

Poly- und monoklonale Antikörper: Herstellung und Bedeutung für die medizinische Diagnostik*

L. Thomas

Zentrallabor des Krankenhauses Nordwest, Frankfurt

Zusammenfassung:

Der Basismechanismus immunchemischer Reaktionen ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die nachzuweisenden Substanzen haben in der Bestimmungsreaktion Antigenfunktion. Die zur Bestimmung der Substanz im Test eingesetzten Antikörper können polyklonalen oder monoklonalen Ursprungs sein.

Polykonal gebildete Antikörper werden technisch gewonnen durch die Reinigung der Immunglobulinfraktion immunisierter Tiere. Trotz mehrerer Reinigungsschritte wird vielfach nicht ein spezifischer Antikörper gewonnen, sondern eine heterogene Antikörperfraktion, die neben dem spezifischen Antikörper weitere Antikörper mit unterschiedlicher Affinität, Avidität und Spezifität gegen die immunchemisch zu analysierende Substanz enthält.

Die technische Gewinnung monoklonaler Antikörper verläuft im ersten Schritt ähnlich der auf polyklonalem Wege; ein Tier wird immunisiert mit dem immundiagnostisch zu bestimmenden Antigen. Es wird jedoch nachfolgend nicht Blut des immunisierten Tieres zur Antikörpergewinnung entnommen, sondern die Milz. In vitro werden im nächsten Schritt Antigen-sensibilisierte B-Lymphozyten aus der Milz mit Myelomzellen der Maus unter Bildung von Hybridzellen fusioniert. Die Hybridzellen werden selektioniert und diejenigen cloniert, die den gewünschten spezifischen Antikörper bilden. Auf diesem Wege können Antikörper einheitlicher Affinität, Avidität und Spezifität in größeren Mengen gewonnen werden.

Die Vor- und Nachteile poly- und monoklonal gebildeter Antikörper für immunchemische Tests werden dargestellt.

Schlüsselwörter:

Immunchemische Bestimmungsmethoden – polyklonale Antikörper – monoklonale Antikörper – Vorteile – Nachteile

Summary:

The antigen-antibody-reaction is the basic mechanism in immunoassays. In the immunoassay the substance of interest has antigen function. The corresponding antibody is manufactured either as polyclonal antiserum or as a monoclonal antibody.

Polyclonal antisera are manufactured by the removal of antibodies with unwanted characteristics from the antibody fraction of animals immunized with the antigen of interest. Even high purification will not rule out the production of an antiserum fraction which contains antibodies of different affinity, avidity and specificity directed against the antigen and highly immunogenic contaminants.

Monoclonal antibody generation starts with the same procedure as polyclonal manufacturing: an animal is immunized with the antigen of interest. But after the immunization the spleen of the animal is removed rather than blood. The antigen-sensitized B-cells of the spleen are fused with myeloma cells. The resulting antibody producing hybridomas are selected and hybridomas which produce antibodies with the characteristics of interest are cloned. By this way a homogenous antibody with definable affinity, avidity and specificity can be produced.

The advantages for immundiagnosics resulting from the monoclonal technology and some shortcomings are discussed.

Keywords:

Immunoassay – polyclonal antibody – monoclonal antibody – advantages and shortcomings

* Vortrag, gehalten auf dem Symposium für Laboratoriumsmedizin, Wiesbaden, den 12. 5. 1984

Medizinisch-diagnostische Testmethoden auf immunchemischer Basis arbeiten mit Antikörpern. Antikörper sind Immunglobuline. Die zu bestimmende Substanz wirkt im Test als Antigen, kann aber selbst ein Antikörper sein. Reaktionsprodukt ist der Antigen-Antikörper-Komplex, aus seiner Menge im Reaktionsansatz kann direkt oder indirekt die Konzentration der zu bestimmenden antigenen Substanz bestimmt werden.

Analysiert werden können nur Substanzen, die immunogen sind oder immunogen gemacht wurden. Voraussetzung ist die Präsenz antigenen Determinanten, auch Epitope genannt (Abb. 1), sowie ein Molekulargewicht von mindestens 10000 Dalton. Die Epitope bestehen typischerweise aus 4–8 Aminosäure- oder Zuckerresten. Der Antikörper bindet spezifisch mit den antigenen Determinanten über eine oder beide Antigenbindungsstellen (Abb. 2). Diese bestehen aus den variablen Regionen der schweren und leichten Polypeptidketten. Die Antikörperspezifitäten einer Immunglobulinklasse unterscheiden sich Antigen-abhängig in der Aminosäuresequenz der variablen Regionen. Antigen und korrespondierender Antikörper binden unter Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Ein Antikörper kann entweder mit 2 identischen antigenen Determinanten eines Moleküls oder mit 2 identischen antigenen Determinanten auf 2 Molekülen binden (Abb. 3). Letztere Reaktion ist die Voraussetzung zur Bildung größerer Immunkomplexe. In Tab. 1 sind häufig im Labor angewendete immunchemische Bestimmungsmethoden und ihre Nachweisprinzipien dargestellt.

Die für immunchemische Nachweismethoden erforderlichen Antikörper werden gewonnen durch die Immunisierung von Tieren mit dem Antigen, das später im Probengut nachgewiesen werden soll. Die Technik der Immunisierung unterscheidet sich nur unwesentlich, egal ob die Antikörpergewinnung auf polyklonalem oder monoklonalem Wege erfolgen soll.

Durch das Immunogen sensibilisiert werden der zelluläre und der humorale Schenkel des antigen-spezifischen Immunsystems (Abb. 4). Beide wirken gemeinsam bei der Antigenverarbeitung und Antikörperbildung. Wahrscheinlich sensibilisieren nur wenige Antigene allein den humoralen Schenkel. Gewöhnlich läuft die Antikörperbildung erst ab, wenn die B-Zellen spezifisch getriggert werden (Abb. 5). Das Antigen wird von Antigen präsentierenden Zellen, z. B. Monozyten/Makrophagen, über einen HLA-D/SB abhängigen T-Zell-Antigenrezeptor den T4-Lymphozyten präsentiert (4). T4-Lymphozyten sind Helfer-/Inducer-Zellen. Durch direkten Kontakt mit einem B-Lymphozyten sowie über stimulierende Faktoren induzieren sie dessen Differenzierung in eine Plasmazelle, die Antikörpersekretion und die Bildung einer Plasmazellfamilie, den Clon.

Nach der Burnet'schen Selektionstheorie (6) bildet der Antigen-stimulierte B-Lymphozyt nur Antikörper einer Spezifität, also einer Schwerekettenklasse, eines Leichtkettentyps und funktionell gerichtet gegen eine bestimmte antigenen Determinante. Erkennt das antigenspezifische Immunsystem nach Verabreichung eines Immunogens nur eine antigenen Determinante, was praktisch nie der Fall ist, kann eine monoklonal gebildete Antikörperfraktion vom immunisierten Tier gewonnen werden (Abb. 6, rechts). Das Serumweißbild des Tieres zeigt die Dysproteinämie der monoklonalen Gammopathie, vergleichbar der beim Plasmozytom. Meist besitzen Immunogene jedoch zahlreiche antigenen Determinanten oder durch die Funktion des Antigen-unspezifischen Im-

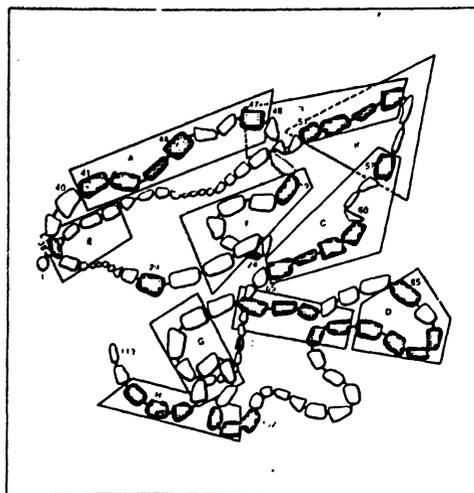


Abb. 1: Peptidkette mit 113 Aminosäuren und 10 antigenen Determinanten (1)

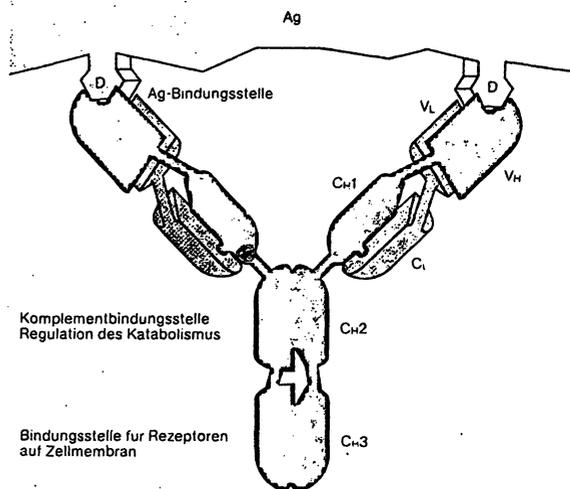


Abb. 2: Antikörpermolekül mit 2 identischen schweren (H) und 2 identischen leichten Peptidketten (L), sowie 2 Antigenbindungsstellen. V = variable Regionen, C = konstante Regionen (2)

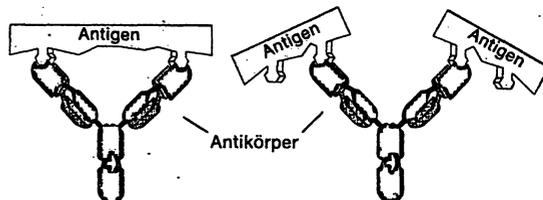


Abb. 3: Der Antikörper kann aufgrund seiner 2 Antigenbindungsstellen entweder mit 2 identischen antigenen Determinanten eines Moleküls oder mit 2 identischen antigenen Determinanten auf 2 Molekülen binden (2)

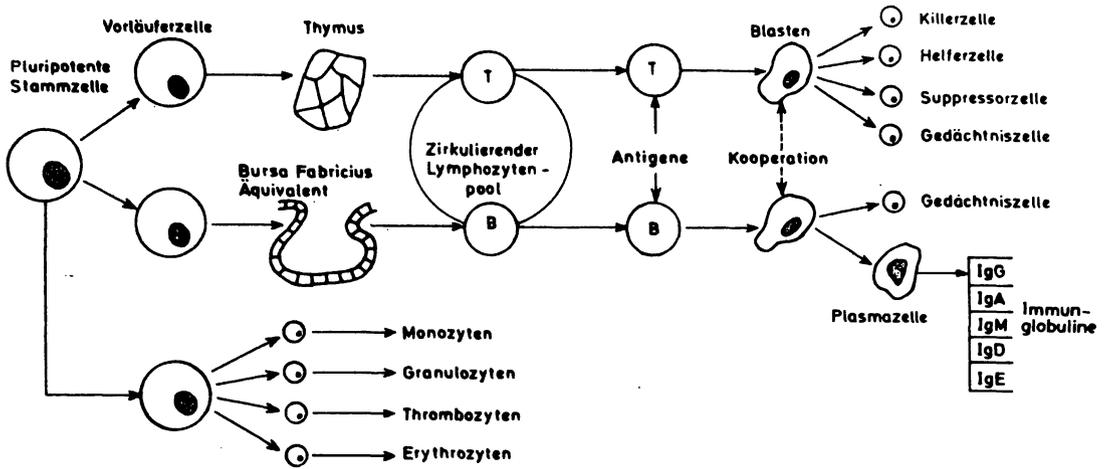


Abb. 4: Antigen-spezifisches Immunsystem mit zellulärem Schenkel (oben) und humoralem Schenkel (unten) (3)

Tab. 1: Häufig angewendete immunchemische Bestimmungsmethoden (oben) und ihre Nachweisprinzipien (unten)

Global qualitativ:	Immunelektrophorese
Selektiv qualitativ:	Blutgruppen-Bestimmung Bakterien-Agglutination Latex-Agglutinationstest Hämagglutinationstest Hämagglutinations-Hemmtest Komplement-Bindungsreaktion Immunfluoreszenz-Test
Selektiv quantitativ:	Radiale Immundiffusion Laser-Nephelometrie Turbidimetrie Immunfluoreszenz-Test Radioimmunoassay Enzymimmunoassay Fluoreszenzimmunoassay

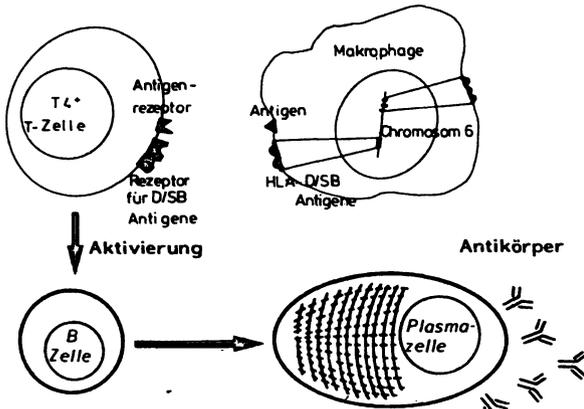


Abb. 5: Das Antigen wird von einer Antigen-präsentierenden Zelle, z. B. Makrophagen, über einen HLA-D/SB abhängigen T-Zell-Rezeptor der T4-Zelle präsentiert. Diese bewirkt die Aktivierung einer B-Zelle, die zur Immunglobulin-bildenden Plasmazelle transformiert (4, 5)

1. Präzipitation	direkt:	Agglutination (Blutgruppen, Widal-R.) Radiale Immundiffusion Immunelektrophorese
	indirekt:	Latex-Agglutination indirekte Hämagglutination (Komplement-Bindungsreaktion)
2. als gelöster Immunkomplex:		Laser-Nephelometrie Turbidimetrie
3. Markierung eines Reaktionspartners (Radioaktivität, Fluoreszenz, Enzym)		
Reaktionspartner gelöst		kompetitiver RIA EMIT
Reaktionspartner an fester Phase		IFT Solid phase RIA ELISA

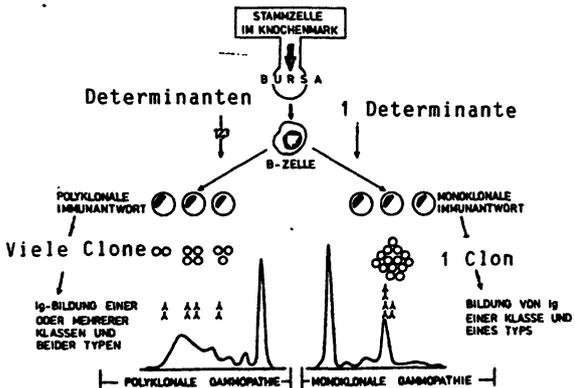


Abb. 6: Bei Immunisierung eines Tieres mit einem Immunogen, das nur 1 antigene Determinante besitzt, erfolgt hypothetisch eine monoklonale Immunantwort (rechts), das Serumweißbild gleich dem bei monoklonaler Gammopathie. Hat das Immunogen zahlreiche Determinanten (links) ist die Immunantwort polyclonal (7)

munsystems, z. B. von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen werden neue Determinanten gebildet. Deshalb ist auch bei Gabe eines homogenen Immunogens die Immunantwort polyklonal. Durch die unterschiedlichen antigenen Determinanten, wird eine große Zahl von B-Lymphozyten stimuliert und die Immunantwort ist gekennzeichnet durch die Bildung vieler Antikörperspezifitäten (Abb. 6, links). Vom Tier wird keine homogene Antikörperfraktion gewonnen, sondern ein gegen die verschiedenen Epitope des Immunogens gerichtetes Antiserum. Das Serumweißbild des immunisierten Tieres zeigt die Dysproteinämie der polyklonalen Gammapathie.

Bei der Herstellung spezifischer Antikörper auf polyklonalem Wege wird die γ -Globulinfraktion des Plasmas immunisierter Tiere unterschiedlichen Trennverfahren unterworfen, so daß Antigen-spezifische Antikörper angereichert und Antigen-unspezifische weitgehend entfernt werden. Häufig kann eine für diagnostische Zwecke funktionell einheitliche Antikörperfraktion jedoch nicht über längere Zeit gewonnen werden. Außerdem sind die Antikörperfraktionen von wechselnder Qualität. Insgesamt weisen polyklonal gewonnene Antikörper für diagnostische Tests folgende Nachteile auf (Tab. 2):

1. Trotz guter Spezifität ist die Antikörperfunktion für die antigene Determinante heterogen, das heißt es existieren Antikörper verschiedener Spezifitäten, Affinitäten, Klassen und Subklassen mit den damit verbundenen biologischen Aktivitäten, z. B. Komplementbindung, Agglutination, Bindung an Zellen.
2. Auch bei guter Reinigung sind noch in geringen Mengen Antikörper gegen weitere antigene Determinanten vorhanden.
3. Das gleiche Antikörperspektrum kann in einem anderen Tier nicht reproduziert werden, oft auch schon nicht zu verschiedenen Blutentnahmezeiten beim gleichen Tier.
4. Unterschiedliche Antikörperkonzentration.

Die genannten Punkte sind Ursache für die bisher nicht mögliche Standardisierung immunchemischer Tests.

Die Verwendung monoklonal synthetisierter Antikörper weist neue Wege zur Lösung dieser Probleme. Theoretisch können monoklonale Antikörper gewonnen werden durch die Isolierung Antikörper-produzierender B-Lymphozyten aus immunisierten Tieren und die anschließende Klonierung in „in-vitro-Kulturen“.

Praktisch ist das nicht möglich, da Antikörper-bildende B-Zellen in vitro nicht kultiviert werden können.

Die Idee von Köhler und Milstein (8) bestand darin, durch die Verschmelzung eines B-Lymphozyten mit einer Tumorzelle zu einer Hybridzelle, den B-Lymphozyten unsterblich zu machen. Die Hybridzelle hat die Eigenschaften beider Elternzellen, die spezifische Antikörperbildung des B-Lymphozyten und die Unsterblichkeit der perma-

nent in Zellkultur wachsenden Tumorzelle. Als Tumorzelle wird die Myelomzelle von Mäusen verwendet, die B-Zellen stammen aus der Milz immunisierter Tiere.

Das Prinzip der Produktion monoklonaler Antikörper besteht vereinfacht dargestellt aus folgenden Schritten (Abb. 7).

Immunisierung: ein Tier wird mit dem Antigen immunisiert gegen das Antikörper gewünscht werden und die Milz, die sensibilisierte B-Lymphozyten enthält, entnommen.

Hybridisierung: Milzhomogenat wird inkubiert mit Myelomzellen der Maus, dabei fusioniert eine Maus-Myelomzelle mit einer Antigen-sensibilisierten B-Zelle zur Hybridzelle. Gewöhnlich werden mehrere verschiedene Hybridzellen gebildet.

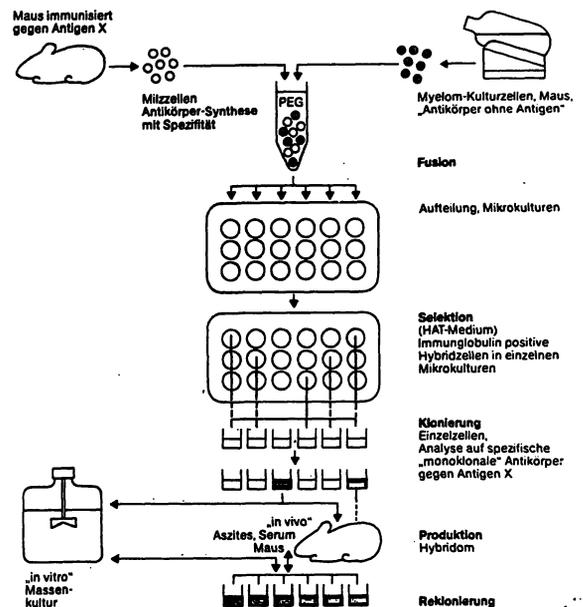
Selektionierung der Hybridzellen: sie erfolgt vermittels eines Mediums, in dem nur die Hybridzellen, nicht aber die Mutterzellen wachsen.

Testung auf Antikörperbildung: im Überstand wird untersucht, ob die Hybridzelle Antikörper bildet.

Clonierung: wenn die Hybridzellen Antikörper bilden, läßt man davon Zellfamilien heranwachsen.

Selektionierung der Clone: diejenige Zellfamilie, die den gewünschten Antikörper bildet, wird herausselektioniert.

Kultur der Hybridzellclone: wird durchgeführt zur Antikörperbildung in größerem Ausmaß, entweder als in vitro-Zellkultur oder in vivo durch Injektion des Clons in die Bauchhöhle von Mäusen.



Tab. 2: Nachteile polyklonal gewonnener Antikörper für die immunchemische Diagnostik

1. Heterogene Antikörperfraktion, trotz guter Spezifität für eine antigene Determinante
2. Trotz Reinigung noch Antikörper gegen andere Epitope vorhanden
3. Mangelnde Reproduzierbarkeit von Entnahme zu Entnahme und von Tier zu Tier
4. Unterschiedliche Antikörperkonzentration

Abb. 7: Prinzip der Produktion monoklonaler Antikörper (9). Folgende Schritte sind notwendig: Immunisierung des Tieres. Entnahme der Milz und Fusionierung der Milzlymphozyten mit Myelomzellen (Hybridisierung). Aufteilung und Anzucht der Hybridzellen in Mikroturen. Selektionierung der Ig-bildenden Hybridzellen. Anzuchten von Hybridzellfamilien, die den gewünschten Antikörper bilden (Clonierung). Produktion von spezifischen Antikörpern im größeren Ausmaß, entweder im Aszites der Maus oder in der „in vitro“-Massenkultur

Im einzelnen Fall läuft die Produktion monoklonaler Antikörper folgendermaßen ab:

Ratten oder Mäuse werden mit dem gewünschten Antigen mehrmals immunisiert und die Milz 3–4 Tage nach der letzten Immunisierung entnommen. Sie ist jetzt reich an Antigen-sensibilisierten B-Zellen. Die Milz wird zerkleinert und Milzzellen mit Myelomzellen zur Fusionierung inkubiert.

Die Fusionierung von Myelomzelle und sensibilisierten B-Lymphozyten läuft spontan ab und wird begünstigt durch eine kurzzeitige Inkubation in Polyäthylenglykol mit nachfolgender 24stündiger Inkubation in Zellkulturmedium.

Drei wichtige Voraussetzungen zur erfolgreichen Bildung monoklonaler Antikörper sind:

1. daß die Hybridzelle nur Antikörper sezerniert, die von den Genomen der Antigen-sensibilisierten B-Zelle codiert werden. Der Myelomzellanteil, er ist ja auch eine Immunglobulin-bildende Zelle, soll aber stumm sein, also keine schweren und leichten Ketten zur Antikörperbildung der Hybridzelle beisteuern, da sonst kein homogener Antikörper, sondern ein Antikörpergemisch gebildet würde. Das Problem wird dadurch gelöst, daß Myelomzellmutanten der Maus zur Fusionierung eingesetzt werden, die keine Antikörperbestandteile mehr sezernieren, sogenannte Non-Producer.

2. Die Aufteilung des Fusionierungsansatzes in Mikro-kulturen, denn die Fusionsrate Antigen-sensibilisierter B-Lymphozyten mit Myelomzellen ist unterschiedlich (Tab. 3). Sie beträgt zwischen 1 auf 50000 bis 1 auf 1 Million eingesetzter B-Zellen. Aus der Immunisierung mit einem starken Immunogen entstehen etwa 200 bis 1 Hybridzelle. Die Hybridzellen produzieren natürlich nicht alle den gleichen Antikörper, da bei der Immunisierung B-Zellen mit unterschiedlichen antigenen Determinanten sensibilisiert wurden. Der Fusionierungsansatz wird deshalb in Mikro-kulturen aufgeteilt, damit in einer Mikro-kultur nur eine Hybridzelle wächst.

3. Die Selektionierung der Hybridzellen von den Elternzellen. Hybridzellen wachsen langsam und teilen sich nur alle 24–48 Std. Sie würden von den schnellwachsenden Myelomzellen überwuchert. Deshalb müssen sie von den Elternzellen selektioniert werden. Die Selektionierung erfolgt durch Absterbenlassen der Elternzellen im Wachstumsmedium. Das ist bei den Antigen-sensibilisierten B-Lymphozyten der Milz recht einfach, sie sterben sowieso nach wenigen Tagen ab. Das Absterben der Myelomzellen erfolgt durch die Hemmung ihrer DNA-Synthese. Deshalb werden im Fusionsansatz Myelomzell-Mutanten eingesetzt, denen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase fehlt.

Wachstum und Vermehrung von Zellen geht mit gesteigerter DNA-Synthese einher. Der Aufbau zur DNA-Synthese erforderlicher Nucleotide wie AMP, GMP, CMP,

Tab. 3: Ausbeute an Hybridzellen durch kulturelle Fusionierung

10^8 B-Lymphozyten in der Milz	
10^6 Antigen-sensibilisierte B-Lymphozyten	
10^7 Myelomzellen	
Fusionsrate $1:5 \times 10^4$ bis $1:1 \times 10^6$	
200 bis 1 AK-bildende Hybridzellen	

TMP erfolgt aus Purin- und Pyrimidinnucleotid-Vorstufen in enzymatischen Schritten, bei denen Folsäure das Coenzym ist (Abb. 8). Die Wege über die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) und die Thymidinkinase (TK) werden vorwiegend beschriftet, wenn die Hauptwege geblockt sind, z. B. nach Gabe des Folsäureantagonisten Aminopterin in das Kulturmedium. Myelomzell-Mutanten mit HGPRT-Mangel können in einem Hypoxanthin-, Aminopterin-, Thymidin-haltigen Kulturmedium (HAT-Medium) keine DNA bilden, also nicht wachsen, da alle Syntheseschritte blockiert sind und der Thymidinkinase-Schritt allein nicht ausreicht.

Bei Hybridzellen ist die DNA-Synthese möglich, da ja die Antigen-stimulierte B-Zelle einen intakten HGPRT-Weg in die Fusion mit eingebracht hat.

Die Kultivierung der Hybridzellen im HAT-Medium erfolgt über mehrere Wochen auf Mikrotiterplatten (Abb. 7, Schritt 3). 2–4 Wochen nach der Fusionierung werden Hybridzellklone sichtbar. Die Kulturüberstände der Näpfchen werden auf die Anwesenheit von Antikörpern überprüft. Ist das der Fall, erfolgt im nächsten Schritt die Klonierung. Dabei werden durch Serienverdünnungen die Primärkulturen auf Mikrotiterplatten so verteilt, daß theoretisch nur eine Hybridzelle pro Näpfchen vorliegen kann.

Somit soll sichergestellt werden, daß die gebildete Antikörperspezifität nur einem Hybridzellklon entstammt. Im nächsten Schritt werden die von diesen Hybridzellklonen sezernierten Antikörper auf ihre Spezifität geprüft. Dies ist eine aufwendige Arbeit, da Überstände vieler Hybridzellklone getestet werden müssen. Die Testtechniken beruhen auf dem Prinzip der Inkubation Antigen „beladener Zielzellen“ mit den Antikörper-haltigen Überständen der Kulturen (Abb. 9). Der Nachweis des zum Antigen korrespondierenden Antikörpers erfolgt unter Anwendung eines markierten Antiimmunglobulins oder im Rosetten-test (9, 12).

Die Produktion größerer Antikörpermengen erfolgt entweder in der „in vitro“-Massenkultur oder in vivo in Form eines Aszites. Bis zu 20 mg Antikörper können pro ml Aszites gewonnen werden, in vitro nur bis $10 \mu\text{g/ml}$. Falls erforderlich, können Hybridzellklone tiefgefroren aufbewahrt werden.

Die Vorteile monoklonaler Antikörpergewinnung für immunchemische Bestimmungsmethoden (12) sind (Tab. 4):

1. Es können Antikörper gegen einzelne Determinanten eines Immunogens selektioniert werden, während polyclonal gewonnene Antikörper sich doch immer nur, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, gegen zusammenge-

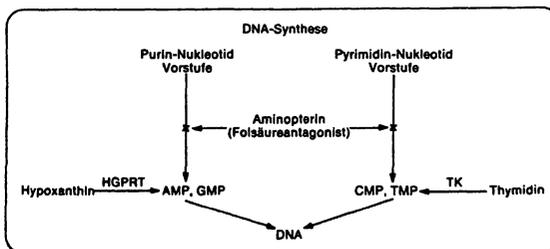


Abb. 8: DNA-Synthese-Wege (10). Die Synthesewege über die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) und die Thymidinkinase werden nur beschriftet, wenn die Hauptsynthesewege der Nucleotide durch die Wirkung des Folsäureantagonisten Aminopterin blockiert sind

setzte Antigenmuster richten. Der gewonnene monoklonale Antikörper ist homogen in seinen Funktionen und einheitlich in Spezifität, Affinität, Avidität und Bindungskinetik. Besonders wichtig ist das für den immunchemischen Nachweis von nahezu identischen Substanzen wie Steroiden oder Digitalisglykosiden. Bei Anwendung polyklonal gewonnener Antikörper ist die Kreuzreaktivität groß.

2. Gegen viele Determinanten eines komplexen Immunogens, z. B. Lymphozyten, ist die Erzeugung monospezifischer Antikörper möglich. Oberflächenstrukturen von

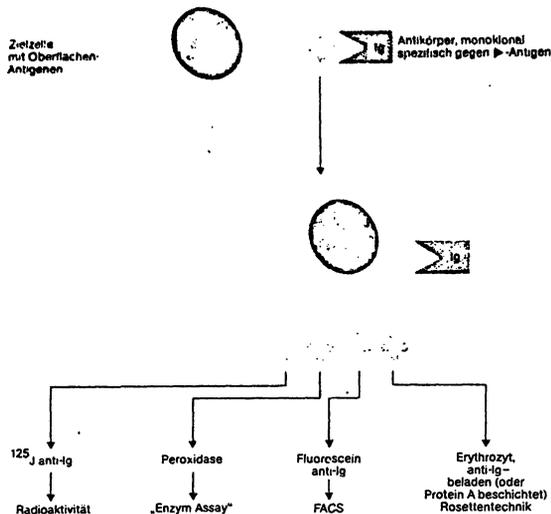


Abb. 9: Testtechniken zum Nachweis monoklonal gebildeter spezifischer Antikörper in den Kulturüberständen. Werden Fluorescein markierte Antikörper gegen Immunglobuline angewendet, können Fluoreszenz aktivierbare Zellsortierer (FACS) zum Nachweis der spezifischen Antikörper eingesetzt werden (9)

Tab. 4: Vorteile monoklonal gewonnener Antikörper für die immunchemische Diagnostik

1. Antikörper gegen 1 Determinante, damit einheitliche Spezifität, Affinität, Avidität und Bindungskinetik
2. Antikörper gegen alle Determinanten eines Immunogens sind möglich
3. Gewinnung großer Antikörpermengen → konstante Chargen → Standardisierung
4. Hohe Antikörper-Titer
5. Reinigung von Antigenen
6. Antikörper einer Klasse und Subklasse

Tab. 5: Nachteile monoklonal gewonnener Antikörper für die immunchemische Diagnostik

1. Kreuzreaktive Antikörper sind unbrauchbar
2. Zu geringe Affinität gegen die gewünschte Determinante
3. Titerbedingte Kreuzreaktivitäten
4. Überspezifität
5. Gewisse Reaktionen nicht möglich aufgrund zu großer Reinheit (RID, Immun-Epho., KBR)

Lymphozytenpopulationen können dadurch erkannt und die Zellen differenziert werden.

3. Durch die Produktion und Reinigung großer Mengen können die Chargeneigenschaften konstant gehalten werden und die Standardisierung von Immunoassays rückt näher.

4. Hohe Antikörpertiter stehen zur Verfügung.

5. Wird mit einem Antigengemisch immunisiert, ist es möglich, mit Hilfe der gebildeten Antikörper die gewünschten Antigene zu selektionieren.

6. Antikörper einer Klasse und Subklasse können gewonnen werden, dadurch sind auch die biologischen Aktivitäten einer Antikörpercharge bezugnehmend auf Komplementbindung, Agglutination und Präzipitation einheitlich.

Neben den genannten Vorteilen sollen gewisse Nachteile monoklonaler Antikörper (13, 14) nicht verschwiegen werden (Tab. 5):

1. Kreuzreaktivitäten können bei monoklonalen Antikörpern nicht wie bei polyklonal gewonnenen Antiseren absorbiert werden. Kreuzreaktive monoklonale Antikörper sind deshalb unbrauchbar.

2. Ein polyklonal gewonnenes Antiserum setzt sich aus einer Mischung von Antikörpern zusammen, die gegen ein Antigenmuster gerichtet sind. Zu jeder Determinanten des Musters existieren Antikörper unterschiedlicher Affinität, insgesamt ist aber die Affinität aller Antikörper so gut, daß eine ausreichende Antigen-Antikörper-Bindung vorliegt. Bei einem monoklonalen homogenen Antikörper kann die Affinität so schwach sein, daß eine für diagnostische Zwecke erforderliche Antigen-Antikörper-Bindung ausbleibt.

3. Bei der Anwendung hochtitriger monoklonaler Antikörper an komplexen Strukturen, z. B. Geweben, können unerwartete Kreuzreaktivitäten auftreten, die bei bisher verwendeten niedrigtitrigen polyklonalen Antiseren nicht erkennbar waren. Der Ersatz eines polyklonal gewonnenen Antiserums durch einen monoklonalen Antikörper ist deshalb nicht einfach möglich, ohne, daß eine Änderung des Untersuchungsergebnisses auftritt.

4. Die Überspezifität eines mit monoklonalen Antikörpern arbeitenden Testsystems kann dann vorliegen, wenn nur eine antigene Determinante, z. B. einer Virusvariante erfaßt und alle anderen Biovarianten einer Virusgruppe nicht erkannt werden. Hier müßte dann ein Cocktail monoklonaler Antikörper eingesetzt werden (15).

5. Für die radiale Immundiffusion, Immunelektrophorese und andere Immunpräzipitationstechniken ist die Bildung großer Immunkomplexe erforderlich. Monoklonale Antikörper sind dazu nicht in der Lage. Sie erkennen nur eine antigene Determinante des Antigens und können ein komplexes Netzwerk, das Voraussetzung für die Immunpräzipitation ist, nicht bilden. Für die Anwendung dieser Techniken müssen Gemische monoklonaler Antikörper gegen verschiedene Determinanten des Antigens hergestellt werden.

Komplementbindungsreaktionen sind nur möglich, wenn der monoklonale Antikörper Komplement zu binden vermag.

Die Anwendungsbereiche monoklonaler Antikörper in der Laboratoriumsdiagnostik sind vielfältig. Sie werden eingesetzt für Testmethoden für die

1. Quantitative Bestimmung von bakteriellen und viralen Antigenen bzw. der korrespondierenden Antikörper, von Tumormarkern, Hormonen, Medikamenten, Plasmaproteinen und organ-spezifischen Proteinen.

2. Bestimmung der Blutgruppenantigene.

3. Gewebe- und Zelltypisierung, z. B. Analyse des HLA-Systems und Bestimmung von Lymphozytenrezeptoren.

Monoklonale Antikörper werden in den nächsten Jahren bei vielen immunchemischen Nachweismethoden die polyklonal gebildeten Antikörper verdrängen. Ob ihre Anwendung, wie jetzt schon auf Herstellerprospekten aufgeführt, wirklich der neue und damit bessere Weg für die Laboratoriumsdiagnostik von Krankheiten ist, wird die Zukunft zeigen.

7. THOMAS, L.: Eiweiß-Elektrophorese, S. 81. Verlag Urban + Schwarzenberg, München 1981.
8. KÖHLER, G., MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (London)* 258, 495-497 (1975).
9. AX, A.: Monoklonale Antikörper durch Lymphozyten-Hybridisierung. *Laboratoriumsblätter* 30, 89-99 (1980).
10. KAUFMANN, S. H. E.: Monoklonale Antikörper und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin. *Immun. Infekt.* 11, 23-29 (1983).
11. SCHARFF, M. D., ROBERTS, S., THAMMANA, P.: Hybridomas as a source of antibodies. *Hospital Practice*, 61-68 (1981).
12. SEVIER, E. D., DAVID, G. S., MARTINIS, J., DESMOND, W. J., BARTHOLOMEW, R. M., WANG, R.: Monoclonal antibodies in clinical immunology. *Clin. Chem.* 27, 1797-1806 (1981).
13. DIAMOND, B. A., YELTON, D. E., SCHARFF, M. D.: Monoclonal antibodies. *New Engl. J. Med.* 304, 1344-1349 (1981).
14. MÜLLNER, H.: Monoklonale Antikörper. *LABO*, 1239-1252 (1983).
15. FRANZE, R.: Monoklonale Antikörper in der Virologie. *Laboratoriumsblätter* 34, 1-11 (1984).

Schrifttum:

1. AAS, K.: Die Natur der Allergene. Die gelben Hefte XX, 77-85 (1980).
2. RIESEN, W., BARANDUN, S.: Struktur und Funktion von Antikörpern. *Sandorama* 2, 22-25 (1979).
3. KALDEN, J. R.: Funktionsprüfungen des Immunsystems. *Internist* 20, 465-474 (1979).
4. PICHLER, W.: Die klinische Bedeutung der Bestimmung von T-Zell-Subpopulationen mit Hilfe monoklonaler Antikörper. *Lab. med.* 7, 342-346 (1983).
5. BURMESTER, G. R., KALDEN, J. R.: Die immunologisch gesteuerte zelluläre Infektabwehr. *Lab. med.* 7, 225-230 (1983).
6. BURNET, F. M.: The clonal selection theory of acquired immunity. *Vanderbilt Univ. Press*, 1959.

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. Lothar Thomas
Krankenhaus Nordwest
Zentrallabor
Steinbacher Hohl 2-26
D-6000 Frankfurt 90

