoglobulinfraktion auch nach ihrer Abtrennung von den übrigen Serumproteinen höchstens 1% des spezifischen Antikörpers enthalten.

Ein wichtiger Fortschritt gelang mit der Nutzung von Antikörpern gegen eine Reihe sogenannter tumorassoziierten Antigene. Diese Proteine werden häufig in großer Menge von bestimmten Tumortypen produziert und in das Blut abgegeben, wo sie mit empfindlichen analytischen Methoden nachgewiesen werden können^[119]. Man kann sie aus Blutserum oder Tumorgewebe isolieren und dann für die Affinitätschromatographie zur Hochreinigung der entsprechenden Antikörper aus xenogenen Immunseren nutzen.

Die wichtigsten systematischen Untersuchungen dieser Art (Antigene, Tumoren, Befunde) sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Aus dieser Zusammenstellung ist ersichtlich, daß nicht alle Arbeitsgruppen so überzeugende Ergebnisse erzielt haben wie diejenige um *Goldenberg*^[102, 103]. Beson-

chem Erfolg) auf eine beschränkte Anzahl von Tumortypen angewendet werden konnten. Wesentlich mehr Erfahrung hat man jedoch bereits am Tiermodell gewonnen, das in der überwiegenden Zahl der Fälle xenogene Tumortransplantate auf athymischen Nacktmäusen^[117] benutzt. Diese Versuchsanordnung gilt als wichtiges präklinisches Testsystem, obwohl sie das in-vivo-Verhalten der Antikörper aus mehreren Gründen häufig etwas günstiger aussehen läßt als die Anwendung am Menschen.

Die Beurteilung der Antikörperbindung im transplantierten Tumor (Xenograft) erfolgt entweder durch Szintigraphie mit der Gammakamera oder durch Berechnung von Lokalisierungssindizes (L.I.)^[118], wie in den Abbildungen 10 und 11 an einem Beispiel gezeigt wird^[79]. In Abbildung 10 werden die zeitabhängige Anreicherung der Ra-

Tabelle 5. Für die Radioimmundetektion von Tumoren im Menschen eingesetzte polyklonale Antikörper (Affinitätsgereinigt).

Antigen	Ort des Tumors	Anzahl der Fälle (positiv/gesamt)	Lit.
carcino-embryonales Antigen (CEA)	Colon Mamma medulläre Schilddrüse	1/2 3/23 0/5	[99]
	Colon, Rectum, außerdem Lunge, Kehlkopf, medulläre Schilddrüse	28/31	[100]
	Colon, Rectum, Pankreas verschiedene andere Organe	22/53	[101]
	Colon, Rectum Ovarien Lunge Pankreas Mamma Uterus Magen verschiedene andere Organe	35/41 21/24 12/17 4/8 9/14 28/31 5/6 25/39	[102]
	Colon, Rectum (primär) Colon, Rectum (Metastasen)	10/12 49/53	[103]
	Colon, Rectum (primär) Colon, Rectum (Metastasen)	4/5 8/11	[104]
menschliches Choriongonadotropin (hCG)	Lunge, Becken, Unterleib (Chorion-Carcinom) Gehirn, Lunge, Unterleib (Teratom)	9/14 3/7	[105]
α -Fetoprotein (AFP)	Testes (Teratom)	8/12	[106]

ders gegen die Verwendung des am häufigsten genannten carcinoembryonalen Antigens (CEA) ist einzuwenden, daß es mit einer Reihe ähnlicher und im Organismus weit verbreiterter Proteine kreuzreagiert, so daß die Bedingung der Tumorspezifität sicher nur unbefriedigend erfüllt ist.

Monoklonale Antikörper sollten bei der Lösung des Spezifitätsproblems den entscheidenden Durchbruch bringen; darüber hinaus dürften ihre vielen qualitativen Vorteile die Standardisierung und Anwendung der Radioimmundetektion in breitem Maßstab ermöglichen. Leider kann man die bisher bekanntgewordenen Tumorentitäten allenfalls als tumorassoziiert bezeichnen, da sie in geringerer Menge auch in normalem Gewebe zu finden sind.

Tabelle 6 zeigt, daß unter klinischen Bedingungen bisher erst wenige monoklonale Antikörper (mit unterschiedli-

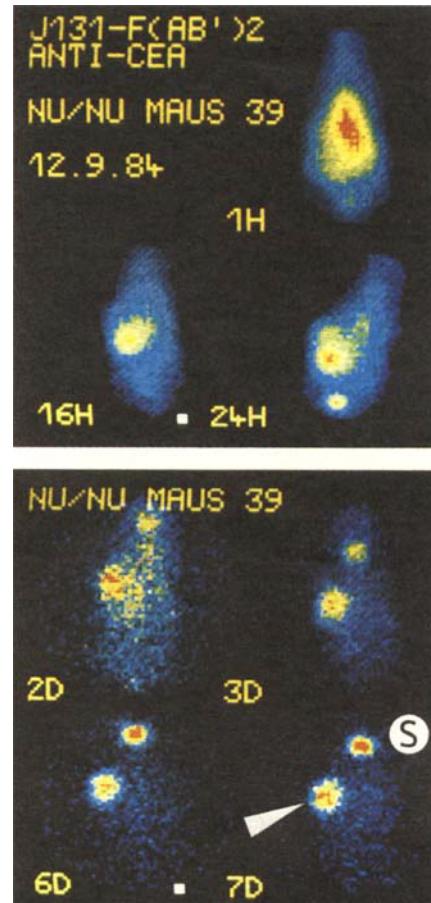


Abb. 10. Radioimmunszintigramm einer Nacktmaus mit Coloncarcinom-Xenograft an der linken Seite (weißer Pfeil); monoklonaler Antikörper BW 431 (F(ab')₂-Fragment eines monoklonalen Antikörpers gegen carcinoembryonales Antigen), markiert mit ¹³¹I; Gammakamera-Aufnahmen nach 1 h, 16 h, 24 h, 2 d, 3 d, 6 d und 7 d. Die Schilddrüse des Tieres (S) war nicht blockiert, so daß sich auch hier ¹³¹I anreichern konnte (Aufnahmen von A. Schwarz et al., Hoechst AG).

bioaktivität im Tumor und die gleichzeitige Abnahme im zentralen Bereich der Maus deutlich. Abbildung 11 zeigt erhöhte L.I.-Werte und somit spezifische Antikörperanreicherung nur im Tumor. Das Verfahren nutzt die von *Pressman et al.*^[120] erstmals beschriebene Doppelmarkierungsmethode zur in-vivo-Bestimmung tumordarstellender Antikörper.

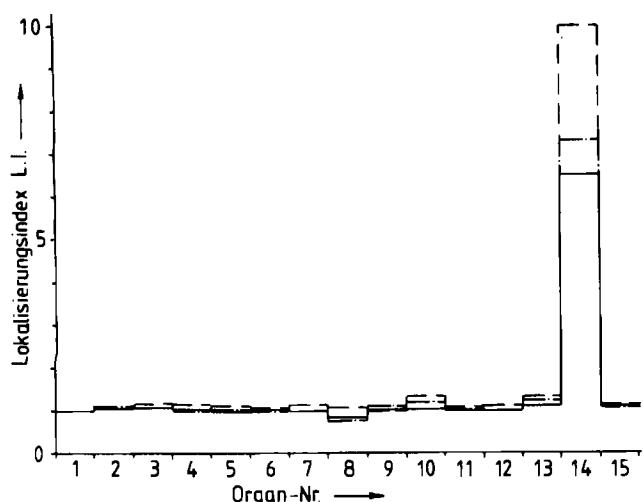


Abb. 11. Anreicherung von monoklonalem Antikörper BW 431 im Coloncarcinom-Xenografie in der Nacktmaus nach 3 d (drei Tiere: —, ---, —). L.I. > 1 bedeutet spezifische Anreicherung des monoklonalen Antikörpers. Organe: Blut (1), Blase (2), Herz (3), Darm (4), Nieren (5, 6), Leber (7), Milz (8), Lunge (9), Schilddrüse (10), Kopf (11), Muskulatur (12), Magen (13), Tumor (14), Restkörper (15).

Tabelle 6. Klinische Studien zur Radioimmundetektion von Tumoren mit monoklonalen Antikörpern.

Anti-körper	Antigen	Tumortyp	Positive Befunde/ Gesamtzahl	Lit.
17-1A	Colon-carcinom-Zelllinie	Coloncarcinom	3/9 31/59 22/38	[107] [108] [109]
19-9	Mono-sialo-gangliosid	Coloncarcinom	10/13	[107]
791T/36	Osteosar-com-Zelllinie	Coloncarcinom Rektumcarcinom	8/11 5/12	[110]
LICR-LON-M8	Milch-fettkü-gelchen-membran	Mammacarcinom	11/14	[111]
Anti-p97	p97 (Zell-membran-antigen von Melanoma)	Melanom	22/25	[112]
MAb VII 23	carcino-embryonales Antigen	Coloncarcinom	14/28	[113]
MAb 35 [F(ab') ₂]	carcino-embryonales Antigen	Coloncarcinom	18/24	[114]
HMFG1 HMFG2	Milch-fettkü-gelchen-membran	Ovarialcarcinom Coloncarcinom Ovarialcarcinom	11/12 4/6 35/40	[114] [116]

Auf die wichtige Frage, wie groß ein Tumor mindestens sein muß, damit er mit der Radioimmunszintigraphie entdeckt werden kann, gibt es wegen der Vielfalt der einflußnehmenden Parameter keine eindeutige Antwort. Auch für seine Detektion mit monoklonalen Antikörpern gilt als Empfindlichkeitsgrenze beim Menschen unter günstigen Bedingungen immer noch ein Mindestdurchmesser von etwa 1 cm oder eine Mindestmasse von 0.1 g^[121]. Für Tiermodell-Versuche sind allerdings auch schon Tumordurchmesser von ca. 1 mm angegeben worden^[122].

Das Ergebnis der Szintigraphie hängt stark vom Verhältnis der Radionuclidaufnahme in Tumor und umgebendem Gewebe ab. Subtraktionsverfahren, bei denen andere chemische Substanzen zur Markierung des Blutpools (z. B. ^{99m}Tc-Humanserumalbumin) oder zur Darstellung der unspezifischen Aufnahme im reticuloendothelialen System (z. B. ^{99m}Tc-Schwefelkolloid) herangezogen werden, führen häufig zu falsch positiven Befunden^[99]. Wenn dieses Prinzip angewendet wird, so sollte für die Darstellung des Hintergrundes ein unspezifisches Antikörperpräparat genommen werden, das mit demselben Radioisotop nach derselben Methode markiert worden ist^[120]. Überlegungen, daß Unspezifität durch Fc-vermittelte Bindung an Fc-Rezeptoren des zellulären Immunsystems mitverursacht werden könnte, führten zur Benutzung der Antikörper-Fragmente F(ab')₂ und Fab anstelle des kompletten Moleküls. Beide haben obendrein den Vorteil, daß sie wesentlich schneller als das ganze Molekül aus dem Blutkreislauf ins Gewebe penetrieren und über die Niere ausgeschieden werden, so daß bei ihnen die störende Restaktivität im Blut schneller abklingt (*Clearance*) und der Tumor damit schneller aus dem Untergrund hervortritt. Welchem der beiden Fragmente der Vorzug zu geben ist, erscheint zur Zeit noch unklar. Wegen seiner schnellen und direkten Clearance scheint Fab für erhöhte Untergrundstrahlung im Bereich der Nieren verantwortlich zu sein^[123], doch wurde auch bei F(ab')₂ von störender Radionuclidanreicherung in Nieren und Blase berichtet, was durch die schnellere Metabolisierung hervorgerufen wird. Ob diese Effekte die Tumordarstellung beeinträchtigen, hängt natürlich von der Lage des Tumors ab. Immerhin kann hier mit tomographischen Aufnahmetechniken bedeutend mehr Klarheit geschaffen werden als mit der einfachen Szintigraphie.

Um optimale Szintigramme zu erhalten, müssen möglichst viele markierte Antikörper den Tumor erreichen und auf den Tumorzellen gebunden werden. Deshalb ist die Vaskularisierung des Tumorgewebes und die Antigendichte auf den Zellen für das Ausmaß der Antikörperbindung von großer Wichtigkeit. Während sich die Vaskularisierung kaum beeinflussen läßt, könnte man bei nicht ausreichender Antigendichte anstelle eines Antikörpers mehrere gegen verschiedene Epitope der Zelloberfläche gerichtete Antikörperarten verwenden. Dieses Vorgehen ist auch deswegen vorteilhaft, weil die Antigenstruktur von Tumorzellmembranen nicht nur von Patient zu Patient, sondern im selben Patienten von Ort zu Ort variieren kann^[109]. Wenig Spielraum gibt es dafür, die Radionuclidanreicherung im Zielgewebe über einen höheren Markierungsgrad des Antikörpers zu verstärken. Stärkere Markierung bedeutet höheres Risiko der Schädigung des Antikörpers sowie größere Neigung zu unspezifischer Bindung und beschleunigte Metabolisierung. In diesem Punkt sind monoklonale Antikörper oft wegen ihrer einheitlichen Struktur stärker gefährdet als heteroklonale.

Ohne an dieser Stelle auf die Szintigraphie näher eingehen zu können, sei doch erwähnt, daß für die derzeit benutzten Gammakameras das am häufigsten verwendete Radionuclid ¹³¹I (γ : 0.36 MeV, $t_{1/2}$ = 8.0 d) nicht optimal ist. Besser geeignet erscheint das Isotop ¹²³I mit einer Gammastrahlung von hauptsächlich 1.60 MeV; seine kurze Halbwertszeit (13.3 h) wirft jedoch häufig Probleme bei der Zulieferung auf. Kurze Halbwertszeiten sind aber ge-

nerell wegen der damit verbundenen geringeren Strahlenbelastung des Patienten von Interesse. Doch muß bei der Radioimmunszintigraphie berücksichtigt werden, daß brauchbare Tumor/Hintergrund-Verhältnisse im allgemeinen frühestens erst nach 2 d erhalten werden, es sei denn, man verwendet Fab- oder F(ab')₂-Fragmente wie oben beschrieben. Aus diesem Grunde hat das in der klassischen Organdarstellung fast ausschließlich benutzte ^{99m}Tc (γ : 0.14 MeV, $t_{1/2} = 6.1$ h) hier keine sehr große Chance. Größere Aussichten auf Erfolg haben komplexbildende Radionuclide wie ¹¹¹In (γ : 0.17, 0.25 MeV, $t_{1/2} = 2.8$ d) oder ⁶⁷Ga (γ : 0.09, 0.18, 0.30, 0.39 MeV, $t_{1/2} = 3.3$ d), obwohl sie nicht direkt, sondern über einen Chelatbildner wie Diethylen-triamino-pentaessigsäure (DTPA) an das Antikörpermolekül gebunden werden können. Die Brauchbarkeit speziell von ¹¹¹In für die Radioimmunszintigraphie von Tumoren hat sich bereits erwiesen^[100], obwohl bei diesem Radionuclid häufig Probleme mit unspezifischer Anreicherung in Leber, Milz und Nieren auftreten.

Die monoklonalen Antikörper haben in den wenigen Jahren, die sie zur Verfügung stehen, ihre Eignung für die Radioimmundetektion bereits unter Beweis gestellt; die Radioimmunszintigraphie hat sich schon heute konkurrierenden Nachweismethoden einschließlich der Röntgen-Computertomographie als ebenbürtig gezeigt. Auf diesem Gebiet sind in allernächster Zeit durch das Aufdecken neuer Antikörperspezifitäten, Testen vorhandener Antikörper auf Spezifität und Avidität (Stärke der Antigen-Antikörper-Bindung), Fortführung der Standardisierung von Antikörperfragmenten sowie Verbesserung der Abstimmung der Meßtechnik auf die Strahleneigenschaften der Radionuclide bedeutende, wenn nicht gar spektakuläre Erfolge zu erwarten. Dieser Entwicklung folgen erste therapeutische Anwendungen mit radioaktiv markierten Antikörpern (Radioimmuntherapie), die an einigen wenigen Zentren schon durchgeführt werden^[124]. Zudem ergeben Lokalisationsexperimente wichtige Hinweise für die spätere Anwendung von Immunoxinen oder Immuncytostatica (siehe nächsten Abschnitt).

5.4.2. Immunoxine: Probleme bei der Herstellung und Anwendungsmöglichkeiten

Unter Immunoxinen und bestimmten *Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten* versteht man cytotoxische Agentien^[125-128], die über eine spezifische Antikörperbindungsstelle selektiv ihre Zielzelle, z.B. eine Tumorzelle, erreichen sollen. Dort soll das toxische Agens in den Stoffwechsel der Zelle eingreifen und ihr Absterben verursachen.

Bei der Herstellung dieser Konjugate müssen verschiedene Probleme gelöst werden, von denen im folgenden einige genannt seien. Zunächst muß ein möglichst affiner Antikörper der erforderlichen Spezifität in reiner und nativer Form isoliert werden (Tabelle 7). Hier bieten sich besonders die monoklonalen Immunglobuline an, die gegenwärtig aber im wesentlichen nur von der Maus stammen; bei einer späteren in-vivo-Anwendung am Menschen können damit Antigenitätsprobleme auftreten. Es stellt sich auch die Frage, welche Immunglobulinklasse oder -subklasse besonders geeignet ist. Denn mit ihrer Wahl wird entschieden, welche biologische und Fc-vermittelte

Tabelle 7. Immunoxine: Probleme, die mit dem Antikörper verknüpft sind.

Problem	mögliche Lösung
Spezifität/Affinität	monoklonale Antikörper
Reinheit/Nativität	spezielle Fraktionierung
Antigenität	humane monoklonale Antikörper
Pharmakokinetik	
enzymatische Spaltbarkeit	
chemische Modifizierbarkeit	Wahl der geeigneten Klasse oder Subklasse

Aktivitäten der Antikörper einmal ausüben kann und welche chemischen Modifikationen anwendbar sind. Die bei der Isolierung oder Enzymspaltung zur Herstellung bestimmter Antikörperfragmente auftretenden Probleme sind schon in Abschnitt 4.2 diskutiert worden.

Bei der Auswahl der toxischen Komponente kann zwischen unterschiedlichen Wirkprinzipien gewählt werden (Tabelle 8); es stehen verschiedene Toxine, Cytostatica oder auch Radionuclide zur Verfügung. Bei Toxinen wie Ricin, Abrin oder Diphtherietoxin handelt es sich um Proteine, die die Proteinsynthese hemmen können. Man kann bei ihnen zwischen zwei funktionell unterschiedlichen Molekülbereichen unterscheiden: einem, der die toxische Aktivität enthält (A-Kette oder A-Fragment) und einem, auf dem die Bindungsstelle für Zelloberflächenrezeptoren lokalisiert ist (B-Kette oder B-Fragment). Um unerwünschte Wechselwirkungen mit anderen Zellen als denen des Zielgewebes („Targetzellen“) zu vermeiden, muß vor der Kupplung an den Antikörper oder das Antikörperfragment entweder die A-Kette (A-Fragment) vom Gesamt molekül abgetrennt oder die betreffende Bindungsstelle für Kohlenhydrate auf der B-Kette inaktiviert werden. Ganz allgemein bieten sich Toxin-Antikörper-Konjugate bei geringer Antigendichte auf der Zielzelle an, da schon wenige Toxinmoleküle den Zelltod verursachen können.

Tabelle 8. Immunoxine: Probleme, die mit der toxischen Komponente verknüpft sind.

Problem	mögliche Lösung
Auswahl des toxischen Agens (Toxin, Cytostaticum, Radionuclid etc.)	Ermittlung der Antigendichte auf der Zielzelle
Unerwünschte Wechselwirkungen	Modifizierung der toxischen Komponente
Quantität am Zielort	Carrier-Moleküle

Auch niedermolekulare Cytostatica wie Methotrexat und die zu den Anthracyclinen gehörenden Adriamycin und Daunomycin können verwendet werden; diese Verbindungen können die Zellteilung inhibieren. Grundsätzlich lassen sich diese Substanzen direkt an ein Antikörpermolekül kuppeln. Da im Vergleich zu den Toxinen relativ große Mengen benötigt werden, um eine Zelle zu zerstören, müssen viele Moleküle an den Antikörper gebunden werden. Dabei wird jedoch im allgemeinen die spezifische Bindungsaktivität des Immunglobulins erniedrigt^[127]. Deshalb zieht man in vielen Fällen die Verwendung von Trägermolekülen (Carrier-Molekülen) in Betracht: Ein Trägermolekül wird, mit Cytostatica beladen, an ein Antikörpermolekül gekuppelt.

Die Probleme, die sich dem Biochemiker stellen, wenn er den Antikörper (das spezifische Bindungsprinzip oder

die „Zieleinrichtung“) mit dem Toxin (dem toxischen Prinzip) zu einem Konjugat verknüpft, sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Strategie der Kupplung muß grundsätzlich so sein, daß die Aktivität beider Komponenten

Tabelle 9. Immunoxine: Probleme, die mit der Herstellung von Konjugaten aus Antikörpern und cytotoxischen Agentien verknüpft sind.

Problem	mögliche Lösung
Aktivität/Stabilität reproduzierbare Herstellung Ausbeute	Wahl der geeigneten Kupplungsmethode
in-vivo-Spaltbarkeit der Konjugatbindung	Heterobifunktionelle Reagentien
Bildung von Homopolymeren	Auswahl spezifischer Bindungsstellen
Statistische Bindung	
Antigenität/Löslichkeit	Auswahl des geeigneten Kupplungsprinzips

möglichst unbeeinträchtigt bleibt. Kupplungsmethode und Spacer müssen so gewählt werden, daß stabile Konjugate reproduzierbar und mit guter Ausbeute entstehen; im Regelfall müssen die Konjugate durch einen Reinigungsschritt erst von überschüssigen Ausgangskomponenten getrennt werden. Andernfalls besteht die Gefahr, daß die nicht an ein cytotoxisches Agens gekuppelten, freien Antikörpermoleküle kompetitiv am späteren Reaktionsgeschehen teilnehmen und somit die Effektivität der Konjugate verringern. Besonders wichtig ist, daß die Bindung zwischen Antikörper und Toxin nach der Endozytose im Phagosom wieder gelöst werden kann, damit das toxische Prinzip zur Wirkung kommt^[129-131].

Sind wie bei einer Toxin-Antikörper-Kupplung zwei Proteine zu verknüpfen, so ergeben sich spezielle Probleme (Abb. 12). Aufgrund der mehr oder weniger statistischen Verteilung bestimmter, häufig zu Kupplungsreaktionen benutzter Gruppierungen (ϵ -Aminogruppe des Lysins, Carboxygruppe der Glutamin- oder Asparaginsäure), erfolgt



Abb. 12. Probleme, die bei einer Kupplung von monoklonalen Antikörpern (MA) an cytotoxische Agentien (ZA) auftreten können, zeigt die untere Bildhälfte: Es kann zur Bildung von Homopolymeren kommen und Antikörperbindungsstellen können blockiert werden. Angestrebte Konjugationen über Gruppierungen [z. B. Kohlenhydratanteil im Fc-Bereich (oben links) oder SH-Gruppen ehemaliger Inter-H-Ketten-Disulfidbrücken im Fab'-Fragment (oben rechts)], die keine Beeinträchtigung der Antikörperbindungsstelle verursachen.

die Konjugatbildung je nach Reaktivität über unterschiedliche Molekülorte, also auch über solche, die in der Nähe der Antikörperbindungsstelle liegen; dies kann zur Blockade dieser Stelle führen.

Heterobifunktionelle Kupplungsreagentien sind grundsätzlich vorzuziehen, denn sie helfen, die Bildung von Homopolymeren zu verhindern, also von Antikörper-Antikörper- und Toxin-Toxin-Konjugaten. Die erhaltenen Substitutionsgrade sind immer nur gemittelte Werte. Es existieren also sowohl höher als auch niedriger substituierte Konjugate, von denen die höher substituierten eine größere Chance haben, an der späteren Reaktion teilzunehmen. In vielen Fällen ist bei erhöhter Substitution die spezifische Antikörperaktivität geringer. An diesem Beispiel wird auch klar, daß in Konjugaten überschüssige, nicht an der Kupplung beteiligte Gruppierungen erhalten bleiben können, die für eine spätere Applikation zusätzliche Probleme aufwerfen.

Ideal wären also Methoden, bei denen zur Konjugatbildung Gruppierungen verwendet werden, die aufgrund ihrer Position im Molekül keine Beeinträchtigung der Antikörperbindungsstelle erwarten lassen. Der vorwiegend im Fc-Bereich des Moleküls gelegene Kohlenhydratanteil oder die im Fab'-Fragment vorhandenen SH-Gruppen der ehemaligen Inter-H-Ketten-Disulfidbrücken entsprechen diesen Anforderungen. So lassen sich SH-Gruppen mit verschiedenen Reagentien in aktivierte Disulfidbrücken überführen, die ihrerseits wieder mit der SH-Gruppe einer Ricin-A-Kette das gewünschte Konjugat bilden.

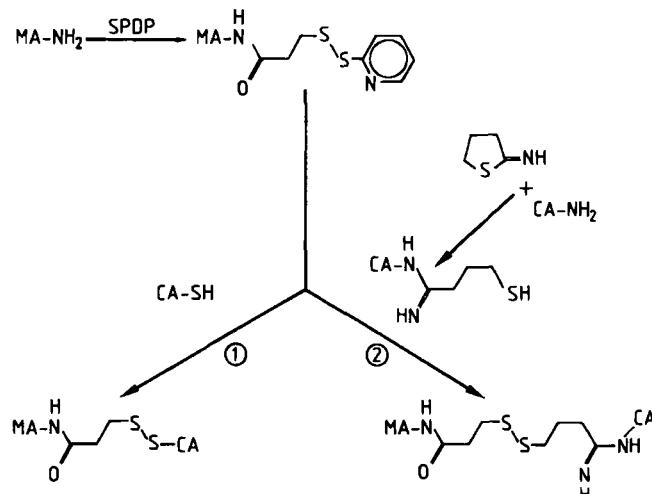


Abb. 13. Synthese von Konjugaten aus monoklonalen Antikörpern (MA) und cytotoxischen Agentien (CA): Mit Hilfe des heterobifunktionellen Reagens N-Succinimidoyl-3-(2-pyridyl)dithio)propionat (SPDP) können in monoklonale Antikörper aktivierte Disulfidbrücken eingeführt werden. Über SH-Gruppen, die entweder im cytotoxischen Agens bereits vorhanden sind (Reaktionsweg ①) oder eingeführt werden müssen (z. B. mit Iminothiolan; Reaktionsweg ②), erfolgt anschließend die Reaktion zum gewünschten Kupplungsprodukt.

Oft können jedoch viele Methoden entweder aufgrund hoher Verluste bei der Herstellung der Fab'-Fragmente oder aufgrund schlechter Ausbeuten bei der Kupplungsreaktion nicht eingesetzt werden. Dann bleibt die Möglichkeit über Aminogruppen des ungespaltenen Immunglobulins mit Hilfe spezieller Reagentien (SPDP u. a.) aktivierte Disulfide herzustellen, die dann in analoger Weise zur Synthese der Konjugate verwendet werden können (Abb.

13). Somit müssen letztlich immer pragmatisch Kompromisse gesucht werden.

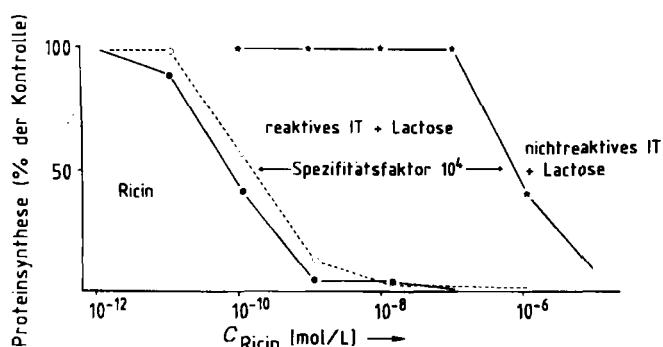


Abb. 14. Dosisabhängige Beeinflussung der Proteinsynthese in einem in-vitro-Zellsystem durch Ricin-Antikörper-Konjugate. Die Immuntoxine (IT) wurden in Gegenwart von 0.1 mol/L Lactose getestet, um die unspezifische Zellbindung über die Ricin-B-Kette zu unterdrücken (weitere Erläuterungen siehe Text).

In Abbildung 14 ist die dosisabhängige Wirkung eines Ricin-Antikörper-Konjugates in einem in-vitro-Zellsystem, in dem die Proteinsynthese über den ^{14}C -Leucin-Einbau quantitativ gemessen wurde, dargestellt. Da in diesem Experiment nicht die Ricin-A-Kette, sondern das vollständige Toxinmolekül an den monoklonalen Antikörper gekuppelt wurde, mußte die auf der B-Kette lokalisierte unspezifische Bindungsstelle für ubiquitär vorkommende Kohlenhydrat-Zelloberflächenstrukturen mit terminaler Galaktose durch Zusatz von Lactose (0.1 mol/L) blockiert werden. Das reaktive Immuntoxin weist eine mit dem freien Ricin vergleichbare Wirkung auf, während ein analoges Konjugat mit einem nicht-reaktiven monoklonalen Antikörper um etwa vier Größenordnungen (Spezifitätsfaktor) weniger toxisch ist.

Es ist deutlich geworden, wie sehr man im individuellen Fall mangels detaillierter Kenntnisse auf ein empirisches Vorgehen angewiesen ist. Für die in-vivo-Anwendung von cytotoxischen Agentien, die an Antikörper gebunden sind, gilt dies ganz besonders: Wie in Abbildung 15 schematisch angedeutet, erwarten wir, daß das Konjugat zunächst mit

einem membranständigen Antigen der Zielzelle reagiert^[132]. Die richtige Antikörperspezifität einerseits und die Stabilität des Antigens andererseits gewährleisten also, daß der auf der Zelloberfläche entstehende Antigen-Antikörperkomplex nicht wieder schnell abgeschnürt, sondern durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Das cytotoxische Prinzip wird anschließend im Phagosom wieder freigesetzt, um letztlich die Proteinsynthese oder die DNA-Replikation zu inhibieren. Bei einer Tumorthерapie sollte diese Blockade mehr als 99.99% der Targetzellen inaktivieren und abtöten, um effektiv zu sein^[133, 134]. Eine Variabilität des Zielantigens, wie sie bei Tumormetastasen auftritt, begrenzt die Wirksamkeit. Mechanismen, die die unspezifische Aufnahme von Agentien auch in Nicht-Targetzellen ermöglichen, können zu Nebenreaktionen mit allen Konsequenzen führen. Sicherlich wird die Verwendung der relativ kleinen, monovalenten Antikörperfragmente mit ihnen auch im Konjugat kürzeren Halbwertszeiten vorteilhaft sein.

5.4.3. Transplantation

Bei der therapeutischen Nutzung von monoklonalen Antikörpern der Maus müssen auch Fc-vermittelte Immunreaktionen berücksichtigt werden (siehe Abschnitt 5.3.2). Für die Verwendung von monoklonalen Antikörpern des Typs CD3 mit T-Zell-aktivierenden Eigenschaften muß dies zumindest dann bedacht werden, wenn sie zur Immunsuppression (bei Organ- und Knochenmarktransplantationen) eingesetzt werden. Klinische Erfahrung mit Antikörpern der CD3-Spezifität ist bisher jedoch nur mit einem T-Zell-aktivierenden Antikörper (OKT3) vorhanden. Dieser Antikörper diente im wesentlichen zur Behandlung von Nierentransplantationspatienten, und zwar sowohl prophylaktisch als auch bei akuten Abstoßungskrisen^[135-137]. In der allogenen Knochenmarktransplantation wurde OKT3 zur Vermeidung von Transplantat-Wirt-Reaktionen (graft-versus-host(GvH)-Reaktionen) sowohl zur in-vitro-Eliminierung immunreaktiver T-Zellen eingesetzt als auch zur in-vivo-Behandlung bei akuter GvH-Reaktion^[138, 139]. Während bei Organtransplantationen und bei allogener Knochenmarktransplantation bei Leukämiepatienten mit OKT3 ein überwiegend positiver Therapieeffekt erzielt werden konnte, war eine OKT3-in-vitro/in-vivo-Therapie bei schweren kombinierten Immundefekten (severe combined immune deficiency (SCID)) nicht in der Lage, GvH-Reaktionen zu vermeiden^[140].

Sowohl bei der Organ- als auch bei der allogenen Knochenmarktransplantation wurden auch monoklonale Antikörper mit anderen Spezifitäten als CD3 eingesetzt. Die der jeweiligen Auswahl der monoklonalen Antikörper zugrundeliegenden Überlegungen und Experimente können hier nicht im einzelnen diskutiert, sondern nur exemplarisch aufgezeigt werden. Bei der allogenen Knochenmarktransplantation wurde *Campath 1* verwendet, ein monoklonaler Ratten-Antikörper der IgM-Klasse mit breiter Reaktivität auf mononukleäre Zellen; er wurde genutzt, weil er mit Humankomplement Zielzellen wirksam lysieren kann^[141]. Zum Ausschalten von *Escape*-Mechanismen und zur exakteren Definition von Zielzellpopulationen werden oft Mischungen von mehreren Antikörpern bevorzugt, wo-

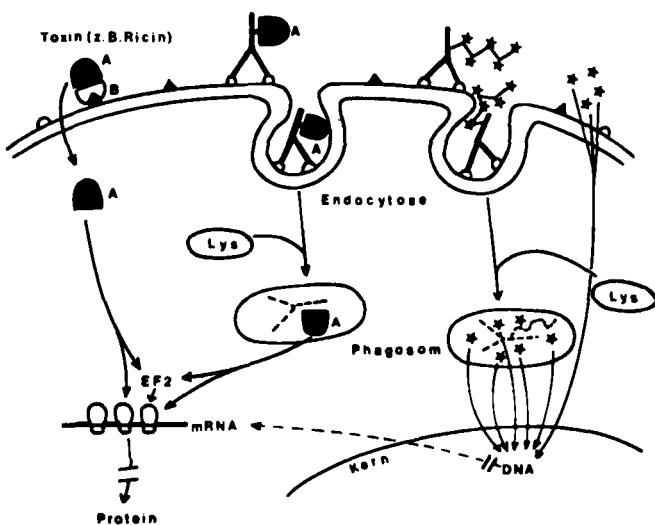


Abb. 15. Schematische Darstellung der in-vivo-Wirkungsmechanismen von Immuntoxinen und cytotoxischen Agentien (weitere Erläuterungen siehe Text). ▲ = Rezeptor, □ = Zellantigen, * = Cytostaticum, EF = Elongationsfaktor, Lys = Lysosom.

bei die Zellelimination entweder über eine Komplementvermittelte Cytolyse erfolgt oder die Antikörper als Immunitoxin direkt wirksam werden^[142, 143].

Bei Organtransplantationen wird mit einem Anti-T12-Antikörper ähnlich wie bei OKT3 ebenfalls der immunreaktive T-Lymphozyt als Zielzelle getroffen^[144]. Eine andere Population von Zielzellen liegt der Therapie mit CBL1 zugrunde. Dieser Antikörper könnte in der Lage sein, die während einer Transplantatabstoßungsreaktion aktivierten B-Lymphozytenklone zu eliminieren^[145].

5.4.4. Human-Hybridome

Monoklonale Antikörper der Maus besitzen gegenüber konventionellen Antiseren zwar den entscheidenden Vorteil der Monospezifität, für die Beurteilung der therapeutischen Brauchbarkeit muß jedoch die Gesamtheit des Immunglobulinmoleküls berücksichtigt werden, da in komplexen Immunreaktionen vielfach Fc-vermittelte Immunmechanismen eine Rolle spielen (siehe Abschnitt 3.2). Aufgrund des Polymorphismus von humanen Fc-Rezeptoren können Maus-Immunglobuline der Subklasse IgG1 oder IgG2b nicht oder nur eingeschränkt in analoger Weise wie Human-Immunglobuline prozessiert werden^[67, 146]. Fc-vermittelte Immunreaktionen wie die zelluläre Cytolyse (ADCC) können deshalb nicht mit gleicher Wirksamkeit wie mit Kaninchen- oder Human-Antikörpern ablaufen. Außerdem sind Maus-Immunglobuline für das menschliche Immunsystem Antigene, so daß es nach in-vivo-Applikation von monoklonalen Antikörpern der Maus zur Bildung von Anti-Maus-Ig-Antikörpern kommen kann. Bei hohen Tiern können solche Anti-Maus-Ig-Antikörper die Therapie beeinträchtigen. Derartige Schwierigkeiten sind bei der Anwendung monoklonaler Antikörper humanen Ursprungs nicht zu erwarten^[147].

Prinzipiell lassen sich humane monoklonale Antikörper durch drei grundlegend verschiedene Techniken herstellen:

- durch Epstein-Barr-Virus(EBV)-Transformation von B-Lymphozyten^[148-150],
- durch Zellfusion in Analogie zum Maussystem und
- durch Heterohybride Maus-Mensch (Maus-Myelom-Zelllinie).

Für die Herstellung antigenspezifischer, monoklonaler Antikörper humanen Ursprungs ist die Verfügbarkeit von passend stimulierten Humanlymphozyten bisher häufig der limitierende Faktor. Während bei der Maus das Immunsystem in der Regel über eine in-vivo-Immunisierung aktiviert werden kann – nur in Ausnahmefällen, z.B. bei extrem geringen Antigenmengen, waren in-vitro-Immunisierungen vorteilhafter – muß die Stimulation humaner B-Zellen für die Mehrzahl der Antigene in vitro erfolgen. Erst Verbesserungen der Kulturbedingungen, wie sie z.B. durch Verwendung von serumfreiem *Iscove-Medium* möglich sind, und Optimierung der Hilfe der T-Zellen für die Stimulation der B-Zellen erlaubten für ausgewählte Antigene eine effektivere in-vitro-Induktion der humanen Ig-Synthese. Dank des zunehmenden Verständnisses der Aktivierungsmechanismen der Lymphozytenstimulation und der biochemischen Charakterisierung der daran beteiligten Faktoren ist es seit kurzem möglich, gezielt auch in die

Differenzierung und Proliferation der B-Lymphozyten einzugreifen^[56, 151, 152]. Wenn es mit Hilfe gentechnologisch hergestellter Mediatoren (B-Zellwachstumsfaktor (BCGF), B-Zelldifferenzierungsfaktor (BCDF), Interleukin-2, γ-Interferon) gelingt, selektiv antigenspezifische Vorläuferzellen zu expandieren, wäre damit die Voraussetzung geschaffen, gezielt humane monoklonale Antikörper mit hoher Ausbeute herzustellen; die Immortalisierung der B-Lymphozyten (Transformation oder Fusion) würde dann eine untergeordnete Rolle spielen.

Seit Olsson und Kaplan die ersten monoklonalen Antikörper humanen Ursprungs beschrieben^[153], wurden sehr unterschiedliche Wege zur Isolierung aktiver B-Lymphozyten beschritten. Wurden anfangs hauptsächlich monoklonale Antikörper gegen Antigene isoliert, bei denen der Blutspender natürlich oder künstlich immunisiert worden war, so können nun auch humane monoklonale Antikörper mit Spezifität gegen Tumoren über die Fusion von Lymphozyten aus den Tumor-drainierenden Lymphknoten hergestellt werden. In Tabelle 10 ist eine Auswahl humarer monoklonaler Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten zusammengestellt.

Tabelle 10. Spezifitäten von humanen monoklonalen Antikörpern.

Bindungsspezifität für	Lit.
Tetanus-Toxoid [a]	[159, 160]
Diphtherie-Toxoid [a]	[159]
Schaferythrozyten	[156]
Thyrotropin-Rezeptor	[158]
Haemophilus influenzae B.	[159]
Keyhole-Limpet-Hämocyanin	[161]
Influenza	[154]
Pneumokokken	[155]
humane monoklonale Antikörper mit Reaktivität gegen Human-Tumorzellen (Colon, Lunge, Brust, Gliom, Melanom und andere)	[157, 162-166]

[a] Ein Toxoid ist ein Toxin, dessen Antigenität erhalten ist, dem aber die toxische Wirkung durch Inaktivierung genommen wurde.

Es erscheint bemerkenswert, daß Xeno-Hybride, die auf Fusionen von Humanzellen mit Mauszellen beruhen, mit relativ hoher Produktivität herstellbar sind^[159, 161, 164, 165]. Die in-vivo-Anwendung humaner monoklonaler Antikörper beschränkt sich bisher auf Fallstudien bei Tumorpatienten^[167], mit der Isolierung solcher Antikörper gegen weitere, unterschiedliche Spezifitäten ergeben sich jedoch insbesondere für die Tumortherapie neue Aussichten.

Auch für die Gewinnung von Hyperimmunseren, spezifisch gegen bakterielle und virale, infektiöse Erreger, für die geeignete und gut verträgliche Impfstoffe nicht oder nur schwierig herstellbar sind, wären humane monoklonale Antikörper sehr erwünscht.

5.4.5. Probleme bei der Anwendung monoklonaler Antikörper am Menschen

Die in-vivo-Applikation monoklonaler Antikörper, seien sie nun an cytotoxisch wirksame Agentien gekuppelt oder nicht, wirft Probleme auf, denen vor allem Gesundheitsbehörden bei ihrer Zulassung als Arzneimittel Rechnung tragen müssen. Bisher sind monoklonale Antikörper nur in

relativ beschränktem Maß für die Therapie am Menschen genutzt worden, so daß noch keine allgemeine Aussage über Verträglichkeit und Nebenwirkungen gemacht werden kann¹⁶⁸! Es ist verständlich, daß bei diesen neuartigen Arzneimitteln zunächst an alle nur denkbaren Sicherheitsvorkehrungen und Prüfungen gedacht wird. Natürlich muß je nach Anwendungszweck (Antitumortherapie, Immunmodulation, Immunsuppression, passive Immunisierung, Diagnose etc.) eine Schaden-Nutzen-Bilanzierung vorgenommen werden. Sicherlich wird im Laufe der Zeit die sich ansammelnde Erfahrung helfen, Kriterien von wirklich praktischer Bedeutung zu erkennen.

So stellt man schon an die zur Fusionierung verwendeten Zellen (Myelomlinien, B-Lymphozyten) und an die klonierte Hybridomlinie, die den betreffenden monoklonalen Antikörper produziert, hohe Anforderungen bezüglich Freiheit von Bakterien, Viren (besonders wichtig: lymphozytäre Choriomeningitis(LCM)- und *respiratory-enteric-orphan*(REO)-Viren Typ 3) und Mykoplasmen. Das Reinigungsverfahren für monoklonale Antikörper soll reproduzierbar gewährleisten, Viren und unerwünschte Makromoleküle, einschließlich DNA, zu entfernen. Natürlich müssen auch Sterilität, Pyrogenfreiheit, Stabilität des Endprodukts sowie dessen biochemische (z. B. Subklassenzugehörigkeit, elektrophoretische Beweglichkeit, Aggregatgehalt) und funktionelle Charakterisierung (z. B. spezifische Aktivität, Titer) gesichert sein. Ebenso müssen allgemeine und spezifische pharmakologische und toxikologische Untersuchungen am Tier die Unbedenklichkeit des Produkts für die Anwendung am Menschen wahrscheinlich machen. Alle hier nur auszugsweise aufgezählten Untersuchungen müssen selbstverständlich ausreichend dokumentiert werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Erfolge immunologischer Forschung der vergangenen einhundert Jahre liegen in der Begründung der Antikörpertherapie, dem Erkennen vieler Infektionserreger und dem Bereitstellen zahlreicher Impfstoffe sowie im Ausbau der Immundiagnostik. Vor allem in den letzten zwanzig Jahren hat diese Wissenschaft das Immunsystem genauer erforscht und damit ermöglicht, neue Therapieformen aufzugreifen.

Der Zugang zu monoklonalen Antikörpern hat nun einen weiteren Meilenstein in der Immunologiegeschichte gesetzt: Die Entdeckung, sie in vitro durch immortalisierte Hybridzellklone produzieren zu können, ist weit über die Immunologie hinaus für viele Bereiche von Wissenschaft, Technik und Medizin von allgemeinem Interesse geworden.

Die besonderen Vorteile monoklonaler Antikörper zeigten sich am schnellsten in der Immundiagnostik. Die Diskussion über ihre Überlegenheit gegenüber den konventionellen, heteroklonalen Antikörperpräparaten dauert jedoch noch an. Offensichtlich sind die Vorteile monoklonaler Antikörper für die Feinanalyse und für die Differenzierung von Oberflächenstrukturen, z.B. bei Immunzellen, Tumorzellen, Parasiten, Bakterien und Viren. Aber auch die histologische Differenzierung von Gewebestrukturen darf interessante Fortschritte erwarten.

Weit wichtiger aber könnten neue medizinische Anwendungen werden, was sich aus Pilotstudien auch schon abzeichnet. Die Lokalisation von Tumoren in einem lebenden Organismus mit radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern zeitigt erste Erfolge, auch wenn sich die Suche nach geeigneten Antikörpern noch aufwendig und schwierig gestaltet. Das Ziel ist, für sehr viele Tumorarten spezifische oder tumorassoziierte Antigene neu aufzufinden und zu charakterisieren und zugleich nachzuweisen, daß derartige Substanzen auf normalem Gewebe nicht oder nur in vernachlässigbar niedriger Konzentration vorkommen. Das nächste Ziel ist dann die Tumortherapie, entweder mit monoklonalen Antikörpern direkt oder mit Antikörperkonjugaten (mit Radionucliden in geeigneter Dosierung, mit Tumocytostatica oder mit Toxinen). Es gibt sehr ermutigende Anfangserfolge bei einigen wenigen Tumorarten, doch sind hier die Ergebnisse weiterer klinischer Prüfungen abzuwarten.

Auch für immunregulatorische Therapien finden, neben den heute gentechnologisch zugänglichen Immunmediatoren, monoklonale Antikörper stärkere Beachtung. Erste klinische Studien in der Organ- und Knochenmarktransplantation belegen den Wert dieser Behandlungsart. Hoffnungen knüpfen sich auch an Antikörper, die unerwünschte Immunreaktionen bei Autoaggressionserkrankungen vielleicht zu behandeln erlaubten, etwa durch Inaktivierung und Elimination von immunologisch falsch geprägten Erkennungsstrukturen.

Inwieweit die konventionelle Immunsubstition mit homologen, menschlichen Antikörperpräparaten durch die spezifischen, monoklonalen Antikörper ersetztbar ist, hängt vom Fortschritt auf dem Gebiet der Human-Hybridome ab. Diese Systeme arbeiten noch nicht so gut wie die Maussysteme. Weitere Verbesserungen sind notwendig, und vor allem müssen Methoden der in-vitro-Stimulierung von noch ungeprägten B-Lymphozyten mit beliebigen Antigenen entwickelt werden. Dies ist zwar prinzipiell möglich, aber noch nicht im gewünschten Ausmaß und in beliebiger Richtung.

Weltweit wird mit und über monoklonale Antikörper intensiv geforscht, so daß vermutlich rasch viele ungelöste Fragen geklärt und verbesserte Methoden entwickelt werden. Auch die Einbeziehung gentechnologischer Methoden für die Herstellung von Antikörpern oder der manchmal vorteilhafteren Antikörperfragmente sollte interessante Resultate bringen.

Der revolutionierenden Hybridomatechnologie stehen leider eher konventionelle Produktionsverfahren gegenüber: Die heutigen Zellkulturmethoden sind vergleichsweise unterentwickelt und deshalb meist noch sehr teuer. Wenn man bedenkt, daß für die Herstellung von 1 kg eines Antikörpers, eine Menge, die für eine etablierte Therapie sicherlich erforderlich ist, ca. 100000 L Zellkultur ange-setzt werden müßten, dann werden Grenzen deutlich. Doch gibt es auch hier schon Anstrengungen, Methoden zu entwickeln, für die gleiche Antikörpermenge nur 1000 bis 10000 L Zellkultur zu benötigen. Diese ungünstige Situation ist auch bei der Herstellung von rekombinantem Protein in Säugetierzellkulturen gegeben. Die Anforderungen zweier moderner Biotechnologien werden sicherlich den dringend notwendigen Fortschritt in der Zellkultertechnologie sehr beschleunigen.

Frau Waltraud Noll danken wir für die außerordentliche und verständige Umsicht sowie die große Geduld bei der Reinschrift des Manuskripts.

Eingegangen am 19. Dezember 1984 [A 524]

- [1] E. von Behring, S. Kitasato, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **49** (1980) 1113.
- [2] G. M. Edelman, *Angew. Chem.* **85** (1973) 1083.
- [3] R. R. Porter, *Angew. Chem.* **85** (1973) 1097.
- [4] a) N. K. Jerne, *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **29** (1974) 39; b) *Ann. Immunol. Paris* **125C** (1-2) (1974) 373; c) N. K. Jerne, A. A. Nordin, *Science* **140** (1963) 405.
- [5] G. Köhler, C. Milstein, *Nature London* **236** (5517) (1975) 495.
- [6] S. Sell: *Immunologie, Immunopathologie und Immunität*, Verlag Chemie, Weinheim 1977.
- [7] W. E. Paul, *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York 1984.
- [8] G. Köhler in I. Lefkovits, B. Pernis: *Immunological Methods*, Academic Press, New York 1979, S. 391.
- [9] G. Köhler in I. Lefkovits, B. Pernis: *Immunological Methods*, Academic Press, New York 1979, S. 397.
- [10] C. Milstein, *Sci. Am.* **243** (1980) Nr. 4, S. 56; *Spektrum Wiss.* **1980**, Nr. 12, S. 96.
- [11] J. Deisenhofer, P. M. Coleman, R. Huber, H. Haupt, H. G. Schwick, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357** (1976) 435.
- [12] M. Marquardt, J. Deisenhofer, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **141** (1980) 368.
- [13] R. Huber, *Behring Inst. Mitt.* **76** (1984) 1.
- [14] A. Nisonoff, J. E. Hopper, S. B. Spring: *The Antibody Molecule*, Academic Press, New York 1975.
- [15] F. W. Putnam in F. W. Putnam: *The Plasma Proteins*, Vol. 3, 2. Aufl., Academic Press, New York 1977, S. 2-284.
- [16] H. U. Schorlemmer, D. Bitter-Suermann, D. C. Allison, *Immunology* **32** (1977) 929.
- [17] H. U. Schorlemmer, F. R. Seiler, D. Bitter-Suermann, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **66** (Suppl. 1) (1981) 183.
- [18] H. E. Schultzze, J. F. Heremans: *Molecular Biology of Human Proteins*, Vol. 1: *Nature and Metabolism of Extracellular Proteins*, Elsevier, Amsterdam 1966, S. 236ff.
- [19] P. Parham, M. J. Androlewicz, F. M. Brodsky, N. J. Holmes, J. P. Ways, *J. Immunol. Methods* **53** (1982) 133.
- [20] P. L. Ey, S. J. Prowse, C. R. Jenkin, *Immunochemistry* **15** (1978) 429.
- [21] M. Watanabe, T. Ishii, N. Naruchi, *Jpn. J. Exp. Med.* **51** (1981) 65.
- [22] I. Seppälä, H. Sarvas, F. Poterfy, O. Mäkelä, *Scand. J. Immunol.* **14** (1981) 335.
- [23] A. Nisonoff, F. C. Wissler, L. N. Lipman, D. L. Woernley, *Arch. Biochem. Biophys.* **89** (1960) 230.
- [24] T. Staehelin, B. Durrer, J. Schmidt, B. Takacs, J. Stocker, V. Miggiano, C. Stähli, M. Rubinstein, W. P. Levy, R. Hershberg, S. Pestka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (1981) 1848.
- [25] J. H. Nunberg, G. Rodgers, J. H. Gilbert, R. M. Snead, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (1984) 3675.
- [26] R. Hawkes, E. Niday, A. Matus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** (1982) 2410.
- [27] L. A. Sternberger, L. W. Harwell, N. H. Sternberger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** (1982) 1326.
- [28] M. D. Golan, R. Burger, M. Loos, *J. Immunol.* **129** (1982) 445.
- [29] G. S. David, R. Wang, R. Bartholomev, E. D. Sevier, T. H. Adams, H. E. Greene, *Clin. Chem.* **27/9** (1981) 1580.
- [30] M. N. Margolis, M. Mudgett-Hunter, J. Novotny, E. Haber in G. Hämerling, U. Hämerling, J. F. Kearney: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas. Perspectives and Technical Advances*, Elsevier, Amsterdam 1981, S. 367.
- [31] M. Mudgett-Hunter, M. N. Margolis, E. M. Rosen, E. Haber, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **39** (1980) 928.
- [32] Y. Kato, A. Paterson, J. J. Langone, *J. Immunol. Methods* **67** (1984) 321.
- [33] J. Hoebelke, S. Chamat, S. Marullo, J.-C. Guillet, A. D. Strosberg in S. Avrameas, P. Dreut, R. Masseyeff, G. Feldmann: *Immunoenzym. Tech. Proc. Int. Symp.* 1984, S. 307.
- [34] A. Hedin, L. Carlsson, A. Berglund, S. Hammerström, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (1983) 3470.
- [35] A. M. G. Bosch, W. J. H. M. Stevens, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **317** (1984) 725.
- [36] V. R. Zurawski, Y.-S. Liu, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* **30** (1984) 997.
- [37] H. Koprowski, M. Herlyn, Z. Steplewski, H. F. Sears, *Science* **212** (1981) 53.
- [38] R. C. Bast, M. Feeney, H. Lazarus, L. M. Nadler, R. B. Calvin, R. Knapp, *J. Clin. Invest.* **68** (1981) 1331.
- [39] H. G. Wada, J. Danisch, S. R. Baxter, M. M. Federici, R. C. Fraser, L. J. Brownmiller, J. C. Lankford, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* **28** (1982) 1862.
- [40] S. Schwarz, P. Berger, G. Wick, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **317** (1984) 727.
- [41] N. Rahamim, M. Inbar, C. S. Hexter, *Hybridoma* **3** (1984) 49.
- [42] L. Wang, C. S. Hexter, M. Inbar in G. Hämerling, U. Hämerling, J. F. Kearney: *Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas. Perspectives and Technical Advances*, Elsevier, Amsterdam 1981, S. 357.
- [43] T. J. Wiktor, A. Flamand, H. Koprowski, *J. Virol. Methods* **1** (1980) 33.
- [44] R. C. Nowinski, M. R. Tam, L. C. Goldstein, L. Stong, C. C. Kuo, L. Corey, W. E. Stamm, H. H. Handsfield, J. S. Knapp, K. K. Holmes, *Science* **219** (1983) 637.
- [45] G. Ruijs, E. J. Kraai, P. C. van Voorst Vader, J. Schirm, F. P. Schröder, *Lancet I* **1984**, 960.
- [46] R. Franz, *Laboratoriumsbl.* **34**, Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg 1984, S. 1.
- [47] P. Krauledat, F. Emmrich, R. Stute, G. Grenner, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **317** (1984) 737.
- [48] J. R. Wands, R. J. Carlson, H. Shoemaker, K. J. Isselbacher, F. L. Zarrow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (1981) 1214.
- [49] D. Richman, P. Cleveland, M. Oxman, K. van Wyke, R. G. Webster, *Proc. 5. Int. Congr. Virol.* **1981**, Abstracts S. 170.
- [50] R. G. H. Cotton, C. Milstein, *Nature London* **244** (1979) 244.
- [51] C. Milstein, A. C. Cuello, *Nature London* **305** (1983) 537.
- [52] T. Hofstaetter, P. Gronski, F. R. Seiler, *Behring Inst. Mitt.* **74** (1984) 3.
- [53] J. Martinis, G. S. David, R. M. Bartholomev, R. Wang, *Basic Life Sci.* **25** (1983) 129.
- [54] E. F. Ullman, M. Schwarzberg, K. E. Rubenstein, *J. Biol. Chem.* **251** (1976) 4172.
- [55] P. C. Kung, *J. Cutaneous Pathol.* **10** (1983) 457.
- [56] T. A. Waldman, S. Broder, *Adv. Immunol.* **32** (1982) 1.
- [57] B. Szperalski, W. König, *Immun. Infekt.* **12** (1984) 163.
- [58] M. A. Bach, J. F. Bach, *Clin. Exp. Immunol.* **45** (1981) 449.
- [59] R. F. Todd, S. C. Meuer, P. L. Romain, S. F. Schlossman, *Human Immunol.* **10** (1984) 23.
- [60] E. L. Reinherz, S. F. Schlossman, *Cell* **19** (1980) 821.
- [61] E. L. Reinherz, S. C. Meuer, K. A. Fitzgerald, R. E. Hussey, E. Levine, S. F. Schlossman, *Cell* **30** (1982) 735.
- [62] S. C. Meuer, K. A. Fitzgerald, R. E. Hussey, J. C. Hodgkin, S. F. Schlossman, E. L. Reinherz, *J. Exp. Med.* **157** (1983) 705.
- [63] S. C. Meuer, R. E. Hussey, D. A. Cantrell, J. C. Hodgkin, S. F. Schlossman, K. A. Smith, E. L. Reinherz, *Immunology* **81** (1984) 1509.
- [64] U. Landegren, J. Andersson, H. Wigzell, *Eur. J. Immunol.* **14** (1984) 325.
- [65] A. Bernard, L. Boumsell, J. Dausset, C. Milstein, S. F. Schlossman: *Leukocyte Typing*, Springer, Heidelberg 1984, S. 9.
- [66] J. P. Van Wauwe, J. R. DeMey, J. C. Goossens, *J. Immunol.* **124** (1980) 2708.
- [67] W. J. M. Tax, H. W. Willems, P. P. M. Reekers, P. J. A. Capel, R. A. P. Koene, *Nature London* **304** (1983) 445.
- [68] T. Abo, A. B. Tilden, C. M. Balch, K. Kumagai, G. M. Troup, M. D. Cooper, *J. Exp. Med.* **160** (1984) 303.
- [69] R. J. Rooney, G. N. Abraham, *J. Immunol.* **133** (1984) 154.
- [70] R. Kurrie, W. Seyfert, A. Trautwein, F. R. Seiler, *Transplant. Proc.* im Druck.
- [71] P. Hermanek, F. P. Gall: *Lungentumoren Kompendium der klinischen Tumorphathologie*, Bd. 2, Verlag Gerhard Witzstrock, Baden Baden 1979.
- [72] J. Holden, A. Churg, *Am. J. Surg. Pathol.* **8** (1984) 277.
- [73] F. Ramaekers, J. Puts, A. Kant, O. Moesker, A. Huysmans, P. Jap, C. Herman, P. Vooijs, *J. Submicrosc. Cytol.* **16** (1984) 151.
- [74] E. Heyderman, *J. Clin. Pathol.* **32** (1979) 971.
- [75] M. S. Hsu, L. Raine, H. Fanger, *J. Histochem. Cytochem.* **29** (1981) 577.
- [76] A. Yachi, K. Imai, H. Fujita, Y. Moriya, M. Tanda, T. Endo, M. Tsujisaki, M. Kawaharada, *J. Immunol.* **132** (1984) 2998.
- [77] C. Wagener, P. Petzold, W. Köhler, V. Tatovic, *Int. J. Cancer* **33** (1984) 469.
- [78] F. Buchegger, M. Schreyer, S. Carrel, J. P. Mach, *Int. J. Cancer* **33** (1984) 643.
- [79] K. Bosslet, G. Lüben, A. Schwarz, F. R. Seiler, K. H. Muhrer, G. Klöppel, K. Kayser, E. Hundt, H. P. Harthus, H. H. Sedlacek, unveröffentlicht.
- [80] J. U. Alles, K. Bosslet, unveröffentlicht.
- [81] H. Stein, K. C. Gatter, A. Herety, D. Y. Mason, *Lancet II* (1984) 71.
- [82] S. Eneström, J. Hed, P. Hultman, *J. Immunol. Methods* **37** (1980) 343.
- [83] J. Hed, S. Eneström, *J. Immunol. Methods* **41** (1981) 57.
- [84] N. M. Varki, R. A. Reisfeld, L. E. Walker, *Cancer Res.* **44** (1984) 681.
- [85] J. W. Said, G. Nash, S. Banks-Schlegel, A. F. Sasoon, S. Murakami, I. P. Shintaku, *Am. J. Pathol.* **113** (1983) 27.
- [86] L. DeLeij, S. Poppema, J. Klein Nulend, J. G. Ter Haar, E. Schwander, T. H. The, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **20** (1984) 123.
- [87] M. Herlyn, Z. Steplewski, D. Herlyn, H. Koprowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (1979) 1438.
- [88] H. P. Vollmers, W. Birchmeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (1983) 3729.

- [89] D. J. Adams, H. Hajji, D. P. Edwards, R. J. Bjercke, W. L. McGuire, *Cancer Res.* 43 (1983) 4297.
- [90] J. R. Harper, R. A. Reisfeld, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 71 (1983) 259.
- [91] C. Cillo, J. P. Mach, M. Schreyer, S. Carrel, *Int. J. Cancer* 34 (1984) 11.
- [92] J. M. Lloyd, T. O'Dowd, M. Driver, D. Tee, *J. Clin. Pathol.* 37 (1984) 131.
- [93] D. Colcher, P. Horan Hand, M. Nuti, J. Schlom, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3199.
- [94] G. Schulz, T. F. Burnol, R. A. Reisfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5407.
- [95] M. Seto, T. Takahashi, S. Nakamura, Y. Matsudaira, Y. Nishizuka, *Cancer Res.* 43 (1983) 4768.
- [96] D. Pressman, L. A. Sternberger, *J. Am. Chem. Soc.* 22 (1950) 2226.
- [97] D. Pressman, G. Keighley, *J. Immunol.* 59 (1948) 141.
- [98] J. L. Spar, R. L. Goodland, W. F. Bale, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100 (1959) 259.
- [99] D. C. Sullivan, J. S. Silva, C. E. Cox, D. E. Haagensen, C. C. Harris, H. F. Seigler, *Invest. Radiol.* 17 (1982) 350.
- [100] D. S. Fairweather, A. R. Bradwell, P. W. Dykes, A. T. Vaughan, S. F. Watson-James, S. Chandler, *Br. Med. J.* 287 (1983) 167.
- [101] J.-P. Mach, M. Forni, J. Ritschard, F. Buchegger, S. Carrel, S. Widgren, A. Donat, P. Alberto, *Oncodev. Biol. Med.* 1 (1980) 49.
- [102] D. M. Goldenberg, E. E. Kim, F. H. DeLand, S. Bennet, F. J. Primus, *Cancer Res.* 40 (1980) 2984.
- [103] D. M. Goldenberg, E. E. Kim, S. J. Bennett, M. O. Nelson, F. H. DeLand, *Gastroenterology* 84 (1983) 524.
- [104] K. R. Hine, A. R. Bradwell, T. A. Reeder, Z. Drolc, P. W. Dykes, *Cancer Res.* 40 (1980) 2993.
- [105] R. H. J. Begent, F. Searle, G. Stanway, R. F. Jewkes, B. E. Jones, P. Vernon, K. D. Bagshawe, *J. R. Soc. Med.* 73 (9) (1980) 624.
- [106] A. K. Halsall, D. S. Fairweather, A. R. Bradwell, J. C. Blackburn, P. W. Dykes, A. Howell, A. Reeder, H. R. Hine, *Br. Med. J.* 283 (1981) 942.
- [107] J.-F. Chatal, J.-C. Saccavini, P. Fumeleau, J.-Y. Donillard, C. Curtef, M. Kremer, B. LeMerel, H. Koprowski, *J. Nucl. Med.* 25 (1984) 307.
- [108] J.-P. Mach, J.-F. Chatal, J.-D. Lumbroso, F. Buchegger, M. Forni, J. Ritschard, C. Berche, J.-Y. Douillard, S. Carrel, M. Herlyn, Z. Steplewski, H. Koprowski, *Cancer Res.* 43 (1983) 5593.
- [109] P. J. Moldofski, J. Powe, C. B. Mulhern, N. Hammond, H. F. Sears, R. A. Gatenby, Z. Steplewski, H. Koprowski, *Radiology* 149 (1983) 549.
- [110] M. V. Pimm, N. C. Armitage, A. C. Perkins, J. D. Hardcastle, R. W. Baldwin, *Behring Inst. Mitt.* 74 (1984) 80.
- [111] R. M. Rainsbury, J. H. Westwood, R. C. Coombes, A. M. Neville, R. J. Ott, T. S. Kalirai, V. R. McCready, J.-C. Gazet, *Lancet II* 1983, 934.
- [112] S. M. Larson, J. P. Brown, P. W. Wright, J. A. Carrasquillo, I. Hellström, K. E. Hellström, *J. Nucl. Med.* 24 (1983) 123.
- [113] J.-P. Mach, F. Buchegger, M. Forni, J. Ritschard, S. Carrel, R. Egley, A. Donath, A. Rohner, *Curr. Top. Microbiol.* 104 (1983) 49.
- [114] J.-P. Mach, F. Buchegger, J. P. Grob, V. v. Fliedner, A. Bischof-Delaloye, B. Delaloye, *Br. J. Cancer* 50 (1984) 551.
- [115] A. A. Epenetos, S. Mather, M. Granowska, C. C. Nimmon, L. A. Hawkins, K. E. Britton, J. Shepherd, J. Taylor-Papadimitriou, H. Durbin, J. S. Malpas, *Lancet II* 1982, 999.
- [116] M. Granowska, J. Shepherd, K. E. Britton, B. Ward, S. Mather, J. Taylor-Papadimitriou, A. Epenetos, M. J. Carroll, C. C. Nimmon, L. A. Hawkins, M. Slevin, W. Flatman, T. Horne, J. Burchell, H. Durbin, W. Bodmer, *Nucl. Med. Commun.* 5 (1984) 485.
- [117] J.-P. Mach, S. Carrel, C. Merenda, B. Sordat, J.-C. Cerottini, *Nature London* 248 (1974) 704.
- [118] V. Moshakis, M. J. Bailey, M. G. Ormerod, J. H. Westwood, A. M. Neville, *Br. J. Cancer* 43 (1981) 575.
- [119] M. I. Colnaghi, G. L. Buraggi, M. Ghione: *Markers for Diagnosis and Monitoring of Human Cancer*, Academic Press, London 1982.
- [120] D. Pressman, E. D. Day, M. Blau, *Cancer Res.* 17 (1957) 845.
- [121] J.-P. Mach, F. Buchegger, S. Carrel, J. P. Grob, V. v. Fliedner, A. Delaloye, B. Delaloye, *Abstr. VI. Eur. Immunol. Meet. Interlaken/Schweiz 1984*, Abstracts S. 110.
- [122] A. A. Epenetos, C. C. Nimmon, J. Arklie, A. T. Elliott, L. A. Hawkins, R. W. Knowles, K. E. Britton, W. F. Bodmer, *Br. J. Cancer* 46 (1982) 1.
- [123] R. L. Wahl, C. W. Parker, G. W. Philpott, *J. Nucl. Med.* 24 (1983) 316.
- [124] N. Courtenay-Luck, A. A. Epenetos, K. E. Halnan, G. Hooker, J. M. B. Hughes, T. Krausz, J. Lambert, J. P. Lavender, W. G. MacGregor, C. J. McKenzie, A. Munro, M. J. Myers, J. S. Ort, E. E. Pearse, D. Snook, B. Webb, J. Burchell, H. Durbin, J. Kemshead, J. Taylor-Papadimitriou, *Lancet I* 1984, 1441.
- [125] S. Olsness, A. Pihl, *Pharmacol. Ther.* 15 (1982) 355.
- [126] A. H. Blair, T. I. Ghose, *J. Immunol. Methods* 59 (1983) 129.
- [127] T. I. Ghose, A. H. Blair, P. N. Kulkarni, *Methods Enzymol.* 93 (1983) 280.
- [128] E. S. Vitetta, J. W. Uhr, *Transplantation* 37 (1984) 535.
- [129] Y. Masuho, *J. Biochem.* 91 (1982) 1583.
- [130] F. K. Jansen in F. C. Middlebrook, L. D. Kohn: *Receptor-mediated Binding and Internalization of Toxins and Hormones*, Academic Press, New York 1981, S. 357.
- [131] E. Hurwitz, *J. Appl. Biochem.* 2 (1980) 25.
- [132] Z. Steplewski, T. H. Chang, M. Herlyn, H. Koprowski, *Cancer Res.* 41 (1981) 2723.
- [133] P. Poncelet, H. E. Blythman, D. Carriere, P. Casselas, D. Dussossoy, O. Gros, P. Gros, F. K. Jansen, J. C. Laurent, M. C. Liance, H. Vidal, G. A. Voisin, *Behring Inst. Mitt.* 74 (1984) 94.
- [134] K. A. Krolick, J. W. Uhr, E. S. Vitetta, *Nature London* 295 (1982) 604.
- [135] P. S. Russel, R. B. Colvin, A. B. Cosimi, *Annu. Rev. Med.* 35 (1984) 63.
- [136] A. B. Cosimi, R. C. Burton, R. B. Colvin, G. Goldstein, F. L. Delmonico, M. P. LaQuaglia, N. Tokopff-Rubin, R. H. Rubin, J. T. Herrin, P. S. Russel, *Transplant. Proc.* (1981) 535.
- [137] G. Goldstein, J. Schindler, *Transplant. Proc.*, im Druck.
- [138] H. G. Prentice, G. Janossy, D. Skeggs, H. A. Blacklock, K. F. Bradstock, G. Goldstein, A. V. Hoffbrand, *Lancet I* (1982) 700.
- [139] H. A. Blacklock, H. G. Prentice, M. J. M. L. Gilmore, E. Pricejones, S. Schey, N. Tidman, G. Goldstein, G. Janossy, A. V. Hoffbrand, *Exp. Hematol. Copenhagen* 11 (1983) 37.
- [140] A. R. Hayward, S. Murphy, J. Githens, G. Troup, D. Ambruso, *J. Pediatr.* 100 (4) (1982) 665.
- [141] G. Hale, S. Bright, G. Chumbley, T. Hoang, D. Metcalf, A. J. Munro, H. Waldmann, *Blood* 62 (1983) 873.
- [142] D. A. Valleria, R. C. Ash, E. D. Zanjani, T. W. Lebien, P. C. L. Beverley, D. M. Neville, Jr., R. J. Youle, *Science* 222 (1983) 512.
- [143] J. A. Hansen, P. J. Martin, M. Kamoun, B. Torok-Storb, W. Newman, R. C. Nowinski, E. D. Thomas, *Transplant. Proc. XIII* (1981) 1133.
- [144] R. L. Kirkman, J. L. Araujo, G. J. Busch, C. B. Carpenter, E. L. Milford, E. L. Reinherz, S. F. Schlossman, T. B. Strom, N. L. Tilney, *Transplantation* 36 (1983) 620.
- [145] H. Takahashi, P. J. Terasaki, T. Kinukawa, D. Chia, K. Miura, H. Okazaki, Y. Iwaki, Y. Taguchi, S. Hardiwidjaja, M. Ishizaki, *Lancet II* 1983, 1155.
- [146] W. J. M. Tax, F. F. M. Hermes, R. W. Willemse, P. Y. A. Capel, R. A. P. Koene, *J. Immunol.* 133 (1984) 1185.
- [147] K. Sikora, *Br. Med. Bull.* 40 (1984) 209.
- [148] M. Steinitz, E. Klein, *Immunol. Today* 2 (1981) 38.
- [149] M. Steinitz, S. Tamir, A. Goldfarb, *J. Immunol.* 132 (1984) 877.
- [150] M. Steinitz, S. Tamir, *Eur. J. Immunol.* 12 (1982) 126.
- [151] R. J. M. Falkoff, L. P. Zhu, A. S. Fauci, *J. Immunol.* 129 (1982) 97.
- [152] P. Ralph, K. Welte, E. Levi, J. Nakoinz, P. B. Litcofsky, R. H. Mertelsmann, M. A. S. Moore, *J. Immunol.* 132 (1984) 1858.
- [153] L. Olsson, H. S. Kaplan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5429.
- [154] L. Östberg, E. Pursch, *Hybridoma* 2 (1984) 361.
- [155] J. F. Schwaber, M. R. Posner, S. F. Schlossman, H. Lazarus, *Human Immunol.* 9 (1984) 137.
- [156] L. A. Stirke, B. H. Devens, R. L. Lundak, *J. Immunol.* 134 (1984) 1798.
- [157] K. Sikora, R. Wright, *Br. J. Cancer* 43 (1981) 696.
- [158] W. A. Valente, P. Vitti, Z. Yavin, E. Yavin, C. M. Rotella, E. F. Grollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 6680.
- [159] F. Gigliotti, L. Smith, R. A. Insel, *J. Infect. Dis.* 149 (1984) 43.
- [160] J. W. Lerrick, K. E. Truitt, A. A. Raubitschek, G. Senyk, J. C. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 6376.
- [161] H. C. Lane, J. H. Shelhamer, H. S. Mostowski, A. S. Fauci, *J. Exp. Med.* 155 (1982) 333.
- [162] Y. A. Teramoto, R. Meriani, D. Wunderlich, J. Schlom, *Cancer* 50 (1982) 241.
- [163] A. N. Houghton, *Transplant. Proc.* 16 (1984) 351.
- [164] A. N. Houghton, H. Brooks, R. J. Cote, M. C. Taormina, H. F. Oettgen, L. J. Old, *J. Exp. Med.* 158 (1983) 53.
- [165] R. J. Cote, D. M. Morrissey, A. N. Houghton, E. J. Beattie, H. F. Oettgen, L. J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 2026.
- [166] L. Olsson, R. B. Andreasen, A. Ost, B. Christensen, P. Biberfeld, *J. Exp. Med.* 159 (1984) 537.
- [167] J. V. Watson, T. Alderson, K. Sikora, J. Phillips, *Lancet I* 1983, 99.
- [168] R. O. Dillmann, J. Royston, *Br. Med. Bull.* 40 (1984) 240.