

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 16/28

C12N 5/20

A61K 39/395 C07K 14/705

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95192406.0

[45]授权公告日 2000 年 5 月 24 日

[11]授权公告号 CN 1052733C

[22]申请日 1995.1.30 [24]颁证日 2000.2.5

[21]申请号 95192406.0

[30]优先权

[32]1994.1.31 [33]IL [31]108,501

[86]国际申请 PCT/US95/01137 1995.1.30

[87]国际公布 WO95/20605 英 1995.8.3

[85]进入国家阶段日期 1996.10.3

[73]专利权人 莫尔研究应用有限公司

地址 以色列吉瓦特施米尔

[72]发明人 B·哈地 A·诺沃格罗斯基

[56]参考文献

CELLULAR IMMUNOLOGY 118 1989. 1. 1
BRITTA HARDY 等, MOMOXLONAL ANTIVODY
TO HUMAN B LYMPHO BLASTOID CELLS
ACTIVA

审查员 贾书瑾

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴玉和 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图页数 12 页

[54]发明名称 免疫刺激单克隆抗体

[57]摘要

一种具有免疫刺激作用的单克隆抗体,与 B 淋巴细胞特异结合,并诱导外周血淋巴细胞的增殖和活化,当将该单克隆抗体注入长有肿瘤的动物体内时会产生抗肿瘤效果。

ISSN 1000-8427

权 利 要 求 书

1. 一种单克隆抗体或其抗原结合片段, 所述抗原结合片段保持该单克隆抗体的结合特征, 该单克隆抗体是: 由保藏于微生物培养物国家保藏中心 (CNCM) 保藏号为 No. I-1397 的杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体。
5
2. 分泌权利要求 1 的抗体的无限增殖细胞系。
3. 权利要求 2 的无限增殖细胞系, 为杂交瘤细胞系。
4. 权利要求 3 的细胞系, 其为保藏于 CNCM 保藏号为 No. I-1397 的杂交瘤细胞系。
- 10 5. 一种用于治疗癌症、艾滋病以及其它免疫系统相关疾病的药物组合物, 它们含有作为活性成分的有效量的根据权利要求 1 的单克隆抗体和生理上可接受的载体。
6. 权利要求 5 的药物组合物, 含有除所说抗体外的另一种药剂, 其与所说抗体以加和方式或协同方式增强细胞毒性淋巴细胞的活性。
- 15 7. 一种能与权利要求 1 的抗体特异结合的蛋白物质。
8. 权利要求 7 的物质, 其在凝胶电泳中所确立的表观分子量约为 48-50 千道尔顿。

说明书

免疫刺激单克隆抗体

发明领域

- 5 本发明总的来说属于免疫治疗领域,更具体而言,本发明涉及治疗各种适应症如治疗癌症中所使用的单克隆抗体。

现有技术

- 10 下面列出的是作为现有技术的参考文献,这些文献与后面说明书所描述的内容相关:

1. Clark, E. A., 和 Ledbetter, J. A., 兴奋性抗体对免疫反应的放大作用, *Immunol., Today*, 7:267-270, 1986.
2. Meuer, S. C., Huspey, R. E., Cantrell, D. A., Hodgdon, J. C.,
15 Schlornman, F., Smith, K. A. 和 Reinberg, E. L., 触发 T3-T1 抗原 - 受体复合物导致 T 细胞克隆通过白细胞介素 2 依赖型自分泌途径扩增, *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*, 31:1509-1513, 1984.
3. Van Wauve, J. P., De Mey, J. R., 和 Gooser, J. G., OKT3: 一种单克隆抗人 T 淋巴细胞抗体及强促有丝分裂特性, *J. Immunol.*, 124:2708-
20 2713, 1980.
4. Jung, G., Martin, D. E., 和 Muller-Eberhard, J. H., 单克隆抗体 OKT3 诱导人外周血单核细胞中的细胞毒性, *J. Immunol.* 139:639-644, 1987.
5. Van Lier, R., Bloemena, E., Brouwer, M., Van Heijm, J., Weinreich, S.,
和 Aarden, L., 抗 CD2 抗原 I 和 II 区的单克隆抗体诱导的 T 细胞增殖的
25 单核细胞依赖性的研究, *Immunology*, 67:333-338, 1989.
6. Ellenhorn, J. D., Hirsch, R., Schreiber, H., 和 Bluestone, J. A., 一种抗 CD3 抗体的体内施用抑制恶性肿瘤的生长, *Science (Washington DC)*, 242:569-571, 1988.
7. Gallinger, S., Hoskins, D. W., Mullen, J. B. M., Wong, A. H. C., 和
30 Roder, J. C., 细胞免疫治疗和抗 CD3 抗体在 C57BL/6 小鼠 MCA-38-LD 实验性肝迁移治疗中的对比, *Cancer Res.*, 50:2476-2480, 1990.
8. Ledbetter, J. A., Martin, P. J., Spooner, C. E., Wofsy, D., Tsu, T. T.,

Beatty, P.G., 和 Gladstone, P., 抗 Tp67 和 Tp44 抗体强化并维持依活化 T 细胞的增殖, *J. Immunol.*, 135:2331-2336,1985.

5 9. Moretta, A., Goggi, A., Pende, D., Tripodi, G., Orengo, A., Pella, N., Augugliano, R., Bottino, C., Ciccone, E., 和 Moretta, I., CD69 介导的淋巴细胞激活途径: 抗 CD69 单克隆抗体触发除表达 T 细胞 α/β 受体的溶细胞性的 T 淋巴细胞外的淋巴效应细胞的活性, *J. Exp. Med.*, 174:1393-1398,1991.

10 10. Van Lier, R. A., Brouwer, M., 和 Aarden, L. A., T 细胞活化所涉及的信号. 通过抗 CD28 和抗 CD2 单克隆抗体的协同作用诱导的 T 细胞增殖, *Eur. J. Immunol.* 13:167-172,1988.

11. Jenkins, M. K., Taylor, P. S., Norton, S. D., 和 Urdahl, K. B., CD28 释放与人 T 细胞产生抗原特异性 IL - 2 相关的共刺激信号, *J. Immunol.*, 147:2461-2466,1991.

15 12. Townsend, S.E. 和 Allison, J. P., 用 B7 转染的黑素瘤细胞直接共刺激 CD8+ T 细胞之后的肿瘤排斥反应, *Science*(Washington DC),259:368-370,1993.

13. Hardy, B., Dotan, D., 和 Novogrodsky, A., 一种人 B 淋巴母细胞的单克隆抗体激活人和鼠的 T 淋巴细胞, *Cell Immunol.*, 118:22-29,1989.

20

这里引用的上述任一篇参考文献, 是为了使读者获知现有技术的内容. 但这种引用从任何意义上都不应被认为这些参考文献与后述权利要求所限定的本发明的专利性主题有关.

25 通过标明上面列举的参考文献的序号引用这些参考文献.

发明背景

各种形式的癌症是引起人类死亡的一个主要原因. 在美国有 1/3 的人患有癌症, 20 % 的人死于癌症 (1988 年有 494,000 人).

30 最广泛应用的治疗癌症的方法有外科手术、放射疗法和化学疗法. 近年来, 提出另一种治疗方法, 其以使用生物反应调节物 (BRM) 为基础. 所用的 BRM 主要包括细胞因子 (例如白细胞介素 - 2 (IL - 2) 和干扰素 - α (INF - α))、激活的单核细胞 (如淋巴细胞活素激活

的杀伤细胞 (LAK)) 和抗体。这些 BRM 既直接作用于肿瘤也通过增强非特异性或特异性免疫机制和细胞毒性机制间接作用于肿瘤。

迄今为止，使用 BRM 没有获得临床方面的实质成功，这主要是因为 BRM 具有毒性和副作用。也曾提出使用抗肿瘤的活化免疫接种，
5 但发现没有什么效果。并且，对癌症诊断和治疗中使用的几种单克隆抗体 (mAb) 进行评估但仍没有一种单克隆抗体在癌症病人的标准治疗程序中被证明是有效的。

人们已经发现能与 T 细胞表面决定簇结合的各种 mAb 能诱发这些细胞的增殖、活化或分化⁽¹⁾。人们已经证明，抗 T 细胞上 CD3/TCR 复合物的 mAb 的结合⁽²⁻⁴⁾，抗 T 细胞上 CD2⁽⁵⁾受体抗原的 mAb 的结合，以及上述这两种抗体同时与 T 细胞的结合会 T 使细胞增殖、IL - 2 受体得到表达，以及在 T 细胞中产生 IL - 2，由此增强这些细胞中的溶细胞过程。抗 CD3mAb 表明能在动物模型⁽⁶⁻⁷⁾中体内引发抗肿瘤活性。

人们还报道了定向抗 T - 淋巴细胞抗原的各种其它 mAb，这些单
15 抗在与细胞结合后，会使细胞活化。这种单抗的例子有定向抗 CD5⁽⁸⁾的 mAb，定向抗 CD69⁽⁹⁾的 mAb 和定向抗 CD28^(10,11)的 mAb。据报道，抗 CD28mAb 能减小鼠黑素瘤的生长速度，但并不能成功地从鼠体内彻底消除肿瘤⁽¹²⁾。

一种称为 “ Daudi ” 的定向抗人 B 淋巴母细胞系的单克隆抗体表明
20 刺激鼠淋巴和人外周 T 细胞⁽¹³⁾。

发明概述

首先，本发明提供了一种单克隆免疫刺激抗体，该抗体与 B 淋巴母细胞结合，诱发外周血淋巴细胞的增殖和活化，该单克隆抗体的特征在
25 于当被注射入长有肿瘤的动物体时，能引发抗肿瘤效果。

抗肿瘤效果是一种生物效果，通过肿瘤体积缩小、转移瘤数目减少、寿命延长或各种与癌症相关的生理症状的改善来体现这种效果。也可通过 mAb 在肿瘤首发位置抑制肿瘤发生的能力来体现抗肿瘤效果。本发明单克隆抗体由于具有这些性质，能用于癌症的治疗以及癌症的预
30 防中。

首先用免疫原免疫动物，免疫原是 B 淋巴母细胞、裂解的 B 淋巴母细胞或其膜制备物。免疫接种并在免疫动物体内形成免疫反应后，从

该动物体中提取出 B 淋巴细胞，形成细胞系并筛选出具有可以与免疫原结合的分泌抗体的细胞系。然后从所选的 mAb 中再进一步筛选出能诱发外周血细胞增殖和活化的单克隆抗体。

为获得本发明的 mAb，对上述筛选出的抗体再进一步进行筛选，以使所选抗体能够达到抗肿瘤的效果。为筛选这种抗体，通常可使用癌症动物模型。有时也可以在各种体外模型中检测抗癌效果。例如，这种模型可以是实验室中任意一种已被诱发癌症的动物。特定相关地，特别选择鼠作为人类治疗应用的模型，其可以诱发出人源肿瘤。后一种类型的动物模型例子有免疫损害鼠，如 SCID 鼠或裸鼠，这些鼠注射了或植入了来自癌症病人的肿瘤细胞或组织。筛选时，通过与对照动物（没有以 mAb 处理的或以不相关的 mAb 处理的类似的长有肿瘤的动物）相比较，来确定本发明 mAb 减小肿瘤体积、延长存活时间等能力。

筛选也可包括在适当的动物模型中检测本发明 mAb 预防癌症发生的能力。例如，对具有癌症易发基因的动物可注射本发明 mAb，然后将这种用 mAb 处理的组与用别的方法处理且同样地饲养的对照组进行比较，比较肿瘤发生率和动物存活率。不使用具有肿瘤易发基因的动物，可在各种以 mAb 处理的其它动物被实验性地给予动物恶性肿瘤细胞之前检测本发明 mAb 抑制癌症的能力。

为达到这种抗肿瘤效果，须给予实验对象有效量的本发明 mAb。术语“有效量”应被理解为为达到治疗效果所需要的 mAb 的量。这种达到最终治疗结果所需的有效量取决于多种因素，包括例如肿瘤的类型、病人病症的严重程度（即癌症状态）以及该 mAb 是否与另一种试剂一同施用，该试剂以加和方式或协同方式（注意这种共同施用，如下所述）与该 mAb 共同起作用。

可通过各种实质上众所周知的方法获得分泌本发明 mAb 的无限增殖细胞系，如通过与无限增殖细胞系融合产生杂交瘤；通过 EBV 转化；通过基因工程化细胞系，如 CHO 细胞系这样的能以各种已知的方法获得的细胞系来实现。总之，今天获得无限增殖单克隆抗体分泌细胞系的方法是本领域技术人员所知的常规技术，这里不再进行描述。

通常，当 mAb 是用于治疗人类疾病时，免疫原应是来源于人的。然而，时常存在种间交叉反应性，有时也可能使用非人源的免疫原，如来源于灵长类的免疫原进行免疫接种后获得 mAb，用于治疗人类疾病。

本发明抗体应理解为包括单克隆抗体，可以是 IgG 或 IgM 抗体、可以是该抗体的 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、单链抗体等等。此外，来自非人源如来自鼠的抗体可以通过各种基因工程手段进行“人源化”（“人源化”抗体是一种抗体，其中主要部分被人源部分取代）。

- 5 本发明的抗体可用于多种适应症的治疗中，本发明优选实施方案可用于癌症治疗。我们发现本发明单克隆抗体在减少各种肿瘤的致癌性方面是有活性的。

本发明典型的杂交瘤细胞系保藏于微生物培养物国家保藏中心（Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)），
10 Institute Pasteur, 25, Rue du Docteur Rour, 75724, 巴黎, Ledex 15, 保藏号为 No. I - 1397, 保藏时间为 1994 年 1 月 28 日。这里有时将此细胞系的细胞表示为“BAT - 1 细胞”，有时将相应的单克隆抗体表示为“BAT - 1 mAb”。

- 15 使用具有 BAT - 1 mAb 特性的单克隆抗体，特别是 BAT - 1 mAb 本身是本发明的优选实施方案。

根据其与 Daudi 人 B 淋巴母细胞系细胞的结合来筛选本发明 BAT - 1 单克隆抗体。我们发现 BAT - 1 mAb 与一种蛋白物质（以下称“BAT - 1 结合蛋白”）结合，该蛋白质的表观分子量由 SDS - PAGE 测定为 48 - 50K 道尔顿。

- 20 本发明的另一方面是 BAT - 1 结合蛋白。可通过各种已知方法使用本发明 mAb 分离 BAT - 1 结合蛋白。BAT - 1 结合蛋白可用于动物的免疫接种，从该动物中可得到本发明 mAb。

本发明也可提供一种药物组合物，组合物中包含有效量的作为活性成分的本发明 mAb 和生理上可接受的载体。

- 25 本发明另一方面是一种治疗疾病的方法，特别是癌症的治疗方法，包括给需要治疗的病人施用有效量的本发明 mAb。通常以非肠道形式如静脉内（i.v.）、腹膜内（i.p.）或肌肉内（i.m.）形式施用 mAb。用于施用的载体可以是任意一种已知的载体，如盐水溶液或任何其它合适的生理溶液。

- 30 如上所述，我们发现本发明 mAb 在减少各种肿瘤的致癌性方面是有活性的。本发明 mAb 在减少致癌性中的功效与其诱发淋巴细胞细胞毒活性的能力相关。为增强这种细胞毒活性，有时将本发明 mAb 与其

它试剂一同施用是有利的，所述其它试剂能以加和方式或协同方式与 mAb 一同起作用。例子包括各种细胞因子如 IL - 1(白细胞介素 - 1)、IL - 2、IL - 6 和 IFN - α (干扰素 - α)。

5 本发明 mAb 可用于多种非癌症疾病的治疗中，其中 mAb 对免疫系统细胞毒活性的激活作用或其它作用可能在如 HIV 感染(引起获得性免疫缺损 - AIDS 的病毒)早期，在各种自动免疫失调中，或在一些遗传性或获得性免疫缺损的情况中具有治疗效果。

10 在癌症治疗中，可在检测出初级或二级肿瘤之后对病人施用抗体，或者对患癌高危性人如放射环境中工作的人或具有遗传倾向的人进行预防治疗时施用抗体。相似地，对于 AIDS 病人，可对受感染个体在还未产生任何疾病症状时或对处于 HIV 感染过程早期的个体施用 mAb。

下面将由各实施例通过描述证明抗癌治疗活性的实验来说明本发明。但应认为这些实施例仅用于说明目的而不起限制作用。

附图的简要描述

15 图 1 表明 BAT 单克隆抗体 (mAb) 与人纯化 T - 淋巴细胞结合的流动细胞计数分析结果。用第二种携带有荧光标记的抗体， FITC - 山羊抗鼠抗体，评估 BAT 抗体的结合。

图 1a - 没有 BAT 抗体时背景读数；

图 1b - 抗 CD3 抗体；

20 图 1c - BAT - 1；

图 1d - BAT - 5；

图 1e - BAT - 2；

图 1f - BAT - 4。

25 图 2 表明了人外周血单核细胞 (PBM) (左板) 和 Jurkat T 细胞 (右板) 流动细胞计数分析结果，其中细胞以 BAT mAb 或抗 CD3 mAb 这种初级抗体和第二种偶联 FITC 的抗鼠 IgG 抗体进行双重标记。

图 2A - 未经门控的细胞；

图 2A(a) - 以 BAT mAb 处理的 PBM 细胞；

图 2A(b) - 以抗 CD3 mAb 处理的 PBM 细胞；

30 图 2A(c) - 以 BAT mAb 处理的 Jurkat T 细胞；

图 2A(d) - 以抗 CD3 处理的 Jurkat 细胞；

图 2B - 经门控的细胞；

图 2B(a) - 进入小细胞 (R1) 和大细胞 (R2) 的 PBM 细胞;

图 2B(b) - 以 BAT mAb 处理的 (R1) 细胞;

图 2B(c) - 以抗 CD3 处理的 (R1) 细胞;

图 2B(d) - 以抗 BAT mAb 处理的 (R2) 细胞;

5 图 2B(e) - 以抗 CD3 处理的 (R2) 细胞.

图 3 表明了流动细胞计数分析结果, 显示了在以偶联 FITC 的 BAT MAB 和偶联 PE 的抗 CD3 进行双重标记的人 PBM 上 BAT 结合蛋白和 CD3 的表面表达.

图 3A - 未经门控的细胞

10 图 3A(a) - 用作阴性对照的 Becton - Dicklson Simliltest 对照

图 3A(b) - 单纯的 PE - 抗 - CD3 ;

图 3A(c) - 单纯的 FITC - BAT mAb ;

图 3A(d) - 以 FITC - BAT mAb 和 PE - 抗 CD3 抗体进行双重标记;

15 图 3B - 经门控的细胞

图 3B(a) - 进入小细胞 (R1) 和大细胞 (R2) 的 PBM 细胞

图 3B(b) - 以 FITC - BAT mAb 和 PE - 抗 CD3 双重标记的 (R1) 细胞;

20 图 3B(c) - 以 FITC - BAT mAb 和 PE - 抗 CD3 双重标记的 (R2) 细胞;

图 4 为 BAT - 1 抗体与 Daudi 细胞不同溶胞产物结合的 Western 印迹分析结果.

图 4 (1) - Daudi 细胞 (未处理的) 的溶胞产物;

图 4 (2) - 以神经氨酸苷酶 (0.2u/ml) 处理的溶胞产物;

25 图 4 (3) - 以神经氨酸苷酶 (0.4u/ml) 处理的溶胞产物.

图 5 曲线表示掺入 (^3H) 胸腺嘧啶核苷的细胞随一系列 BAT mAb 浓度增加培养 6 天的结果, BAT mAb 为: BAT - 1 (- Δ -), BAT - 2 (- X -), BAT - 3 (- $\bullet$ -), BAT - 5 (- $\star$ -), BAT - 6 (- $\blacklozenge$ -), BAT - 7 (- $\blacksquare$ -).

30 图 6 曲线所示实验是在与 2.5mg/ml BAT mAb 一起培养不同培养时间的 PBM 中测试的细胞毒活性的诱导作用. HT - 29 (左) 或 RC29 (右) 细胞用作靶细胞. 效应细胞与靶细胞比率为 20:1 . 对照 (- 0

-), BAT - 1 (- ● -), BAT - 2 (- X -), BAT - 3 (- ▲ -) .

图 7 显示了以 B - 16 黑素瘤细胞接种的 C57BL 鼠的肺: 上排显示的是仅以细胞接种, 接种 24 天后的鼠肺; 下排显示的是如上述以 B - 16 细胞接种, 14 天后以 $10\mu\text{g}$ f BAT - 1 mAb 静脉注射, 接种 24 天后的鼠肺.

图 8 曲线是对图 7 所示各项实验的总结, 显示出用肿瘤细胞 B - 16 黑素瘤细胞、3LL Lewis 肺癌细胞或 MCA 105 纤维肉瘤细胞接种的鼠在接种后一个月肺中转移瘤的数目. 这一结果对用每种肿瘤所做的 3 - 4 次实验进行了概括总结. 接种肿瘤后两周, 未用 BAT - 1 处理的鼠 (-), 用 BAT - 1 ($10\mu\text{g}/\text{只}$) 处理的鼠 (+). 转移瘤 (●); 没有转移瘤 (○).

图 9 表示以 3LL Lewis 肺癌细胞接种的鼠肺. 与图 7 相似; 上排是仅以肿瘤细胞接种的肺; 下排是接种 14 天后用 $10\mu\text{g}$ BAT - 1 mAb 静脉内注射的鼠肺.

图 10 所示实验与图 9 相似, 其中肿瘤细胞为 MCA 105 纤维肉瘤细胞.

20 材料和方法

单克隆抗体的制备

用 Daudi 细胞的膜制剂免疫 BALB/c 鼠. 用甘油灌注 - 低渗冲法 (Jett, M., Seed, T. M., 和 Jamieson, G. A., J. Biol. Chem., 252:2134, (1977)) 制备 Daudi 细胞膜. $50 - 80 \times 10^6$ 个细胞悬浮于 PBS 中并于 37°C 温育, 逐渐用 30 % 甘油灌注. 冰上温育 5 分钟后, 将其离心并重新悬浮于冷的 Tris 溶胞缓冲液中 (含 10mM Tris - HCl, 1mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , pH7.4), 4°C 时混合 5 分钟, 700g 离心. 分离出上清液并在 3300g (10 分钟, 4°C) 离心. 将沉淀物再次洗涤, 将含细胞膜部分的两种上清液合并. 用 $260\mu\text{l}$ 完全弗氏佐剂乳化 $260\mu\text{l}$ 的细胞膜制剂 ($3\text{mg}/\text{ml}$), 并腹膜内注射入 BALB/c 鼠. 三周后, 取出鼠脾脏, 脾细胞与骨髓瘤细胞系 NS - 0 以 10:1 比例融合. 根据 Kohler 和 Milstein (Kohler, G., 和 Milstein, C., Nature, (London) 256:495, (1975)) 的方

法, 使用聚乙二醇进行融合, 并将杂交瘤生长于选择性培养基中。

- 细胞结合的酶联免疫吸附分析 (ELISA) 从生长的杂交瘤中筛选与 Daudi 细胞结合的上清液 (Glassy, M. C. 和 Surh, C. D., J. Immunol. Method, 81:115 (1985))。使用 [^3H] 胸腺嘧啶核苷摄入分析, 根据杂交瘤上清液诱导人 PBM 增殖的能力进一步筛选阳性杂交瘤上清液。用有限稀释法对阳性克隆进行亚克隆、重复测试、扩大培养成培养物。

用 50 % 硫酸铵沉淀, 随后进一步在 PBS 中透析从培养基中纯化的 mAb。通过结合有抗鼠抗体的 Sepharose (瑞典 Pharmacia 公司的一个商标) 柱亲和层析完成进一步纯化。

10 培养基

所有细胞均悬浮于补充有 10 % 胎牛血清 (FCS)、丙酮酸钠 (1.1mg/ml)、L - 谷氨酰胺 (0.3mg/ml) 和抗生素 (青霉素 200u/ml 和链霉素 10 μ g/ml) 的 RPMI 1640 培养基中, 并于 5 % CO_2 湿度培养箱中温育。

- 15 所用 IL - 2 单位为 Cetus (1 单位 Cetus 相当于 3 个国际单位)。
细胞制备

- 通过 ficoll - hypaque 密度离心 (Histopaque, Sigma 公司的一个商标, Sigma 公司, 圣路易斯, 密苏里州, 美国) 从健康成年人获取人外周血单核细胞 (PBM), 用 Sephadex (瑞典 Pharmacia 公司的一个商
20 标) G10 柱除尽 PBM 中的单核白细胞。通过 SRBC 玫瑰花结法分离 T 细胞。通过免疫磁性技术除尽 CD3 阳性细胞和 Leu 19 阳性细胞。用 PBS 清洗 PBM 培养物或对照样品三次, 其中 PBM 与 BAT mAb 共同温育了 5 - 6 天。未与 CD3 或 Leu 19 (CD56) 偶联的抗体被加入到完全 RPMI 培养基中的细胞中, 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 小时, 加入包被抗鼠抗体的
25 的磁珠 30 分钟。利用磁性除去吸附于珠上的细胞, 对未吸附的细胞分析其细胞毒性并以流动细胞计数染色。

细胞毒性分析测定

- 细胞毒性测定方法如下: 2 - 4 $\times 10^6$ 个靶细胞与 200 μCi 的 ^{51}Cr - 铬酸盐在无血清培养基中混合 1 小时。细胞用完全培养基洗涤 3 次, 并最终重新悬浮于 RPMI - 10 % FCS 中, 以每孔 10^4 个细胞置于培养板上。培养效应细胞, 从正常的外周血中制备的淋巴细胞与不同 mAb、

同族型对照 IgG 或 IL - 2 共同温育不同时间。在测定之前，将细胞在 RPMI 培养基中洗涤三次，用 1 % 台盼蓝对细胞活性染色，在圆底微量滴定板中以各种效应细胞 - 靶细胞比例将细胞与靶细胞混合，并于 5 % CO₂ 中 37 °C 温育 3 小时 15 分。收集培养物上清液并在 β - 闪烁计数器上计数。通过靶细胞与 Triton (Sigma 公司的一个商标, Sigma 公司, 圣路易斯, 密苏里州, 美国) x-100 共同温育而达到最大同位素释放量 (MR)。通过将靶细胞单独与培养基一起温育测定自发释放量 (SR)。通过 $(ER - SR/MR - SR) \times 100$ 计算细胞溶解的百分数，其中 ER 是实验测得的效应细胞释放量。

10

人淋巴细胞亚群中细胞毒性的诱导作用

在 BAT mAb 存在情况下培养 PBM 细胞 (4×10^6 个/ml) 6 天。然后将细胞洗 3 次, 并使用包被有抗鼠 f(ab')₂ 的磁珠除尽 CD3 和 Leu19 细胞, 测试抗 K562 和 Daudi 细胞的细胞毒性。

15

流动细胞计数

使用 FACS 440 (Becton - Dickinson) 通过流动细胞计数法检测细胞表面抗原。每次测定使用 10^6 个细胞, 通过与所生产的最适浓度的针对于人 CD3、IL - 2 受体的鼠 mAb 或 mAb BAT 1 - 9 连续温育对细胞进行染色。在这种间接染色过程中使用与 FITC 偶联的山羊抗鼠 F(ab')₂ 作为第二种抗体。每次温育均在 pH7.4 含 1 % BSA 和 5 % 叠氮钠的 PBS 中 4 °C 时进行 30 分钟, 随后用同样的缓冲液洗涤 3 次。测定 10^4 个染色细胞。

20

BAT mAb 结合决定簇的检测

使用 Western 印迹法进行 Daudi B 淋巴母细胞溶解产物上 BAT mAb 结合决定簇的检测。简而言之, 悬浮于 PBS 中的 50×10^6 细胞/ml 以 30% 甘油逐渐灌注, 通过连续离心分离出细胞膜。

25

用 SDS - PAGE (12 %) 分离细胞膜制备样品, 然后将细胞膜样品转移至浸泡于含 1 % 低脂奶的 PBS 中的硝酸纤维素印迹膜上。室温下将该印迹膜与 BAT mAb 一起温育 2 小时, 然后再与辣根过氧化物酶偶联的抗体 70 抗鼠 IgG(Fab')₂ 一起温育 30 分钟, 来检测硝酸纤维素印迹上的 BAT mAb 结合蛋白。然后浸洗细胞并以邻联茴香胺底物进行检测

30

测。

鼠肿瘤模型

- 使用了三种鼠肿瘤模型：B16 黑素瘤、Lewis 肺癌（3LL）和甲
胆蒽诱发的纤维肉瘤（MCA 105）。向 C57BL 鼠（8 周龄）静脉注射
5 50 - 200 × 10⁶ 个细胞。两周后，静脉注射 BAT - 1，注射量为 1 - 10 μg/
只，10 天后将鼠杀死并计数所生长的肺转移瘤。

10 实施例

实施例 1

a. 结合特性

- 对由 B 淋巴母细胞免疫接种得到的称为 BAT 1 - 9 的 9 个单克隆
抗体（mAb）进行筛选，首先与 Daudi 细胞结合，然后诱导人外周血
15 淋巴细胞增殖。通过 ELISA 和 Ochterlony 分析确定 BAT mAb 的同族
型。人们发现 BAT 1、2、3、6、7 和 9 为 IgG1 类而 BAT 4 和 5 为
IgM 类，BAT 8 为 IgG2a。

- 使用间接免疫荧光染色通过 FACS 分析法来分析上述 mAb 与纯化
的人外周 T 细胞的结合。图 1 显示了这一实验的 FACS 分析结果。正如
20 所看到的，BAT mAb 与外周血 CD3 + T 细胞结合，结合程度各不相同，
BAT - 2 为 44%，BAT - 5 为 38%，BAT - 1 为 32%，BAT
- 4 结合程度有些弱（13%）。来自同一供血者的纯化外周血 B 淋巴
细胞不与这些 mAb 结合（数据未示出）。

25 b. BAT - 1 与人淋巴细胞亚群的结合

正如图 2 所示，进一步的 FACS 分析表明，BAT - 1 与带 CD3 +
的人 PBM 结合，还与 Jurkat T - 细胞系的细胞结合。使用双重标记细
胞的 FACS 分析法（图 3）更进一步证实了 BAT - 1 与带 CD3 + 的 PBM
细胞的结合。

- 30 如下表 1 所示，BAT - 1 除与带有 CD3 的细胞结合外，还与 Leu
19/NK 细胞结合。

表 1

BAT - 1 mAb 与人淋巴样亚群的结合

MAB	阳性细胞 (%)	
	细胞亚群富集:	
	CD3 ₊	Leu.19 ₊
CD3	66.4 (100%)	-
Leu 19	-	59.5 (100%)
BAT - 1	19.8 (30%)	42.2 (70%)

C. BAT mAb 与各种细胞类型的结合

- 5 测定了 BAT mAb 与各种类型细胞的结合。正如下表 2 所示, BAT 除与 Daudi 和 Jurkat T 细胞系的 PBL 结合外, 还与红白血病细胞系的 K562 结合, 与人乳腺癌细胞系的 MCF7 结合。BAT mAb 与所测试细胞类型间的结合程度各不相同。mAb 2 - 9 仅以很弱的亲和力与鼠肾癌 (MR28) 细胞结合。BAT - 8 与 MEL (鼠红白血病) 细胞的结合亲和性也很弱。
- 10

表 2

BAT mAb 与各种细胞类型的结合

细胞	BAT mAb					
	1	2	4	5	8	9
人						
Daudi	+++	++	++	+++	±	+++
Jurkat	+	±	+++	+++	-	+++
PBL	+++	±	+	+	±	±
K562	+++	+	+	+++	±	+++
MCF7	±	++	+++	+++	+	+++
鼠						
MR28	-	±	+	+	±	±
MEL	-	-	-	-	±	-

使用 ELISA 鉴定结合情况, 表示如下:

+ (0.1 - 0.2OD)

++(0.2 - 0.3OD)

+++ (over 0.3OD)

5

实施例 2

BAT mAb 结合位点的分析和 BAT - 1 结合蛋白的纯化

为测定与 BAT - 1 mAb 相作用的膜蛋白分子量, 将 Daudi 细胞膜制备物溶解, 通过 SDS - PAGE 分离蛋白. 硝酸纤维素转移印迹与 BAT - 1 mAb 一起温育, 再进一步与辣根过氧化物酶偶联抗抗鼠 IgG(Fab')₂ 抗体一起温育并使用邻联茴香胺作底物检测区带. 发现 BAT - 1 结合蛋白的分子量大小约为 48 - 50KDa (图 4).

使用与 Sepharose (瑞典 Pharmacia 公司的一个商标) 偶联的 BAT mAb 来纯化 BAT mAb 结合蛋白. 也可使用分子生物学方法通过克隆来制备该结合蛋白, 对鼠施用 BAT - 1 的体内实验能导致 BAT 抗体的诱发.

实施例 3

BAT mAb 的功能特性

a. BAT mAb 诱导胸腺嘧啶核苷的掺入

在一系列浓度递增的 BAT mAb 存在情况下, 对人外周血细胞培养 6 天, 收获前 20 小时加入 [³H] 胸腺嘧啶核苷.

正如图 5 所示, BAT mAb 浓度的逐渐增加, 会使 [³H] 胸腺嘧啶核苷在 PBM 细胞中的掺入量稍有提高而非显著改变. 但是, 大剂量的抗体会使细胞摄入的胸腺嘧啶核苷量减少. 在对照实验中, 同族型匹配的抗体不会使 PBL 细胞中 [³H] 胸腺嘧啶核苷增加, 这表明 BAT mAb 的激动效应取决于它们的结合特异性. 例如, 我们实验室所培养的抗卵巢癌细胞的 IgG1 同族型 mAb 不会引起 [³H] 胸腺嘧啶核苷摄入量的增加, 与也属 IgG1 类的 BAT 1,2,3,6,7 和 9 mAb 相反.

b. BAT mAb 诱发人 PBM 细胞毒性

对于 BAT mAb 一起温育不同时间的人外周血单核细胞培养物, 测试其溶解肿瘤细胞系的能力.

正如下表 3 所示, 与一系列 BAT mAb 一起温育一周的人 PBM 细

胞，对人红白血病（NK 敏感性的）的 K562 和肾癌细胞系（NK 抗性的）细胞 RC - 29 均有细胞毒性。

我们研究了由 BAT mAb 刺激的人 PBM 细胞毒活性增强的动力学性质。正如图 6 所示，在人 PBM 与 BAT mAb 一起温育 7 天后，可获得针对于人结肠癌（HT - 29）和肾细胞癌（RC - 29）的最大细胞毒性。

表 3

BAT mAb 诱发人 PBM 细胞毒性

mAb	特异性的 ^{51}Cr 释放 (%)	
	K562	RC - 29
无	11.0*	9.1
BRT - 1	25.1	45.4
2	29.0	23.2
3	26.3	32.3
4	30.6	40.7
5	32.3	34.3
6	15.2	13.8
7	17.8	16.7
8	17.8	19.2
IL2 1000 u/ml	57.6	36.9

*靶细胞溶解百分率，所用效应细胞：靶细胞比率为 5:1

c. 在 BAT 诱发的细胞毒性中的淋巴细胞亚群的特性

为评估 BAT mAb 诱发的人 PBM 细胞毒性的增加是否是由于 NK 细胞的激活、T 细胞的激活或这两种细胞激活作用，对 NK 和 T 细胞进行纯化，并测定其 BAT 诱发的细胞毒性。为纯化 NK 和 T 细胞，将抗 Leu 19 和抗 CD3 单克隆抗体与人 PBM 细胞一起温育，随后与包被有抗鼠 IgG 磁珠一起温育。这会导致与相应抗体结合的细胞亚群被完全除去。正如下表 4 所示，在除去 CD3 和 Leu 19 的细胞培养物中，溶解单位的数增大，这些实验中使用 BAT 6 和 8，靶物为人红白血病（K562）和

人淋巴瘤 (Daudi) .

表 4

BAT 在人淋巴细胞亚群中诱发细胞毒性

	溶解单位			
	靶细胞:			
	K562		Daudi	
	效应细胞, 除去:			
	CD 3	Leu 19	CD 3	Leu 19
对照	8	4	10	3.8
BAT 6	25	10	20	13
BAT 8	28	12.5	26	20

5 实施例 4

BAT mAb 和 IL - 2 在诱发细胞毒性中的协同作用

将 BAT mAb 和 IL - 2 一起与 PBM 细胞温育, 研究人 PBM 细胞毒性的诱发. 将次最适浓度 (1u/ml) 的 IL - 2 与浓度逐渐增高的 BAT - 2 mAb 一起加入. 培养一周后, 检测对 K562 和 HT29 肿瘤细胞系的细胞毒性. 如下表 5 所示, 低浓度的 BAT - 2 在诱发 PBM 细胞抗两种靶细胞的细胞毒性中与 IL - 2 具有协同作用.

前文已表明 INF - α 能增强 MHC - I 类抗原的表达. 因此, 施用 INF - α 可能会强化 BAT 的抗肿瘤效果, 这是通过抗各种肿瘤细胞 (带有 MHC I 类抗原) 的细胞毒细胞的介导实现的.

15

20

表 5

BAT - 2 mAb 和 IL2 在诱导人 PBL
细胞毒性中的协同作用

		特异性 ^{51}Cr 释放 (%)			
		靶细胞			
BAT		HT29	K562		
(μ g/ml)		IL - 2 (1 U/ml)			
		-	+	-	+
0		5.8 $\pm$ 0.1	7.5 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.4
2		14.8 $\pm$ 1.3	37.6 $\pm$ 2.0	12.1 $\pm$ 0.4	29.6 $\pm$ 1.6
4		16.7 $\pm$ 0.6	27.3 $\pm$ 1.0	13.3 $\pm$ 0.6	18.5 $\pm$ 1.2
8		22.0 $\pm$ 1.0	15.1 $\pm$ 0.6	19.9 $\pm$ 0.7	12.5 $\pm$ 0.4

5 实施例 5

BAT - 1 鼠的免疫刺激作用:

a. 体外实验

mAb BAT - 1 表现出在鼠脾细胞中具有类似于在人 PBL 中所表现的刺激性质。这些性质包括:

- 10 (i) 通过掺入 [^3H] 胸腺嘧啶核苷测得, 脾细胞在体外增殖加强 (表 6);
- (ii) 通过脾细胞与 BAT - 1 和 IL - 2 结合物一起温育得到协同刺激作用 (表 6)。

表 6

BAT - 1 (μ g/ml)	cpm [^3H] 胸腺嘧啶核苷 $\times 10^3$		
	IL2		
	-	1 U/ml	10 u/ml
-	1.5 $\pm$ 0.07	16.0 $\pm$ 0.9	67.5 $\pm$ 1.6
10	11.0 $\pm$ 0.4	32.1 $\pm$ 1.5	241.6 $\pm$ 17.1
1	12.9 $\pm$ 0.8	35.9 $\pm$ 3.3	247.8 $\pm$ 1.9
0.1	18.1 $\pm$ 0.9	51.0 $\pm$ 7.3	255.1 $\pm$ 18.0
0.001	10.5 $\pm$ 0.1	34.1 $\pm$ 0.5	215.1 $\pm$ 20.8

0.0001	2.6 ± 0.1	13.2 ± 0.9	73.3 ± 5.6
--------	---------------	----------------	----------------

C57BL 鼠脾细胞在体外与各种浓度 BAT - 1 及白细胞介素 - 2 (1u 和 10u/ml) 一起温育 5 天.

(iii) 在 BAT - 1 存在时鼠脾细胞培养物中细胞毒性增强, 有 IL - 2 存在的温育使细胞毒性进一步增强 (表 7).

表 7

BAT - 1 (ng/ml)	特异性 ^{51}Cr 释放(%) ^a		
	白细胞介素 - 2		
	-	1 u/ml	10 u/ml
-	7.4	10.0	31.1
100	24.9	31.3	52.4
10	17.4	26.7	52.8
1	12.3	23.9	46.8
0.1	12.2	21.7	45.5

在各种浓度 BAT - 1 及低浓度 IL - 2 存在时体外培养 C57BL 脾细胞 5 天诱发的细胞毒性.

^a B16 黑素瘤细胞用作靶物.

效应细胞与靶细胞比率为 50:1

对 BAT - 1 激活脾细胞产生的杀伤作用敏感的鼠肿瘤细胞包括:
B16 黑素瘤、Lewis 肺癌 (3LL)、纤维肉瘤 (MCA 105)、肾细胞癌 (MR28) 和淋巴瘤 (YAC) 细胞 (表 8).

表 8

BAT - 1 在脾细胞中诱导的
抗鼠肿瘤细胞的细胞毒性
(体外试验)

鼠种	肿瘤靶细胞 细胞	特异性 ^{51}Cr 释放 % ^a	
		BAT - 1	
		-	+
C57BL	B16 黑素瘤	5.4	13.6
	Lewis 肺癌(3LL)	11.2	24.0
	纤维肉瘤(MCA 105)	27.0	45.0
BALB/C	淋巴瘤(YAC)	8	12.2
	肾细胞癌(MR28)	0.1	5.2

^a 在 BAT - 1 mAb ($1 \mu\text{g/ml}$) 不存在时, 体外培养脾细胞 5 天
在效应细胞/靶细胞比率为 60:1 时测定细胞毒性

10 b. 体内实验

正如下表 9 所示, BAT - 1 表现出体内施用时有免疫刺激作用。
这些作用包括:

(i) 刺激 [^3H] 胸腺嘧啶核苷在鼠脾细胞中的掺入, 鼠为十天前以
BAT - 1 注射的鼠 (表 9A)。BAT 施用剂量为 $10\mu\text{g/只}$ 时可获得最大
15 刺激作用 (10 倍)。

(ii) 在来自以 BAT - 1 注射鼠的脾细胞中诱发细胞毒性 (表 9B)。
在细胞毒性分析前 10 天以不同剂量施用 BAT - 1, 诱发对鼠黑素瘤
(B16 - F10) 细胞、肾细胞癌 (MR - 28) 细胞和淋巴瘤 (YAC)
细胞的细胞毒性。在 BAT 施用剂量为 $10\mu\text{g/只}$ 时, 可获得最佳效果。

表 9
注射 BAT mAb 的鼠的脾细胞
的增殖和细胞毒性

A [³ H]胸腺嘧啶核苷掺入 cpm × 10 ⁻³ ± SEM	BAT (μg/只)	B 特异性 ⁵¹ Cr 释放 (% ± SEM)		
		靶细胞		
		B16	MR - 28	YAC
9.9 ± 1.5 (n=16)	0	3.9 ± 1.4 (n=10)	16.0 ± 2.7 (n=8)	3.3 ± 0.4 (n=6)
15.3 ± 2.3 (n=12) p < 0.1	1	13.2 ± 1.4 (n=6) p < 0.001	31.7 ± 2.8 (n=8) p < 0.01	16.7 ± 1.6 (n=6) p < 0.001
20.0 ± 4.0 (n=14) p < 0.05	10	14.0 ± 1.2 (n=6) p < 0.001	25.2 ± 2.1 (n=8) p < 0.02	19.0 ± 2.6 (n=6) p < 0.001

以不同浓度 BAT mAb 静脉注射鼠 C57BL 和 BALB/c。10 天后测定分离出的脾细胞的细胞毒性和 [³H] 胸腺嘧啶核苷的掺入。用来自 C57BL 鼠的脾细胞对 B16 黑素瘤靶细胞进行测试, 用来自 BALB/c 鼠的脾细胞对 MR - 29 和 YAC 细胞进行测试 (效应细胞: 靶细胞值为 50:1)。每组包括 6 - 16 只鼠, 进行 3 - 4 次独立的实验。对每只鼠的细胞毒性和 [³H] 胸腺嘧啶核苷掺入测三次并且计算出平均值, 结果以几只鼠的平均值 ± 标准误差表示, 给出的 P 值为对照鼠和以 BAT 处理的动物间的差值。

实施例 6

抗鼠肿瘤的 BAT - 1 的免疫治疗效果

正如表 10 所示, 接种黑素瘤鼠在接种肿瘤细胞后 14 天施用 BAT - 1, 可以使长有 B16、3LL 和 MCA 肿瘤的鼠肺中肺转移瘤数目减少:

a.1. 使用已建立的肺转移瘤模型, BAT - 1 在接种 B16 黑素瘤鼠中消除肺转移瘤

用 50×10^3 个 B16 黑素瘤细胞注射 (i.v.) C57BL 鼠 (表 10)。注射后 24 天在肺中生长有大量转移瘤 (实际上已达到汇合) 如图 7 上排所示。

与之相反, 如图 7 下排所示, 接种 B16 黑素瘤后两周以 BAT - 1 (10 μ g/只) 注射的鼠肺实际上没有转移瘤。

图 8 总结了在上述相似条件下所做的 6 个相互独立的实验结果。

表 10
BAT mAB 的抗肿瘤效果
BAT 诱发的肺转移瘤减少

转移瘤数目 ^c	肿瘤 ^a					
	B16		3LL		MCA	
	BAT 处理 ^b					
	- (n=24) ^d	+ (n=27)	- (n=11)	+ (n=11)	- (n=8)	+ (n=9)
无	0	25	0	6	0	4
1 - 10	0	2	0	4	0	5
11 - 50	8	0	3	1	5	0
> 250	16	0	8	0	3	0
肺重(gr)	0.803 ^e ± 0.26	0.315 ± 0.66	1.014 ± 0.21	0.364 ± 0.06	0.836 ± 0.31	0.328 ± 0.06

^a 在第 0 天接种肿瘤

^b 在第 14 天静脉内注射 BAT mAb (10 μ g/只)

^c 在肿瘤接种后 24 天, 使用 Zeiss 立体显微镜计数肺转移瘤

^d 鼠数

^e (n) 只鼠肺重的平均值 $\pm$ SD

a2. 在与 B16 肿瘤接种相关的不同时间注射 BAT - 1 mAb 的抗肿瘤效果

正如表 11 所示, 注射黑素瘤细胞的鼠, 10 - 14 天后施用 BAT - 1 mAb, 发现没有转移瘤且肺重正常。我们注意到, 在肿瘤接种后 5

天及肿瘤施用后 19 天, 鼠肺中转移瘤虽然没有完全消失但数目明显减少。在接种肿瘤细胞的同一天注射 BAT - 1, 没有治疗效果。

表 11

在与 B16 黑素瘤接种相关的
不同时间施用 BAT

日期 ^f	鼠数	转移瘤数	肺重(gr)
无	10	155.0 ± 28	0.829 ± 0.19
- 6	3	61.0 ± 0.8	0.983 ± 0.1
0	7	148.0 ± 36	0.425 ± 0.05
5	4	0.8 ± 0.5	0.243 ± 0.07
10	4	0.0 ± 0.0	0.240 ± 0.08
14	7	0.0 ± 0.0	0.286 ± 0.03
19	4	2.2 ± 1.3	0.338 ± 0.01
23	4	75.4 ± 44	0.840 ± 0.24

^f. 施用 BAT mAb 的日期(天), 相对而言接种肿瘤的日期为第 0 天。

- 10 b. 使用已建立的肺转移瘤模型, 在接种 Lewis 肺癌 (3LL) 的鼠中, BAT - 1 使肺转移瘤消除

除注射 2×10^3 个 3LL 细胞外, 实验条件与使用 B16 黑素瘤的情况相似(见上所述)。图 9 上排显示了接种 3LL 的具有大量转移瘤的鼠肺。图 9 下排显示接种肿瘤细胞 14 天后以 BAT - 1 处理的鼠肺, 正如所看到的, 几乎没有转移瘤。

- 15 c. 使用已建立的肺转移瘤模型, 在接种 MCA 纤维肉瘤 (MCA 105) 的鼠中, BAT 使肺转移瘤消失

实验条件与上述 3LL Lewis 肺癌模型中的相似。图 10 上排显示出接种 MCA 105 的鼠肺具有大量转移瘤。图 10 下排显示出接种肿瘤后以 BAT - 1 处理的鼠肺, 正如所示, 几乎没有转移瘤。

实施例 7

BAT - 1 治愈生长有 B16 和 3LL 肿瘤的鼠

如上所述接种 B16 黑素瘤细胞或 3LL 细胞的鼠, 在接种肿瘤后 25

- 35 天死去。与此相反，正如图 11 所示，肿瘤接种后 14 天以 BAT - 1 (10 μ g/只) 注射的所有鼠均能生存 100 多天。大多数动物在随后 5 个月中没有表现出疾病征兆，且病理检查没有发现转移瘤。

5

实施例 8

以 BAT - 1 mAb 处理的鼠脾细胞的过继转移(adoptive transfer)

10 将来自单独以 BAT - 1 mAb 处理的鼠，或先注射有 B16 黑素瘤细胞再以 BAT - 1 mAb 处理的鼠的脾细胞转移入受体鼠。该受体鼠以 B16 黑素瘤细胞接种或以 3LL 肿瘤细胞接种。正如下表 12 所示，得自注射有 BAT - 1 mAb 鼠的脾细胞的过继转移，使接受该转移脾细胞的鼠的肿瘤消退。当 10⁸ 个鼠脾细胞被过继转移入长有肿瘤的受体鼠时，会获得最有效的治疗，其中脾细胞来自以 B16 黑素瘤细胞接种且 14 天后再注射 BAT - 1 的鼠。正如表 12 所示，这种情况下，如转移瘤数目和肺重的结果所示，能从长有 B16 肿瘤的受体中完全消除黑素瘤细胞，使长有 3LL 肿瘤的受体中的肿瘤显著消退。

15

表 12

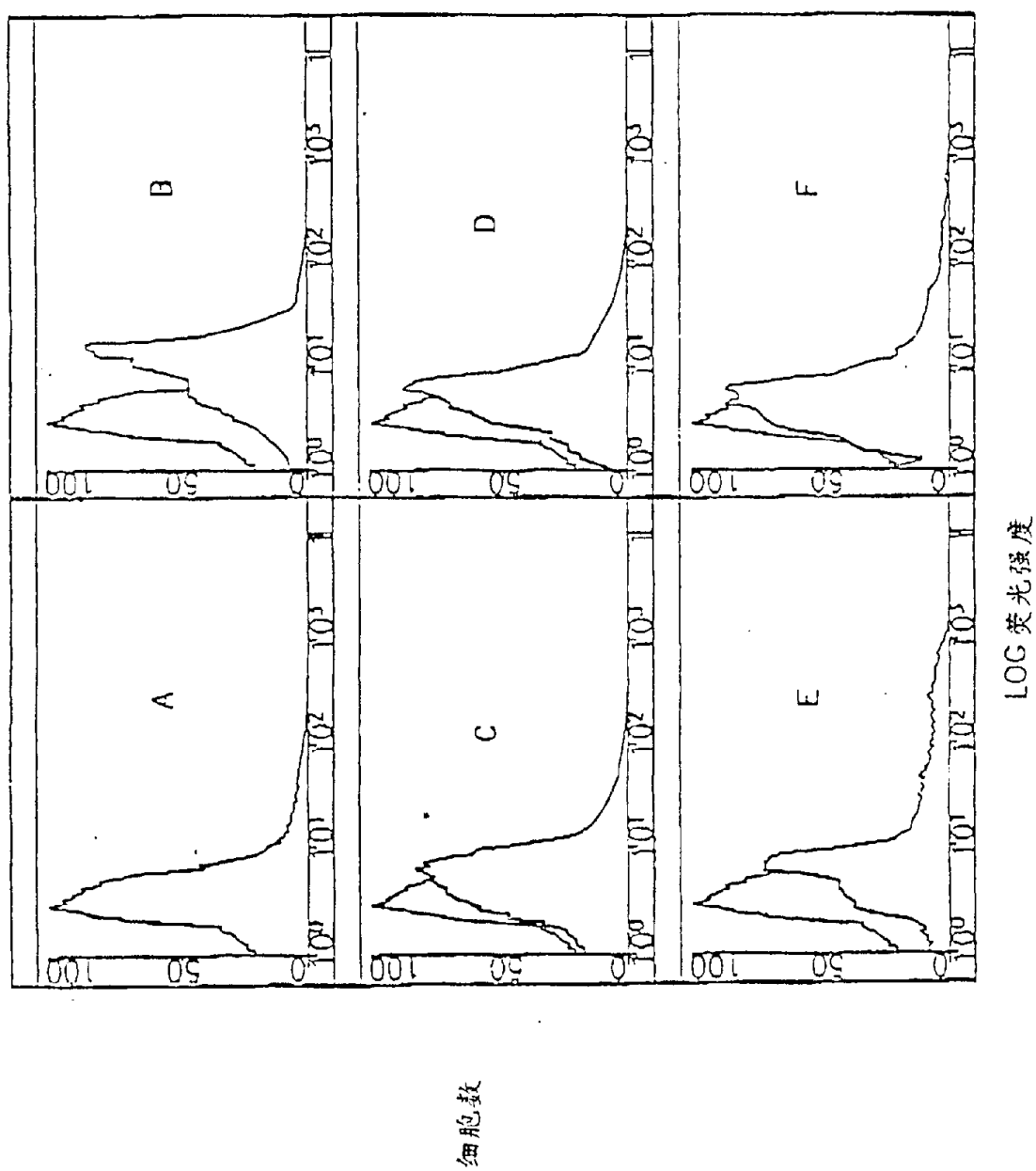
过继转移诱发肿瘤消退^a

接种肿瘤的鼠 (受体)									
B16					3LL				
转移脾细胞数									
供体组	10 ⁷		10 ⁸		10 ⁷		10 ⁸		肺重
	转移瘤数	肺重	转移瘤数	肺重	转移瘤数	肺重	转移瘤数	肺重	
A.未处理	> 250	1.09 ± 0.9 ^c	> 250	1.12 ± 0.04	> 250	1.05 ± 0.16	> 250	1.12 ± 0.16	
B.BAT - 处理的 b	89 ± 10 ^d	0.67 ± 0.04	28 ± 4.3	0.41 ± 0.19	134 ± 15	0.87 ± 0.29	134 ± 19	0.77 ± 0.31	
C.注射 B16 ^c 并用 BAT 处理	4 ± 4	0.32 ± 0.01	0 ± 0.0	0.31 ± 0.01	3.6 ± 2.9	0.34 ± 0.06	2.6 ± 1.1	0.36 ± 0.03	

^a 向接种肿瘤后 14 天的受体鼠静脉注射来自三组鼠 (A, B, C) 的脾细胞^b 静脉注射 BAT (10 μg/只) 后 20 天从鼠中转移脾细胞^c 条件与^b相同, 除了在 BAT 施用前 14 天以 B16 黑素瘤接种鼠^d 三只鼠的肺转移瘤平均值 ± 标准误差 SD^e 三只鼠的肺重 (gr) 平均值 ± SD

这些结果表明，来自 B16 接种和以 BAT - 1 处理的鼠的单纯的脾细胞对 B16 和 3LL 肿瘤均呈现出抗肿瘤效果。因此，看来 BAT - 1 增强非特异性的细胞效应机制。并且，肿瘤的存在会强化 BAT - 1 诱导这种效应细胞产生的增加。

图 1



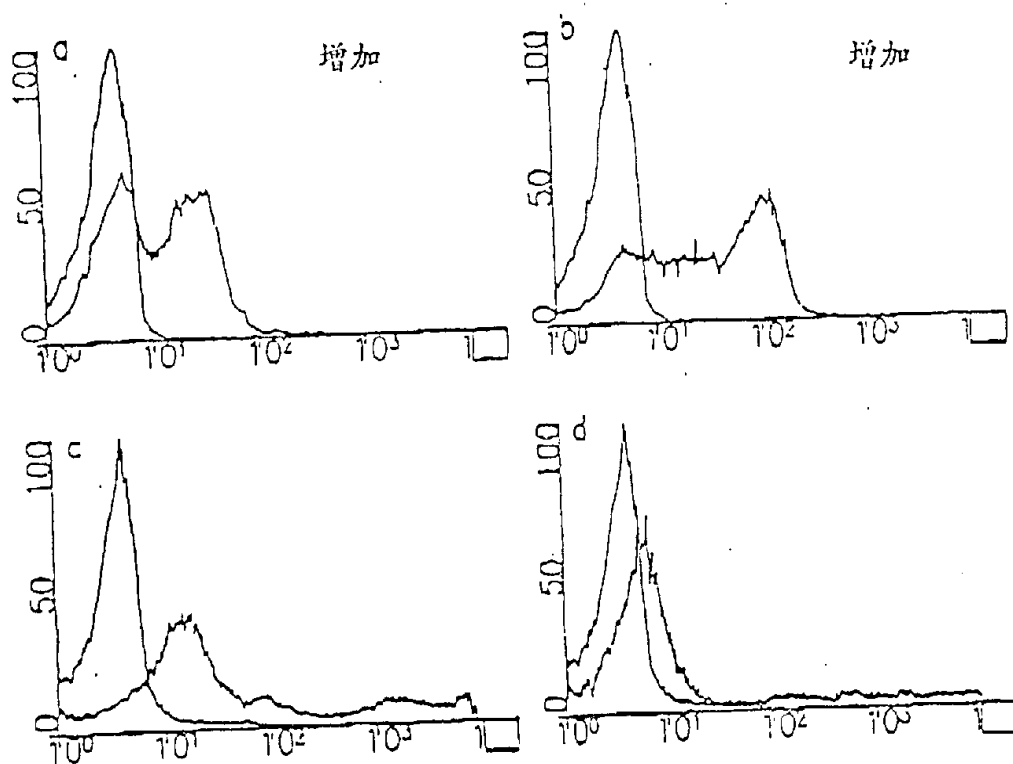


图 2 a

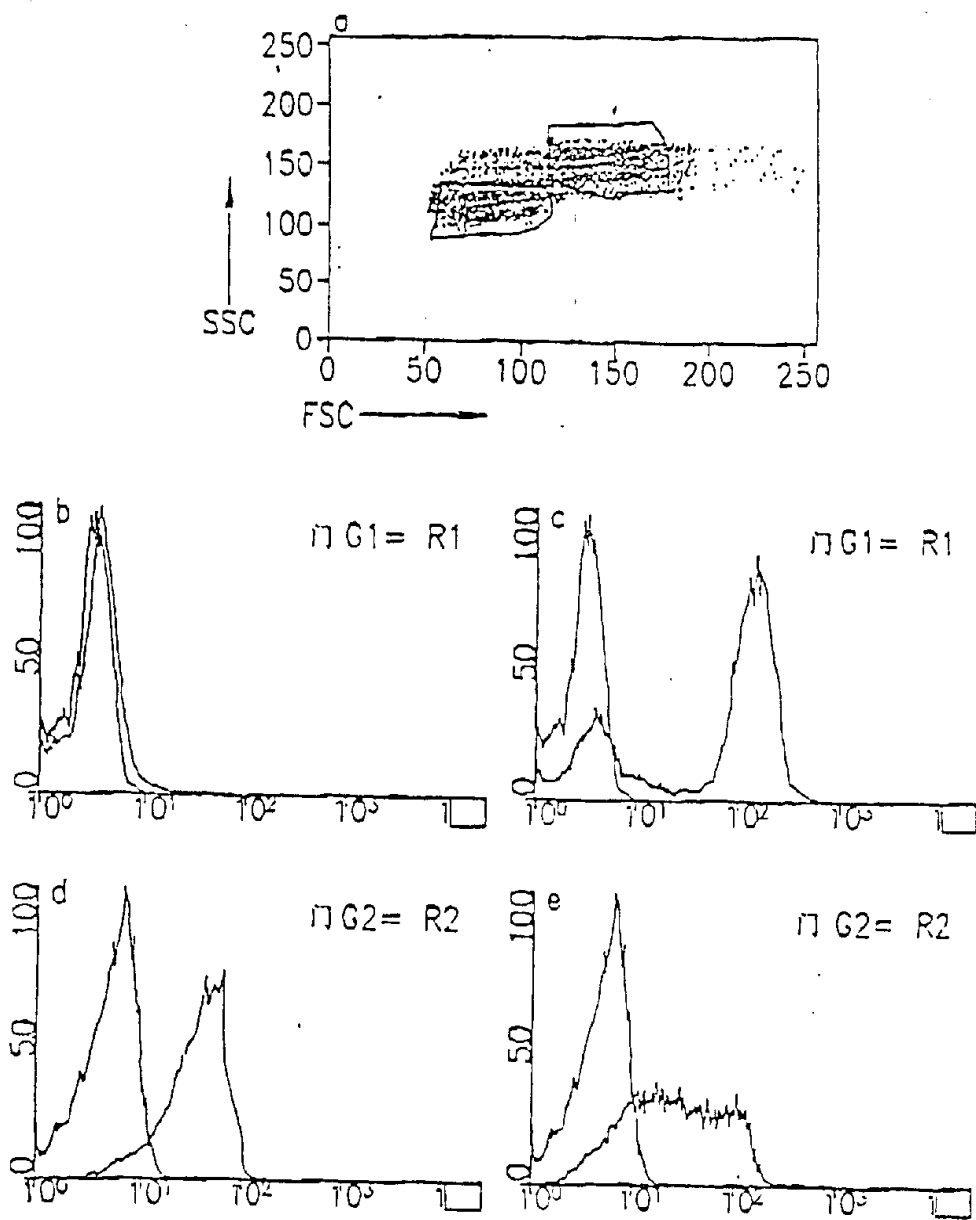


图 2b

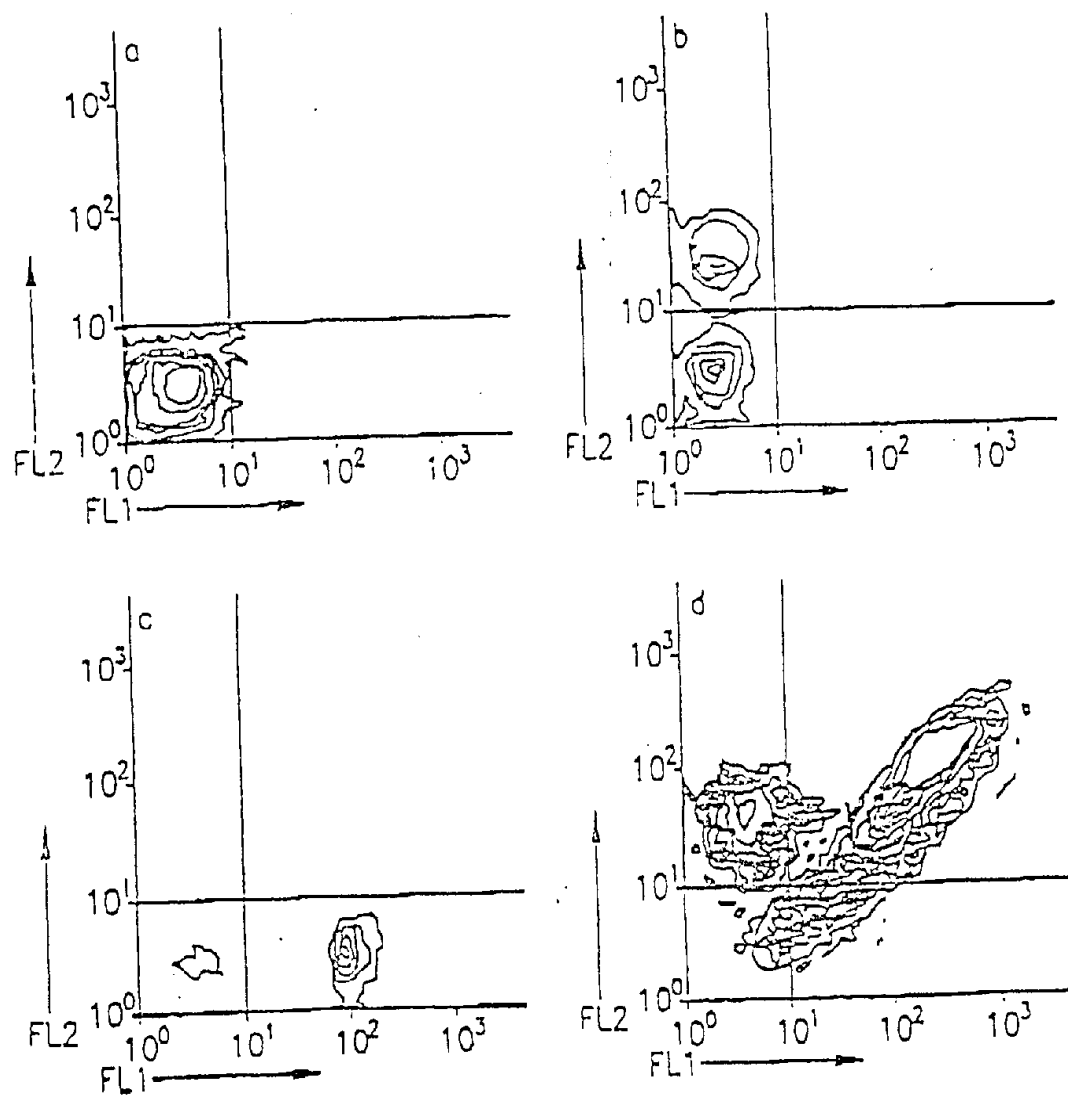


图 3 a

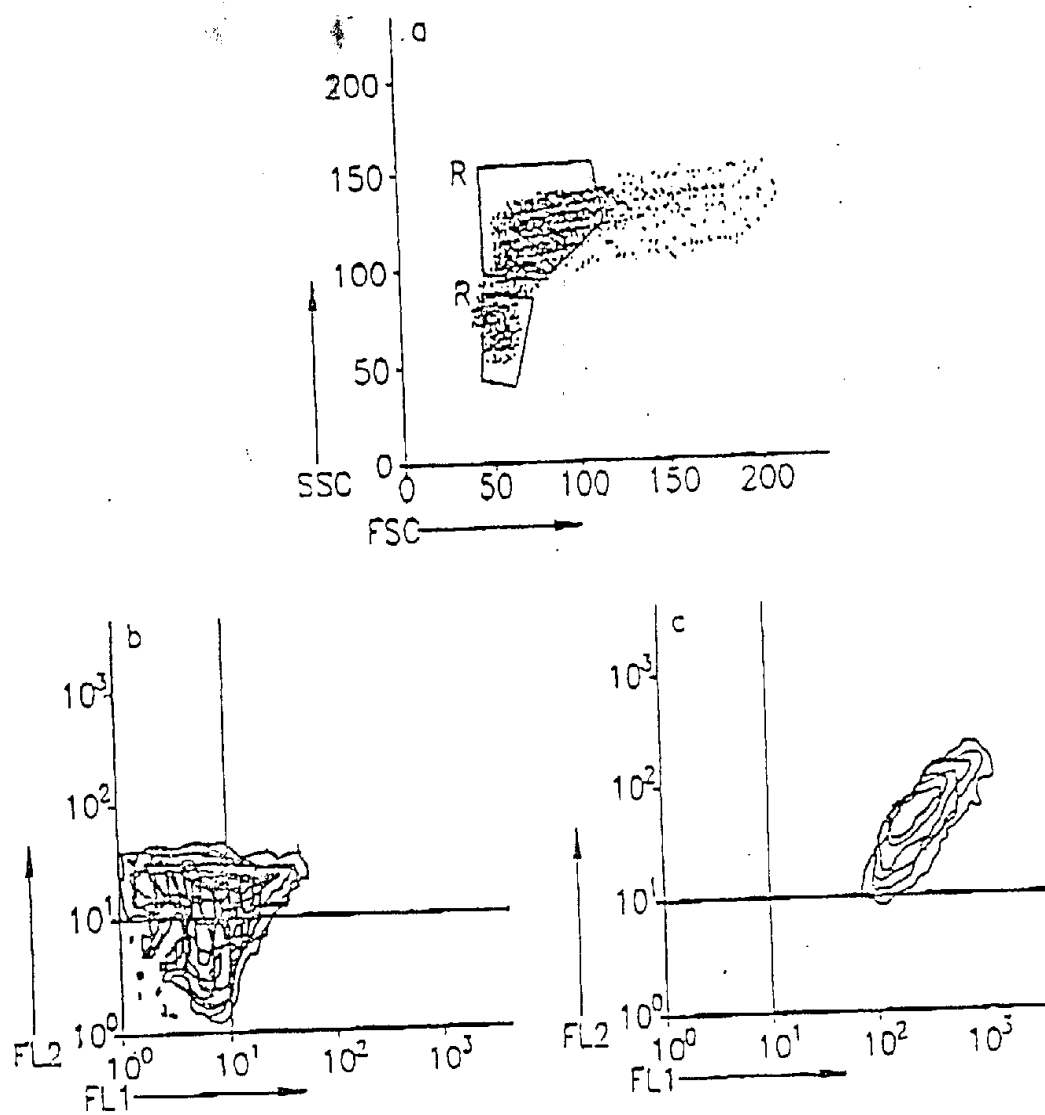


图 3 b

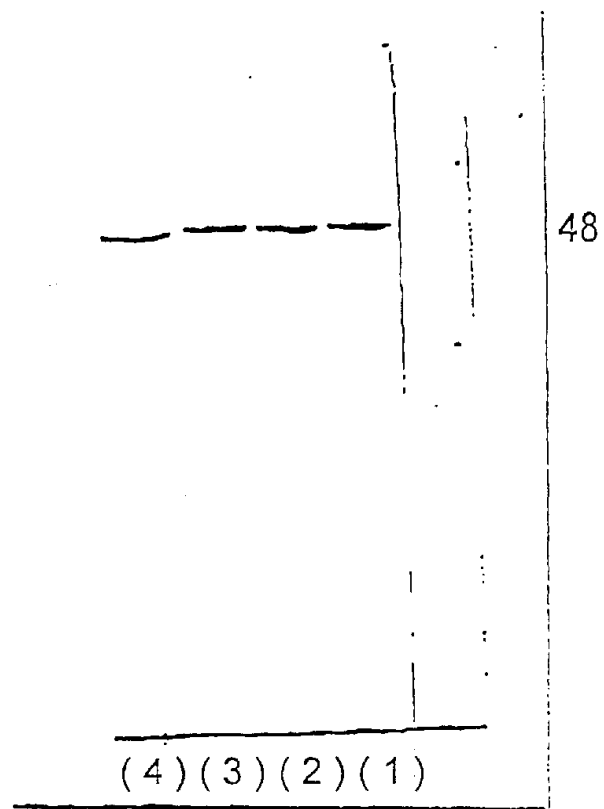


图 4 包括图 4(1)
图 4(2)
图 4(3)
图 4(4)

图 5

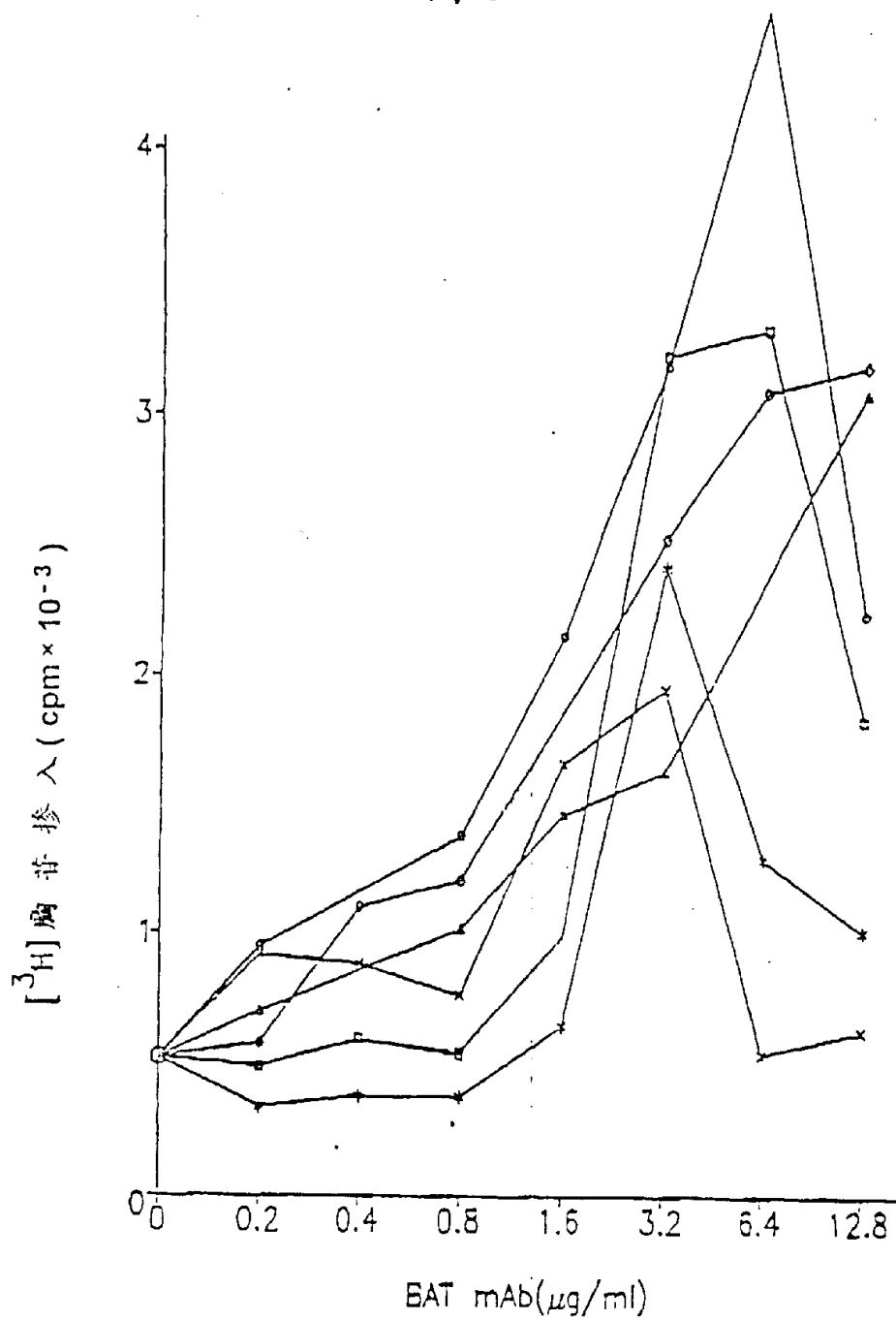


图 6

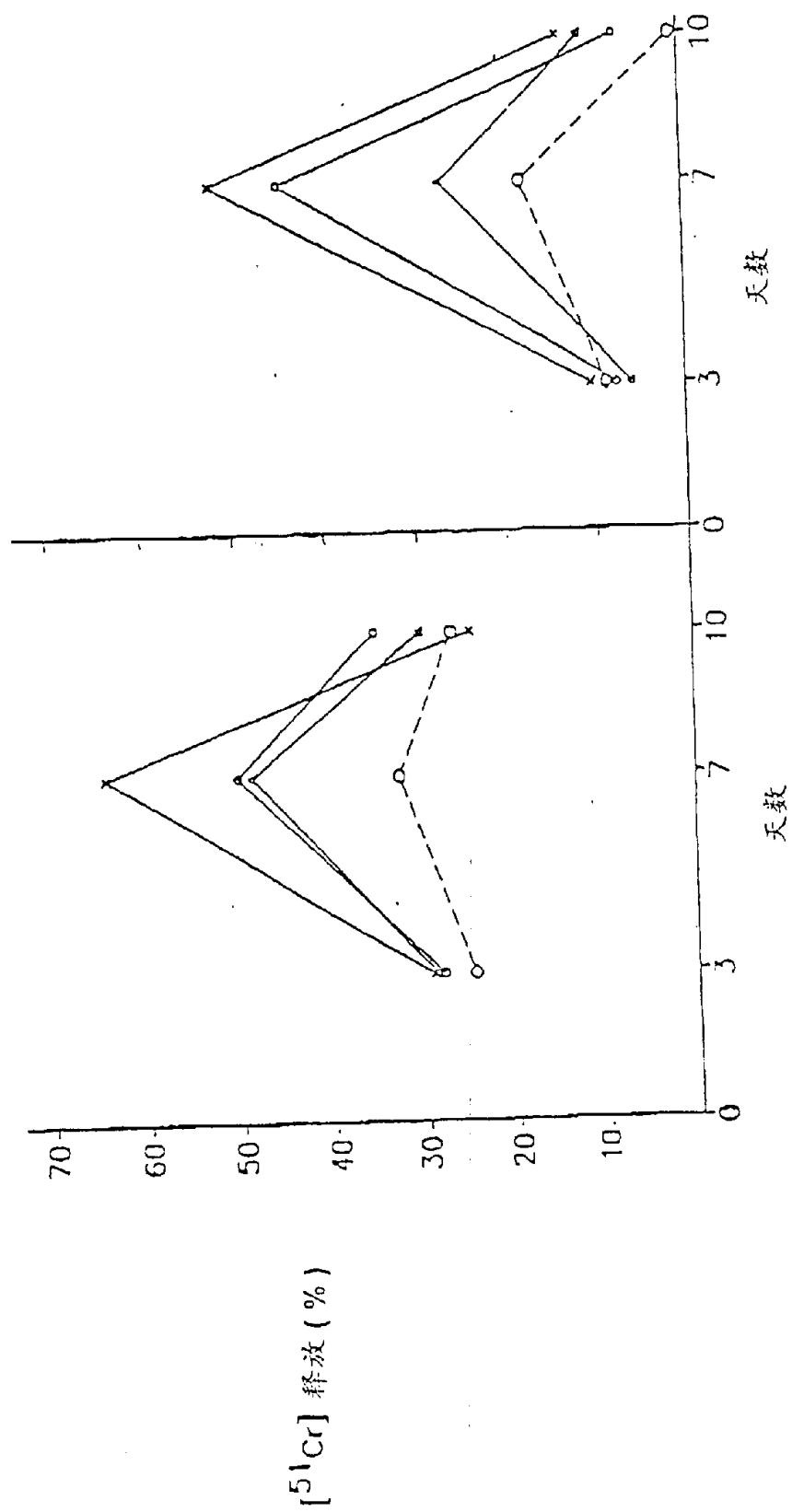




图 7

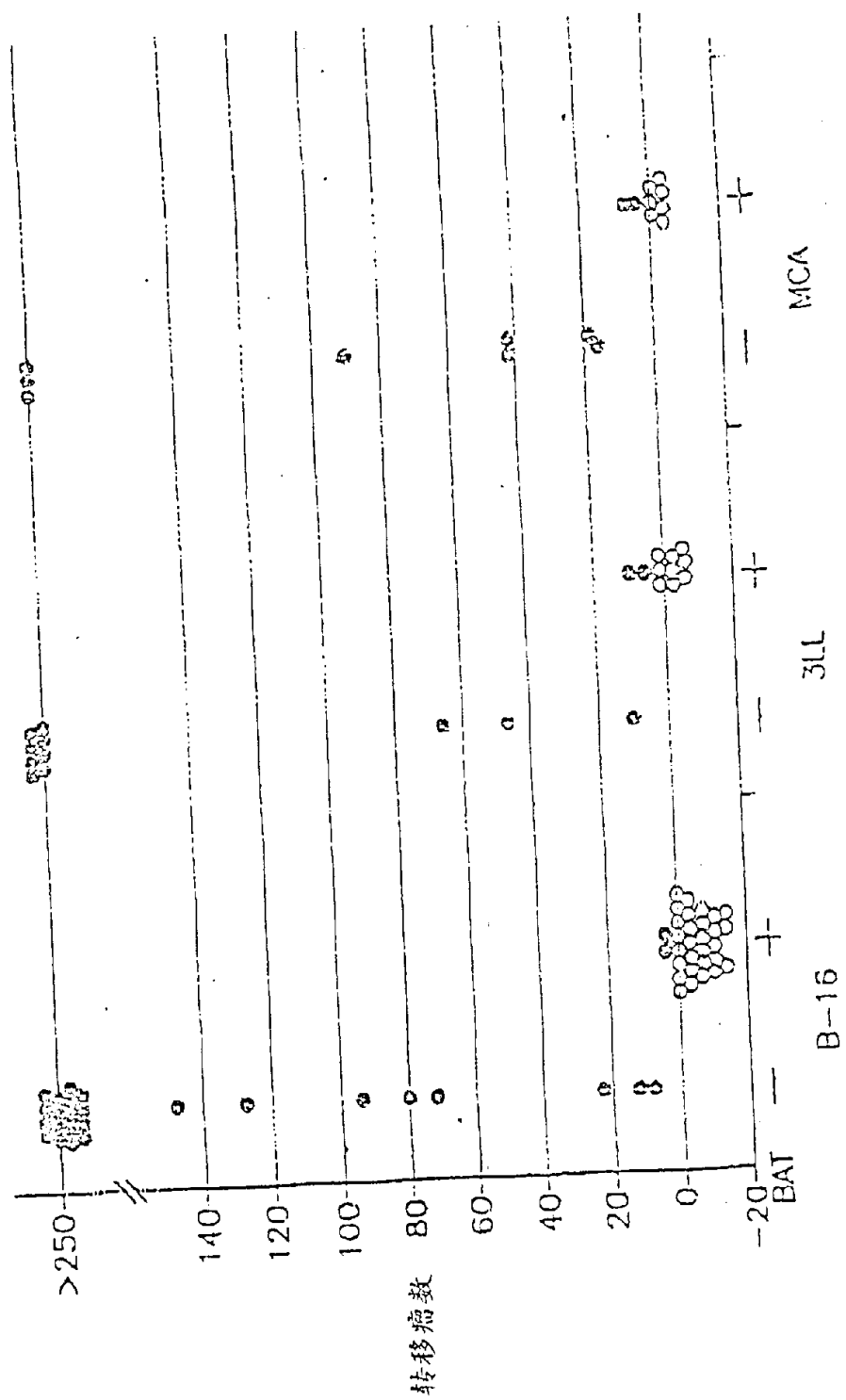


图 8

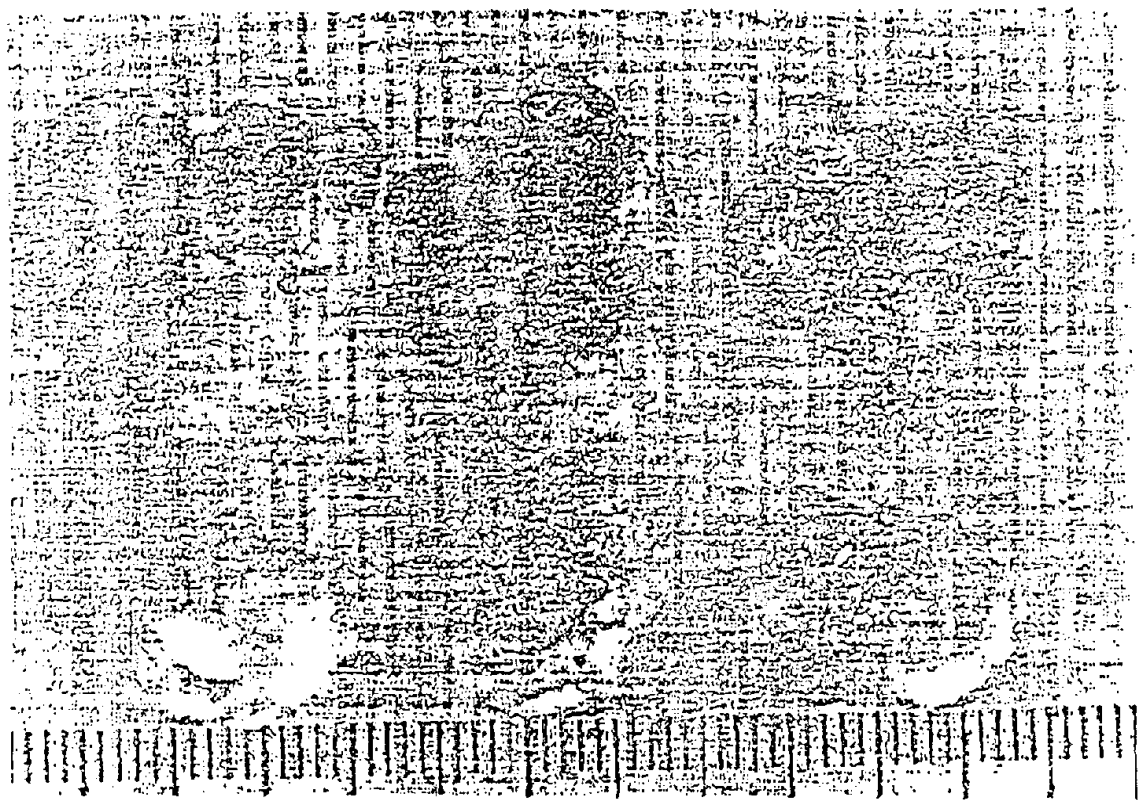


图 9

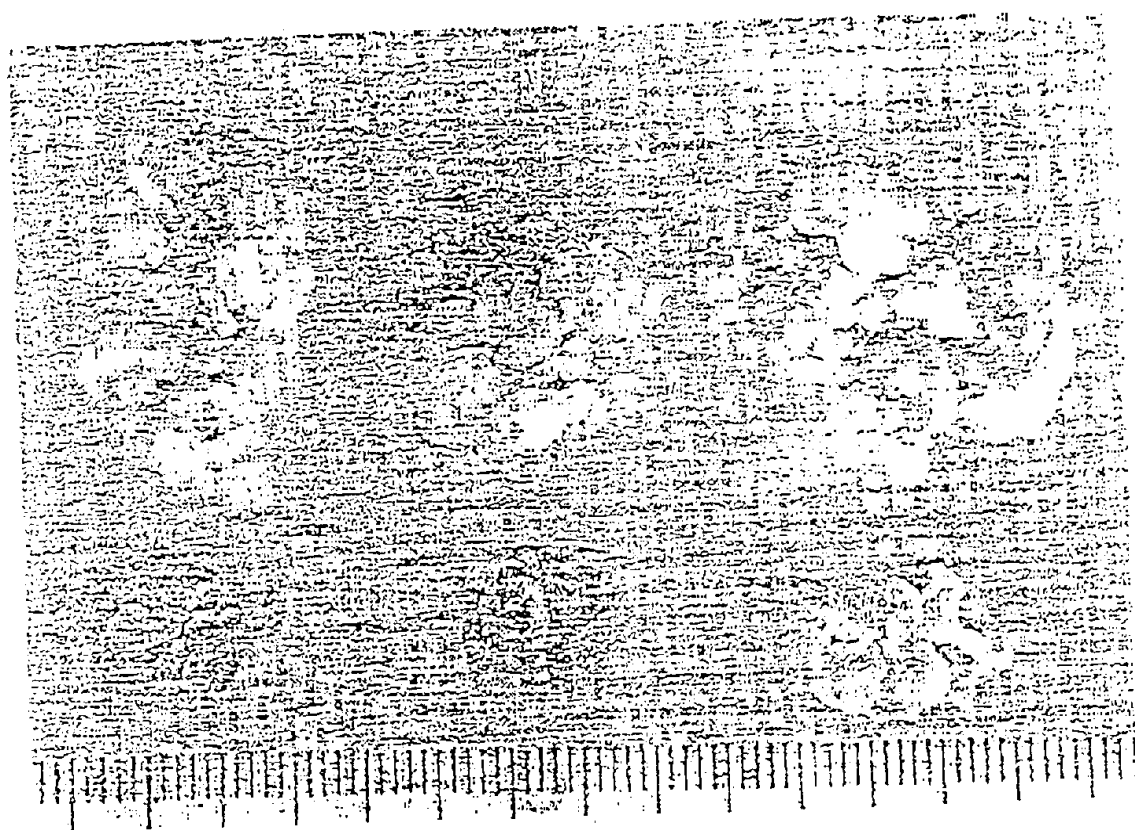


图 10