

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 01815054.3

[51] Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 5/24 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/07 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 6 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 100497601C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/577 (2006.01)

[22] 申请日 2001.7.9 [21] 申请号 01815054.3

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 7 [33] GB [31] 0016824.5

[32] 2000. 7. 12 [33] GB [31] 0017139.7

[32] 2001. 2. 23 [33] US [31] 60/270588

[86] 国际申请 PCT/GB2001/003059 2001.7.9

[87] 国际公布 WO2002/004607 英 2002.1.17

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.3

[73] 专利权人 剑桥大学技术服务有限公司

地址 英国剑桥

[72] 发明人 A·卡帕斯

[56] 参考文献

US4720459A 1988.1.19

审查员 李 伟

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 21 页

[54] 发明名称

人骨髓瘤细胞系

[57] 摘要

提供用于产生人单克隆抗体的方法的人骨髓瘤细胞系。

1. 一种适于在制备分泌人单克隆抗体的杂交瘤的方法中使用的人骨髓瘤细胞系，其中所述骨髓瘤细胞系称为 Karpas 707，所述细胞系与以保藏号 ECACC 00071108 保藏样品相同。

2. 一种制备人杂交瘤的方法，该方法包括将权利要求 1 的人骨髓瘤细胞系与人白细胞融合的步骤。

3. 权利要求 2 方法，所述方法包括下列步骤：

a) 在聚乙二醇存在、失活仙台病毒存在或者在电融合条件下，将权利要求 1 的骨髓瘤细胞系与人白细胞温育；

b) 选择杂交细胞。

4. 权利要求 3 的方法，其中 b) 步骤包括：

i) 在存在次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷培养基和存在或不存在哇巴因的条件下继续温育；

ii) 选择抗次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷培养基和任选抗哇巴因的细胞；

iii) 培养所述抗次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷培养基和任选抗哇巴因的细胞，然后选择单个杂交瘤克隆。

5. 权利要求 2-4 中任一项的方法，其中所述白细胞是产生抗体的淋巴细胞、淋巴母细胞或者产生淋巴因子的白细胞。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述淋巴母细胞是 EBV 无限增殖化的淋巴细胞。

7. 权利要求 2-4 中任一项的方法，其中所述人白细胞是不同程度抗原激活的淋巴细胞。

8. 一种人杂交瘤细胞系，所述杂交瘤细胞系通过权利要求 2-7 中任一项的方法制得。

9. 权利要求 8 的人杂交瘤细胞系，所述细胞系具有大量粗面内质网。

10. 一种人单克隆抗体, 所述人单克隆抗体由权利要求 8 或 9 的杂交瘤细胞系制得。

11. 权利要求 10 的人单克隆抗体, 所述抗体用于治疗或预防疾病的方法中。

12. 权利要求 11 的人单克隆抗体, 所述抗体用于使人类受试者获得体液免疫。

13. 一种产生抗体的方法, 所述方法包括下列步骤:

(i) 将淋巴细胞用于权利要求 2-7 中任一项的方法中, 从而产生人杂交瘤;

(ii) 分离所述杂交瘤分泌的抗体。

14. 权利要求 13 的方法, 其中所述抗体能够治疗和/或预防疾病。

15. 权利要求 14 的方法, 其中淋巴细胞是肿瘤浸润淋巴细胞, 所述抗体可用于治疗或预防癌症。

16. 一种鉴定疾病特异性抗原的方法, 所述方法包括下列步骤:

(i) 通过权利要求 14 或 15 的方法产生疾病特异性抗体;

(ii) 推导所述抗体特异性识别的抗原。

17. 下述方法产生的抗体在制备监测人体免疫反应的药物中的用途, 所述方法包括下列步骤:

(i) 将淋巴细胞用于权利要求 2-7 中任一项的方法中, 从而产生人杂交瘤;

(ii) 分离各杂交瘤所分泌的抗体。

18. 一种产生人抗体的方法, 所述方法包括以下步骤:

(i) 用一种或多种抗体编码基因转染权利要求 1 的人骨髓瘤细胞系;

(ii) 用所述转染骨髓瘤细胞系产生抗体。

19. 一种产生体液因子的方法, 所述方法包括下列步骤: 将权利要求 1 的骨髓瘤细胞系细胞与能够产生体液因子的白细胞融合。

20. 权利要求 8 的人杂交瘤细胞系在选择能够产生杂种杂交瘤的

突变体的方法中的应用。

人骨髓瘤细胞系

本发明涉及一种人骨髓瘤细胞系。具体地说，本发明涉及人骨髓瘤细胞系在制造人杂交瘤的方法中的应用，所述人杂交瘤能够产生人单克隆抗体。

背景

Kohler 和 Milstein 在 1975 年设计了用于提供小鼠单克隆抗体的技术(1,2)。在该方法中，免疫小鼠的产生抗体的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合，产生称为杂交瘤的杂交细胞。融合后，使用杀死所述骨髓瘤亲本细胞的药物选择所述细胞，而未融合的亲本脾细胞寿命有限，很快死亡，因此仅有杂交细胞存活下来。这些杂交瘤能够无限增殖并分泌抗体，所述抗体特异性针对用于免疫所述脾细胞供体的抗原。克隆产生具有所需特异性抗体的杂交瘤，获得产生均一抗体分子(即单克隆抗体)的杂交瘤细胞系。

人们已经进行了许多研究努力，试图应用该技术产生人单克隆抗体。使用小鼠骨髓瘤获取人单克隆抗体的尝试是不成功的，因为异种特异性杂交细胞快速丢失相关人类染色体。人们还尝试使用已知的分泌抗体的人骨髓瘤细胞系(例如分泌 IgE λ 的 U266 人骨髓瘤细胞系，以及包含类淋巴母细胞和浆母细胞的异质混合物的 RPMI-8226 细胞系(3))产生人单克隆抗体，但这些尝试都失败了，尽管早期报道是有希望的。

由于未曾成功获得产生人抗体的杂交瘤，因此人们已经考虑各种可替代的细胞系。例如，已经使用 EB 病毒(EBV)使产生抗体的人外周血 B 淋巴细胞无限增殖。然而，与产生小鼠单克隆抗体的杂交瘤相比，这样的细胞系有许多缺点。例如，它们往往生长不稳定、

抗体产量低,而且 EBV 并不优先使参与抗体反应的淋巴母细胞无限增殖(4)。

也已经发展出产生具有人类特征的单克隆抗体的策略,所述策略绕过对产生抗体的人类细胞系的需求。例如,通过连接啮齿动物可变区和人类恒定区,已经“人源化”有用的小鼠单克隆抗体(嵌合抗体)(13)。这在某种程度上降低所述抗体的人抗小鼠免疫原性,但由于外源 V-区框架的存在,仍然有残余的免疫原性。此外,其抗原结合特异性基本是小鼠供体的抗原结合特异性。CDR 嫁接和框架操作(EP 0239400)已经改进和改良抗体操作,达到可能产生人类药学应用可接受的人源化小鼠抗体的程度。然而,所述抗体特异性仍然由小鼠结合位点供体决定。此外,它们的产生涉及复杂的序列操作,并且费力繁重。

已经发展用于在体外产生人单克隆抗原结合片段的噬菌体展示技术,可以回收所述抗原结合片段的 V 基因并工程化进抗体基因,以产生单克隆抗体(14)。然而,通过该途径产生人单克隆抗体是复杂多步骤的方法,并且由于所述抗体是作为随机产生序列的组合的结果在体外工程化,因此所述抗体不象天然抗体一样接受体内亲和性成熟。

已经发展出包含人而不是小鼠免疫球蛋白基因的转基因小鼠品系(15)。该小鼠品系包含人类基因,产生人类抗体;然而,因为所产生的多样性并非在人宿主内选择,而是在小鼠宿主内选择,并且所述抗体在小鼠体内经受亲和性成熟,所以所述抗体并不是真正的人类抗体。

从分析的观点看,已知方法没有一种能够揭示人对特异性抗原攻击的免疫反应。在聚合酶链反应(PCR)扩增后直接分析重链和轻链的基因已经成为用于表征化人类在某些状况下所表达的抗体的可选方法。该方法的缺点是缺乏重链-轻链配对的信息。

用于产生单克隆抗体的小鼠杂交瘤方法有下面附加的好处(与上

述基于非杂交瘤的方法相比): 该方法能够优先使抗原激活的 B 细胞无限增殖, 由此长期产生单克隆抗体。

因此, 需要一种产生人单克隆抗体的方法, 该方法具有常规小鼠单克隆抗体产生方法的所有好处。

发明简述

本发明提供人骨髓瘤细胞系, 所述细胞系能够以类似于制备小鼠单克隆抗体的常规方法中使用的小鼠骨髓瘤的方式作用。因此, 本发明首次能够可靠产生真正的人杂交瘤和单克隆抗体。

因此, 本发明涉及能够使用标准技术与人淋巴细胞融合产生杂交细胞的人骨髓瘤细胞系, 所述标准技术例如聚乙二醇(PEG)融合方法、应用失活仙台病毒(2)或应用电融合方法(17)。本发明的发明人还发展出产生具有相当生长优势(即倍增时间比来自骨髓瘤患者的初级浆细胞培养物更短)的骨髓瘤细胞系的方法。

本发明的人骨髓瘤细胞系能够用作通用抗体产生细胞。例如, 通过用已知抗体基因转染所述骨髓瘤细胞系, 能够产生以前特征鉴定的抗体。因为所述骨髓瘤细胞所产生的翻译后蛋白可能与人抗体产生细胞所产生的蛋白相同, 所以所述骨髓瘤细胞系适于“生理性”抗体产生。

然而, 在一个优选实施方案中, 本发明的骨髓瘤细胞系用于产生人杂交瘤的方法, 所述人杂交瘤能够产生人单克隆抗体。因此, 本发明的其它方面涉及: 一种产生杂交瘤的方法, 所述方法包括将人骨髓瘤细胞系与人淋巴细胞融合的步骤; 一种通过所述方法产生的人杂交瘤细胞系; 一种由所述杂交瘤产生的人单克隆抗体。

本发明的杂交瘤产生方法可以用于无限增殖化产生在病理状况下由天然机体反应激发的人抗体。这使得能够随时间监控免疫反应, 同时提供抗体来源, 与通过其它方法制备的抗体相比, 所述抗体更可能用于治疗。对所述抗体特异性的分析能够用于提供在体内激发

所述抗体的疾病特异性抗原的信息。所述信息能够再用于设计基于抗原的治疗策略，例如改良疫苗。

附图简述

图 1: 定量两个杂交瘤的 IgG 分泌。707/164(o)和 707/100(●)。每个杂交瘤以 3×10^5 细胞/ml 的浓度接种在补充 10%胎牛血清的 RPMI-1640 生长培养基上。在指定间隔收集样品，用于通过免疫固定定量 IgG 和用于细胞计数。四天后，707/164 杂交瘤的细胞计数达到 8×10^5 细胞/ml，而 707/100 杂交瘤的细胞计数是 6×10^5 细胞/ml。此后，活细胞数目减少，第 10 天几乎所有细胞死亡，同时培养基中的 IgG 水平达到最高，即两种培养物的 IgG 都是 210 $\mu\text{g/ml}$ 。

图 2: 分析骨髓瘤 Karpas 707 细胞系和杂交瘤分泌的免疫球蛋白。所述细胞以 2×10^6 细胞/ml 的浓度培养在补充 10%透析的胎牛血清和 250 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S]甲硫氨酸和半胱氨酸(Amersham International)的 L-甲硫氨酸、L-半胱氨酸缺陷型培养基上培养。所述细胞在 CO_2 培养箱中在 37°C 下温育 8 小时。温育后，所述细胞悬浮液在 1000 g 离心 5 分钟。完全还原后通过十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分析上清。通过免疫固定确认放射标记的分泌 Ig 的成分。

组别:

- 1 骨髓瘤细胞产生的小量 κ 轻链
- 2 与 gp41 HIV-1 反应的 IgG，所述 gp41 HIV-1 由与 164 形成的杂交细胞产生。
- 3,4 通过将骨髓瘤细胞与新鲜白细胞融合形成的产生 IgG 的杂交瘤。
- 5,8,9,16 与扁桃腺细胞形成的产生 IgG 的杂交瘤。
- 6,7 仅分泌 κ 轻链的与扁桃腺细胞形成的两个杂交瘤。
- 10-12与新鲜扁桃腺细胞形成的杂交瘤所分泌的 IgM。带 12 指出该杂交瘤分泌两种轻链。

13 该杂交瘤看起来仅分泌两种轻链，因为它的重链 G 和 M 是阴性的。

14 具有两种轻链的 IgG，所述两种轻链由骨髓瘤和扁桃腺细胞之间的杂交细胞产生。

15 与扁桃腺细胞形成的仅分泌高水平轻链的杂交瘤。

图 3a 接近四倍体的 Karpas 707 细胞系的染色体核型。注意包含免疫球蛋白基因的染色体 2、14 和 22 是正常的并且是二倍体。

83, XX,-X,-X, del(1)(p11p36)x4, +del(1)(q11q44), -2, -2,
der(3)del(3)(p21p25)inv(3)
(q23q25), +del(3)(q13q21), der(5)t(1; 5)(p11; q31), der(5)t(2; 5)(q21;
q31),
del(5)(q13q33)x2, +add(5)(q31), -6, -6, add(7)(p25), del(8)(q22q24), -9,
del(11)(q23q25), -11, del(12)(p12p13), -13, -13, -14, -14, add(15)(p11)x2,
der(16)t(1; 16)(p11; p11), add(16)(p11)x2, -16, der(18)t(1; 18)(q23; p11),
add(18)(p11), add(18)(q23), -18, add(19)(q13)x2, +der(19)t(1; 19)(q11;
p13)
+der(19)t(dup(1)(q23q44); 19)(q11; p13), -21, -22, -22, +mar1x2, +mar2

b. 杂交瘤 Karpas 707/164 的核型，该杂交瘤接近六倍体，包含正常染色体对，这一点在第 1 染色体非常明显。

125, XXX,-X,-X,-X, del(1)(p11p36)x4, +del(1)(q11q44), -2, -2,
add(3)(p25),
der(3)del(3)(p21p25)inv(3)(q23q25), add(4)(q31), -4, der(5)t(1; 5)(p11;
q31),
der(5)t(2; 5)(q21; q31), del(5)(q13q33)x2, +add(5)(q31), del(6)(q21 q23)
-6, -6, add(7)(p25)x2, del(8)(q22q24), -9, del(11)(q23q25), -11,
del(12)(p12p13)x2, -13, -13, -14, -14, add(15)(p11)x2, der(16)t(1; 16)(p11;
p11),
add(16)(p11)x2, -16, der(18)t(1; 18)(q23; p11), add(18)(p11),

add(18)(q23),
-18, add(19)(q13)x2, +der(19)t(1; 19) (q11;p13),
+der(19)t(dup(1)(q23q44); 19)(q11; p13),
-21,-21,-22,-22, +mar1x2, +mar2

图 4: 骨髓瘤(a)和杂交瘤(b)的电子显微镜照片。与看起来并不包含可检测水平粗面内质网(RER)的骨髓瘤细胞的胞质相比, 杂交瘤的胞质被平行和同心 RER(类似浆细胞)占据。这些形态学观察与下面事实相关: 骨髓瘤产生低水平 κ 轻链, 杂交瘤分泌高水平 IgG。所述细胞在 3%戊二醛中固定, 超薄切片在乙酸双氧铀和柠檬酸铅中染色。

发明详述

第一方面, 本发明涉及一种人骨髓瘤细胞系, 所述细胞系适用于产生分泌人单克隆抗体的杂交瘤的方法。

可以从骨髓瘤患者(例如从所述患者的骨髓或外周血)获得的初级浆细胞培养物获得所述骨髓瘤细胞系。为发展纯系细胞系, 从所述患者获得的细胞在体外培养并扩增。

新发展的人骨髓瘤细胞系通常具有相对长的倍增时间, 例如约 70 小时。然而, 本发明的发明人吃惊地发现: 可通过体外培养所述细胞而产生生长快得多的细胞系。例如, 可降低倍增时间到约 35 小时或更低。

本发明骨髓瘤细胞系的倍增时间是体外培养物处理前的细胞系倍增时间的 0.75 倍以下, 最好 0.5 倍以下。本发明的骨髓瘤细胞系的倍增时间低于 50 小时, 优选低于 40 小时, 更优选约 30 小时。

为使用标准聚乙二醇(PEG)融合技术, 本发明的骨髓瘤细胞系可能对 PEG 有抗性。本发明的发明人发现: 99%的人骨髓瘤细胞在用 PEG 进行第一次处理进行淋巴细胞融合后被杀死。通过用 PEG 多个循环处理骨髓瘤细胞, 可以使所述细胞抗 PEG。本发明的发明人已

经发现：在二十个循环处理的区域产生其中仅 25% 的细胞被 PEG 处理杀死的细胞系。选择抗 PEG 的骨髓瘤细胞获得能够与人淋巴细胞融合产生本发明的人/人杂交瘤的细胞系。

在标准的产生分泌小鼠单克隆抗体的杂交瘤的方法中，融合细胞用次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷(HAT)培养基选择。小鼠骨髓瘤细胞是对 HAT 敏感，因为它们缺乏次黄嘌呤：鸟苷磷酸核糖基转移酶(HGPRT)，而杂交瘤细胞抗 HAT，因为脾细胞融合配体提供 HGPRT 基因。为使用同样的选择方法，本发明的骨髓瘤细胞系应当对 HAT 敏感。可以通过在 8-氮杂鸟嘌呤和/或 6-硫代鸟嘌呤或其它本领域内已知的选择剂中培养，选择 HAT 敏感性。本文所用术语“HAT 敏感”指在杂交瘤融合方法中，用 HAT 培养基处理导致优先杀死未融合的骨髓瘤，以便可以分离杂交瘤细胞。

所述骨髓瘤细胞系最好抗哇巴因(Quabain)，以便利细胞系或从组织(例如骨髓、扁桃腺、淋巴结、脾和恶性组织)分离的新鲜细胞进行融合和选择方法。通过将细胞在不断增加的 Ouabain 浓度中连续培养，可以使细胞抗 Ouabain。所获得的细胞系对 HAT 敏感并且抗 Ouabain。

已经发现具有生长优势的骨髓瘤细胞与倍增时间更长的骨髓瘤细胞相比，具有更多的染色体数目。本发明的骨髓瘤细胞可能染色体数目增加(异倍体(anuploid))，或者接近四倍体，并且可能有多种总染色体异常。然而，染色体 2、14 和 22 中的一个或多个(最好所有)可能正常和/或是二倍体。可以使用标准技术例如 G-带方法进行染色体分析。

本发明的发明人已经产生和表征倍增时间短、抗 PEG、抗 Ouabain 和对 HAT 敏感的人骨髓瘤细胞系(见实施例)。该细胞系称为“Karpas 707”，其样品已经保藏在 the ECACC, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG，保藏号为 00071108。

本发明的第二方面涉及产生骨髓瘤细胞系的方法。除选择生长优势、HAT 敏感性、Ouabain 抗性和/或 PEG 敏感性(如上述)的步骤

外,该方法还包括将标记引入所述细胞的步骤,所述标记能够赋予对除 HAT、Ouabain 和 PEG 外试剂的敏感性或抗性。所述一种标记或多种标记可以通过例如本领域内已知的遗传工程方法引入细胞。代表性标记有:产生可检测产物的酶,例如 β -半乳糖苷酶;赋予抗生素抗性或敏感性的蛋白;以及在某些情况下其存在致细胞死亡的基因(“自杀基因”),例如在丙氧鸟苷存在下导致细胞死亡的单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSVTK)。

本发明的第三方面涉及一种产生人杂交瘤细胞系的方法。可以通过与产生小鼠杂交瘤的常规方法类似的方法产生所述杂交瘤(7)。例如,使用例如标准 PEG 融合方法、失活仙台病毒或电融合方法,可以将本发明第一方面的骨髓瘤细胞系与人淋巴细胞融合。

可以通过本领域内已知的任何方法从未融合的细胞中选择出杂交细胞。例如,可以通过细胞分选(例如通过荧光激活的细胞分选(FACS))、使用磁珠或使用细胞毒性选择和/或分离杂交细胞。用于选择杂交细胞的常规小鼠方法涉及在培养基中培养融合后细胞,所述培养基中包含选择性杀死未与淋巴细胞融合的骨髓瘤细胞的化合物(例如 HAT)。随后可选地克隆所述杂交细胞,产生纯系杂交瘤细胞系。产生杂交瘤的通用方法是本领域内已知的。例如,可以使用下面方法:

在补充 2 mM L-谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠、100 单位/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的无血清 RPMI 1640 (RPMI)中形成来自免疫后个体的人淋巴细胞的单细胞悬浮液。所述细胞悬浮液通过无菌 70 目 Nitex 细胞滤器过滤,如下洗涤两次:在 200 g 离心 5 分钟,沉淀重悬浮于 20 ml 无血清 RPMI。

将 2×10^8 淋巴细胞与 4×10^7 骨髓瘤细胞(融合前在含 11%胎牛血清(FBS)的 RPMI 中保持在对数期达三天)混合,离心并吸出上清。移出细胞沉淀,在一分钟内边搅拌边加入 2 ml 37°C 的 PEG 1500 (在 75 mM HEPES, pH 8.0 中 50%),然后在七分钟内加入 14 ml 无血清

RPMI。可加入另外的 RPMI，然后细胞在 200 g 离心 10 分钟。弃去上清后，将沉淀重悬浮于含 15% FBS、100 mM 次黄嘌呤钠、0.4 mM 氨基蝶呤、16 mM 胸苷(HAT)、25 单位/ml IL-6 和 1.5×10^6 淋巴细胞/ml 的 200 ml RPMI 中。所述悬浮液以 200 μ l/孔分配到十个 96 孔平底组织培养板内。如下在融合后第 2、4 和 6 天饲喂细胞：用 18 G 针头从每孔吸出 100 μ l，然后加入 100 μ l/孔含或不含 10 U/ml IL-6 并且不含淋巴细胞的平板培养基。

当细胞生长达到 60-80 汇合后，从每孔取出培养物上清，通过 ELISA 筛选对所需抗原的反应性。可以如下进行 ELISA。用 50 mM 碳酸盐缓冲液，pH 9.6 中的 100 ng/孔抗原以 50 μ l/孔在 4℃下包被 Immulon 4 板。用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗板，然后在 37℃下用 0.5% 鱼皮明胶封闭 30 分钟。如上述洗板，然后加入 50 μ l 培养物上清。在 37℃温育 30 分钟后，加入 50 μ l 偶联辣根过氧化物酶的山羊抗人 IgG(fc) [在 PBST 中稀释 1:10,000]。在 37℃温育板 30 分钟，用 PBST 洗涤，然后加入 100 μ l 在 100 mM 柠檬酸，pH 4.5 中含 1 mg/ml TMB 和 0.15 ml/ml 30% H_2O_2 的底物。加入 50 ml 15% H_2SO_4 ，终止颜色反应。在读板仪上读出 A_{450} 。

术语淋巴细胞包括任何产生抗体的细胞。例如，淋巴细胞可以是淋巴母细胞，例如 EBV 转化的 B 细胞。所述淋巴细胞也可以是体外培养的细胞。或者，可以从人类受试者新鲜分离所述淋巴细胞。例如，可以从器官中分离所述淋巴细胞，所述器官例如扁桃腺以及淋巴结、脾、血液或骨髓。

人类受试者可能是健康个体，尤其是已经用特定抗原免疫的个体，或者已经患过特定疾病(已经从所述疾病康复)的个体。所述人类受试者或者可以是目前患有特定疾病的个体。因此，从所述人类受试者获得的淋巴细胞可能能够产生目的抗体。

依照本发明的骨髓瘤还可以与不产生抗体的淋巴细胞或产生淋巴因子的其它白细胞融合。尤其优选的是产生抗肿瘤抗体或具有治

疗用途的淋巴因子的肿瘤浸润细胞。如此获得的杂交瘤能够可靠地大量产生抗肿瘤抗体或淋巴因子。

本发明的杂交瘤产生方法以及用于产生分泌小鼠单克隆抗体的杂交瘤的常规方法的一个好处是：所述骨髓瘤细胞系优先与抗原激活的淋巴细胞融合。

本发明还提供一种杂交瘤细胞系以及所述细胞系产生的单克隆抗体。

本发明的杂交瘤最好产生高产量的抗体。例如，所述杂交瘤可能分泌多于 100 $\mu\text{g/ml}$ 的抗体，优选至少 200 $\mu\text{g/ml}$ 抗体，更优选至少 300 $\mu\text{g/ml}$ 抗体。

本发明的杂交瘤可能具有大量的粗面内质网(RER)。与骨髓瘤细胞的胞质(所述细胞并不包含可检测水平的粗面内质网)不同，本发明的发明人已经发现本发明的杂交瘤细胞的胞质表现为平行和同中心 RER(类似浆细胞)。本文中术语“大量的”用于指 RER 在所述杂交瘤中的水平与在浆细胞中发现的水平类似。

所述单克隆抗体可以是任何同种型：例如 IgG、IgM、IgD、IgA 或 IgE。它可以包含轻链、重链或二者都包括。

最好所述抗体可用于预防或治疗疾病。例如，假如从一位患者体内分离出一种疾病特异性的抗体产生细胞，那么可以用本发明的方法使所述细胞无限增殖，以便大量产生所述抗体。可以将所述抗体以被动免疫的方法给予患者，赋予对所述疾病的抗性。或者，可以将所述抗体给予患有所述疾病的患者，以增强免疫反应并帮助清除感染。可用各种白细胞衍生出的杂交瘤会产生一系列治疗用体液因子。

按照本发明的方法产生的人单克隆抗体基本上可以用于任何涉及配体-多肽结合的工艺，包括体内治疗和预防应用、体外和体内诊断应用、体外测定和试剂应用等。例如，抗体分子可以根据本领域内技术人员已知的方法用于基于抗体的测定技术，例如 ELISA 技术。

如上文所提到的, 根据本发明产生的抗体可用于诊断、预防和治疗方法。例如, 按照本发明产生的抗体可在诊断上用于凝集作用、ELISA、免疫过氧化物酶、蛋白质印迹和通过标准免疫组织化学方法的原位蛋白检测。为在这些应用中使用, 所述抗体可以按照本领域内已知的技术标记。此外, 所述抗体当络合到层析支持物如树脂上后可以制备性用于亲和层析方法。所有这些技术对于本领域内技术人员是众所周知的。

按照本发明制备的抗体的治疗和预防应用涉及给予接受者或患者所述抗体。

优选给予患者具有至少 90 到 95% 同质性的基本纯的抗体, 而对于药学应用最优选 98 到 99% 或更高同质性。一旦如所需部分纯化或纯化所选定的抗体到同质性后, 所述抗体就可以应用在诊断或治疗上(包括在体外应用), 或者用于发展和实施测定方法、免疫荧光染色等(Lefkovite 和 Pernis, (1979 和 1981) *Immunological Methods*, 第 I 卷和第 II 卷, Academic Press, NY)。

本发明的抗体一般可用于预防、抑制或治疗炎症状态、变应性过敏、癌症、细菌感染或病毒感染以及自身免疫疾病(包括但不限于 I 型糖尿病、多发性硬化、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、节段性回肠炎和重症肌无力)。

在本申请中, 术语“预防”涉及在疾病入侵前给予保护性组合物。“抑制”指在诱发事件后但疾病临床出现前给予所述组合物。

“治疗”涉及在疾病症状表现后给予所述保护性组合物。

目前有可用于筛选抗体保护或治疗疾病的有效性的动物模型系统。在易感小鼠体内测定系统性红斑狼疮(SLE)的方法是本领域内已知的(Knight 等(1978) *J. Exp. Med.*, 147: 1653; Reinersten 等(1978) *New Eng. J. Med.*, 299: 515)。如下在 SJL/J 雌性小鼠体内测试重症肌无力(MG): 用来自另一物种的可溶性 AchR 蛋白诱导所述疾病(Lindstrom 等(1988) *Adv. Immunol.*, 42: 233)。在小鼠易感品系体内通过注射 II 型

胶原蛋白诱导关节炎(Stuart 等(1984) *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233)。已经描述通过注射分枝杆菌热休克蛋白在易感大鼠中诱导佐剂关节炎的模型(Van Eden 等(1988) *Nature*, 331: 171)。如所述通过给予甲状腺球蛋白在小鼠中诱导甲状腺炎(Maron 等(1980) *J. Exp. Med.*, 152: 1115)。胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)自然发生或者可以在某些小鼠品系中诱导, 例如 Kanasawa 等(1984) *Diabetologia*, 27: 113 所述的品系。小鼠和大鼠中的 EAE 作为人类 MS 的模型。在该模型中, 通过给予髓磷脂碱性蛋白诱导脱髓鞘疾病(见 Paterson (1986) *Textbook of Immunopathology*, Mischer 等编辑, Grune 和 Stratton, New York, 第 179-213 页; McFarlin 等(1973) *Science*, 179: 478; 和 Satoh 等(1987) *J. Immunol.*, 138: 179)。

本发明的抗体也可以与其它抗体联合应用, 尤其是与人类疾病相关性细胞上的其它标记反应的人单克隆抗体(Mab)。例如, 合适的 T 细胞标记可以包括那些分类为所谓“分化簇”的标记, “分化簇”由 First International Leukocyte Differentiation Workshop 命名(Bernhard 等(1984) *Leukocyte Typing*, Springer Verlag, NY)。

一般地说, 本发明的抗体将以纯化形式与药学上合适的载体一起应用。通常所述载体包括水溶液或醇/水溶液、乳浊液或悬浮液, 均包含盐水和/或缓冲介质。胃肠外媒介物包括氯化钠溶液、Ringer 葡萄糖、葡萄糖和氯化钠以及乳酸化 Ringer's。如果需要保持多肽复合物为悬浮液, 那么合适的生理学上可接受的佐剂可以选自增稠剂例如羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、明胶和藻酸盐。

静脉内媒介物包括液体和营养补充物以及电解补充物, 如那些基于 Ringer 葡萄糖的补充物。也可以存在防腐剂和其它添加剂, 例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体(Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 16 版)。

本发明的抗体可以用作单独给予的组合物或与其它试剂联合给予。这些可以包括各种免疫治疗药物, 例如环孢菌素、氮甲蝶呤、

阿霉素或顺铂(cisplatinum)以及免疫毒素。药用组合物可以包括各种细胞毒剂或其它试剂与本发明选定抗体、其受体或结合蛋白组成的“混合物”，或者甚至与依照本发明具有不同特异性的选定多肽的组合，例如使用不同靶配体选出的多肽，而不论它们在给予前是否混合。

依照本发明的药用组合物的给药途径可以是本领域内一般技术人员众所周知的途径中的任何一种。为进行治疗，包括但不限于免疫治疗，可以按照标准技术将本发明的抗体给予任何患者。所述给药可以通过任何合适模式，包括胃肠外、静脉内、肌内、腹膜内、经皮、通过肺途径，或者如果合适，通过导管直接灌输。给药剂量和频率将取决于患者的年龄、性别和病况、其它药物的同时给予、禁忌以及临床医师考虑的其它参数。

本发明的抗体可以冻干保存并在使用前用合适载体重建。已经显示该技术对于常规免疫球蛋白有效，并且可以利用本领域内已知的冻干和重建技术。本领域内技术人员将认识到冻干和重建可能导致不同程度的抗体活性损失(如使用常规免疫球蛋白时，IgM 抗体比IgG 抗体损失更多活性)，需要上调使用水平以进行补偿。

可以给予包含本发明抗体或其混合物的组合物以进行预防性和/或治疗性治疗。在某些治疗应用中，成功使选定细胞群至少部分抑制、遏制、调节、杀死或达到某些其它可测量参数的足够量被定义为“治疗有效量”。需要达到该剂量的用量将取决于疾病的严重性以及患者自身免疫系统的一般状态，但一般范围从 0.005 到 5.0 mg 抗体每公斤体重，更通常使用 0.05 到 2.0 mg/kg/剂的剂量。为进行预防应用，包含本发明选定多肽或其混合物的组合物也可以以相似剂量或稍低剂量给予。

可以在预防和治疗中利用包含依照本发明抗体的组合物，以帮助在哺乳动物体内改变、失活、杀死或除去选定靶细胞群。此外，本文所述抗体可以在体外应用或在体外从细胞的异质收集物中杀

死、排除或有效除去靶细胞群体。可以将来自哺乳动物的血液在体外与选定抗体、其细胞表面受体或结合蛋白混合，由此从所述血液中杀死或除去不需要的细胞，然后按照标准技术将所述血液输回所述哺乳动物。

也可以利用从患者体内抗体产生细胞产生无限量特定抗体的能力来获得关于免疫反应的有价值信息。例如，假如患者患有疾病，就有可能推导免疫系统所靶向的疾病特异性抗原。可以利用该信息设计更好药物和疫苗以治疗和/或预防所述疾病。

几乎每种疾病都产生抗体介导的免疫反应，因此是抗体疗法的预防/治疗的候选者。本发明的方法对于无限产生受到病理状况天然防御性反应激发的人类抗体是无价的。然而，最感兴趣的是应用本发明的方法无限增殖化肿瘤浸润淋巴细胞。这可能产生有用的抗癌抗体，同时发现肿瘤特异性抗原。所述抗原可以反过来用作抗癌疫苗。

通过分析在不同时间产生的抗体，有可能作出对抗原攻击的免疫反应的时间图。这可以为特定治疗策略或接种方法提供关于最佳时间的有价值信息。

在本发明的另一方面中，提供下面应用：通过用产生抗体的基因转染依照本发明第一方面的人骨髓瘤细胞，应用所述细胞产生抗体。所述人骨髓瘤细胞产生的翻译后修饰与在人抗体内形成的翻译后修饰相同。因此，为进行生物技术产生，所述人骨髓瘤系优选不仅通过人杂交瘤产生抗体，而且通过用已知抗体基因转染来产生抗体。

也可以应用本发明的人杂交瘤细胞系选择也是 HAT 敏感性的突变体，筛选方法与小鼠 Sp2/0-Ag14 与另一种淋巴细胞融合后发展成为杂种杂交瘤(16)的筛选方法相同。尤其是对于使用本发明的产生低/无法检测水平但具有高水平 RER 的骨髓瘤细胞系产生的杂交瘤，可以根据与能够产生目的抗体的第二种淋巴细胞的融合进行选择。使

用该方法，可以产生能够分泌高滴度所需抗体的杂种杂交瘤。

下面实施例用于举例说明本发明，而不应当视为本发明的限制。本发明尤其涉及在这些实施例中描述的特定实施方案。

实施例

实施例 1 – 产生改良的人骨髓瘤细胞系

本发明的发明人已经尝试发展新型人骨髓瘤细胞系超过二十年。本发明的发明人以前已经描述从一名诊断患有多发性骨髓瘤的 53 岁男性患者的骨髓和外周血发展出的骨髓瘤细胞系(5,6)。由于该细胞系目前仅分泌κ轻链，因此它对于也产生重链的骨髓瘤细胞系有潜在的实际应用优势。

选择具有生长优势的骨髓瘤细胞

分离后该骨髓瘤细胞系的倍增时间超过 70 小时，但持续在体外培养许多个月后，出现了一种生长更快的细胞，其倍增时间约 30-40 小时，在静置培养时吸附玻璃或塑料表面的趋势增加。采取与用于产生杂交瘤的小鼠骨髓瘤细胞相似的方式，可以容易地通过剧烈吸打使吸附细胞解吸附。

选择 HAT 敏感性和 Ouabain 抗性

制造小鼠杂交瘤的常规方法基于以下事实：未融合的小鼠骨髓瘤细胞对次黄嘌呤、氨甲蝶呤、胸苷(HAT)敏感。为选择对(HAT)敏感的人骨髓瘤细胞，将它们在 8-氮杂鸟嘌呤中培养。以 30 μg/ml 浓度培养的抗氮杂鸟嘌呤细胞随后用 30 μg/ml 2-氨基-6-巯基嘌呤 (6-硫代鸟嘌呤)处理。测试长出的头二十个集落对 HAT 培养基的敏感性。选择看起来未产生任何抗性的生长最快的集落进行进一步的工作。为了能够使所述骨髓瘤细胞也与抗体产生细胞系融合，决定还选择抗 Ouabain 亚系。用浓度逐渐增加的 Ouabain 培养所述骨髓瘤细胞，

导致出现对 HAT 敏感、抗 Ouabain 的亚系。

实施例 2—产生人杂交瘤

为优化形成杂交瘤的条件和筛选，本发明的发明人决定发展(用于首次融合)具有已知特异性的抗体产生人 B 细胞淋巴细胞。因此用 EBV 感染来自健康的感染 HIV-1 的个体的外周血淋巴细胞。在 EBV 无限增殖化的 B 细胞中，选择并克隆产生针对 HIV-1 gp41 的单克隆抗体的细胞，所述细胞被称为 Karpas 164 细胞系。随后本发明的发明人尝试用不同分子量的聚乙二醇(PEG)使所述骨髓瘤细胞与所述 EBV 无限增殖化的人淋巴细胞融合，但未成功。

为试图研究发展杂交细胞重复失败的原因，用 PEG 按细胞融合所用的同样方法单独处理所述骨髓瘤细胞。此后，将细胞接种在不含 HAT 或 Ouabain 的生长培养基中，检查生活力。对 PEG 处理细胞的检查揭示：PEG 高度有毒，杀死超过 99% 的细胞。

产生抗 PEG 的亚系

考虑到上面发现，本发明的发明人决定尝试和发展一种抗 PEG 的亚系。这可以如下完成：用 PEG (1500MW)根据用于形成小鼠杂交瘤的方法处理约 10^7 骨髓瘤细胞。最后长出的少数生活细胞再次用 PEG 处理。在约 18 个月内重复所述处理循环超过二十次，然后出现一个骨髓瘤亚系，该亚系仅有四分之一的细胞被 PEG 处理杀死。然而，在此过程中再次出现抗 HAT 的细胞。因此所述细胞用 8-氮杂鸟嘌呤再处理一次并克隆。分离出一个在 HAT 培养基中培养未发生回复的集落。该细胞系被称为骨髓瘤 Karpas 707 细胞系，已经将该细胞系的样品保藏起来，保藏号为 ECACC 00071108。

与 EBV 无限增殖化的淋巴细胞融合

然后使用标准 PEG 融合方法(7)，使所述 HAT 敏感、抗 PEG 的细胞与 EBV 无限增殖化的产生针对 gp41 的单克隆抗体的人 B-淋巴

细胞 164 细胞融合。细胞悬浮液接种在多孔塑料板上。在 HAT 和 Ouabain 存在下培养后，生长出类似骨髓瘤细胞系的集落。在针对抗病毒抗体的 Karpas AIDS 细胞测试(8)中，组织培养液显示丙酮固定的 HIV-1 感染的 Karpas 45 T 细胞的膜的强烈染色。

表征所述杂交瘤产生的人单克隆抗体

使用 HIV-1 gp41 几种多肽的进一步研究使我们明确以下事实：我们的单克隆抗体针对肽 LAVERYLKDQQLGIWG 反应，但不能针对 HIV-1 gp41 的其它肽反应(结果未显示)。该单克隆抗体识别的表位看起来在 HIV-1 的非洲 NDK 株(9)中并不存在，因为所述抗体不与 NDK 感染的 T 细胞反应，而是不仅与 HIV-1 的 Cambridge 分离物(10)反应，而且与早期 French LAV 分离物(11)反应。数据库搜寻证实：HIV-1 的 French (LAV)和 British (CAM1)分离物具有共同的上述氨基酸序列，而 African 分离物包含一个赖氨酸到精氨酸的突变。

与新鲜人淋巴细胞融合

在与 164 细胞系成功融合后，本发明的发明人决定研究清楚它们的骨髓瘤细胞是否也与新鲜人淋巴细胞形成产生抗体的杂交瘤。他们将所述骨髓瘤细胞与来自一名成人外周血的未分级分离白细胞(WBC)融合，并且将所述骨髓瘤细胞与来自两名儿童手术切除的扁桃腺制备的扁桃腺细胞融合。PEG 融合后获得的细胞悬浮液接种在 24 孔和 96 孔塑料组织培养板中，并首先在补充 20%胎牛血清和 HAT 的 RPMI-1640 培养基中培养 12 天。然后使用单独的生长培养基，当所述骨髓瘤细胞与扁桃腺细胞融合时，在随后 2-3 周内约 25%孔中观察到集落形成，当所述骨髓瘤细胞与血液 WBC 融合时，2-3 周后在约 10%孔中观察到集落形成。通过 ELISA 分析从有活性细胞生长的孔中收集的组织培养液中 IgG 的存在。在该方法中，在塑料孔中使用蛋白 A 捕获所述新形成的杂交瘤产生的 IgG 单克隆抗体。从超

过 100 个孔收集的组织液包含 IgG。

目前，本发明的发明人已经从与外周血淋巴细胞的融合中发展超过 20 个独立的分泌 IgG 的杂交细胞，从与扁桃腺细胞的融合中发展超过 100 个产生抗体的杂交细胞。

实施例 3 - 表征人骨髓瘤细胞系和杂交瘤

杂交瘤的形态学分析

许多长出细胞的生长模式各不相同。当在静置培养中时，骨髓瘤细胞以贴壁细胞的统一模式生长，形成覆盖塑料表面的不规则镶嵌，同时不断释放细胞进入培养液。当在滚瓶中培养时，大多数细胞在悬浮液中保持为不同大小的细胞簇。一些杂交细胞的生长类似亲本骨髓瘤细胞，但许多其它杂交细胞获得不同的形态学和生长形式。在静置培养物中，一些杂交瘤附着到塑料表面，呈现许多厚但短的纺锤、矩形和三角形。其它杂交瘤细胞主要在悬浮液中以单细胞或簇的形式存在。

对所培养的骨髓瘤的超微结构检查揭示：与在培养第一年内包含大量粗面内质网(RER)的细胞(5)不同，所述细胞在长期体外培养后损失大部分 RER。然而，对两个杂交瘤 707/164 和 707/105 (与血液 B 细胞形成)的检查揭示：在两种情况下所述杂交细胞都类似浆细胞(图 4)。大部分胞质被平行和同心 RER 占据，而潴泡的膨胀程度在细胞之间各不相同。RER 的内容物看起来是细微的颗粒状物质，可能是免疫球蛋白。在大部分切片中可以看到大量线粒体，而通过高尔基体区域的切片揭示高度发达的细胞器。由于对 EBV 无限增殖化的 164 B 细胞的超微结构检查揭示仅有少量短和薄的 RER 束，因此提出融合的淋巴母细胞在某种程度上激活潜伏的骨髓瘤 RER 产生 Ig 并不是没有道理的。

骨髓瘤细胞系的染色体分析

为证实产生抗体的细胞确实是骨髓瘤和人淋巴细胞的杂交细胞,制备细胞培养物,使用 Czepulkowski 等(12)描述的 G 带方法进行染色体分析。在早期,发现所培养的骨髓瘤细胞(象新鲜的患者细胞)是亚二倍体,其 45 条染色体包含几个染色体异常(5)。然而,发现具有选择性生长优势(多轮体外培养循环后)和 PEG 抗性增加的骨髓瘤细胞接近四倍体,包含许多并且不寻常大数量的总染色体异常。事实上在 23 个染色体中 13 个是异常的。核型分析揭示:存在 5 个拷贝的染色体 1 和 3 个标记染色体,其中染色体 1 的 5 个拷贝都比正常情况短。有趣的是,注意到染色体 2、14 和 22 (它们包含免疫球蛋白基因)是正常的并且是二倍体。

为明确 PEG 处理的重复循环是否诱导这些染色体核型异常,对 PEG 处理前冻存细胞的染色体也进行分析。分析揭示:所有这些变化在 PEG 处理前都已存在。因此,看起来在许多个月的连续体外培养和用 8-氮杂鸟嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、HAT 和 Ouabain 处理后,出现与亚二倍体骨髓瘤细胞相比有生长优势的接近四倍体的细胞系。

杂交瘤细胞系的染色体分析

对与 164 细胞形成的杂交瘤的核型分析揭示:所述细胞接近六倍体,包含所述骨髓瘤细胞接近四倍体的染色体和来自淋巴母细胞的正常染色体。

对产生针对 HIV-1 gp41 的单克隆抗体的 EBV 转化淋巴母细胞(Karpas 164 系)的核型分析显示:约 10%所述细胞呈现 t(1;16)(p11;q10) 转位,该转位类似于在所述骨髓瘤细胞系中发现的转位。这可能是由长期体外培养引起的。

IgG 产生分析

至于 IgG 产生的量,对所述 EBV 感染的淋巴母细胞和所述杂交

细胞(707/164)进行的 HIV-1 gp41 抗体分泌的比较测定揭示：在相同条件下培养同样数目细胞($10^6/\text{ml}$)后，所述杂交瘤产生抗体至少是所述淋巴母细胞的八倍。准确地说，培养四天后，杂交细胞 707/164 分泌 $470\text{ }\mu\text{g/ml}$ IgG，而 164 细胞分泌的量低于 $70\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的测定检测水平。由于两种细胞培养物具有抗体合成的相同遗传信息，因此清楚的是本发明的杂交瘤细胞在抗体产生上远远更有效。

对免疫球蛋白分泌的测试证实：所述骨髓瘤细胞仅产生小量轻链。与扁桃腺细胞的融合细胞以及与血液淋巴细胞的融合细胞产生分泌 IgG 和 IgM 的集落。其中一个与扁桃腺细胞形成的杂交细胞仅产生轻链($\lambda + \kappa$)。所述 Ig 产生的多样性提示：所述骨髓瘤细胞系能够与大多数(如果不是所有范围)的抗体产生细胞形成杂交瘤。事实上，本发明的发明人已经发现：与本文所述骨髓瘤细胞系形成的杂交瘤在抗体产生上比小鼠杂交瘤远远更有效(明确的说，分泌抗 HIV-1 gp41 抗体的杂交瘤产生 $470\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的 IgG，而与血液淋巴细胞融合后形成的杂交瘤产生 $210\text{ }\mu\text{g/ml}$ 和 $150\text{ }\mu\text{g/ml}$ IgG)。这与以下事实相关：与小鼠杂交瘤中稀少的粗面内质网(RER)相比，在人杂交瘤中存在大量 RER。

不偏离本发明范围和精神对本发明所述方法和系统的各种修改和变化对于本领域内技术人员是显而易见的。虽然已经结合特定优选实施方案描述本发明，但应当理解所要求保护的本发明不应当不适当地受到所述特定实施方案的限制。事实上，对化学和生物或相关领域内技术人员显而易见的所述实施本发明的模式的各种修改将包括在本发明内。上面说明书中提到的所有出版物都通过引用结合到本文中。

参考文献

1. Cotton, R. G. H.和 Milstein, C. *Nature* 244, 42-43 (1973).
2. Kohler, G.和 Milstein, C. *Nature* 256, 495-497 (1975).
3. Nilsson, K. *Int. J. Cancer* 7, 380-396 (1971).
4. Roder, J. C., Cole, S. P. C.和 Kozbor, D. *Meth Enzym.* 121, 140-167 (1989).
5. Karpas, A., Fisher, P., Swirsky, D. *Science* 216, 997-999 (1982).
6. Karpas, A., Fisher, P., Swirsky, D. *Lancet* i, 931-933 (1982).
7. Galfre, G. & Milstein, C. *Meth. Enzymology*, 7B, 3-46 (1981).
8. Karpas, A., Gilson, W., Bevan, P. C., Oates, J. K. *Lancet* ii, 695-697 (1985).
9. Ellrodt, A.等 *Lancet* i, 1383-1385 (1984).
10. Karpas, A. *Mole. Biol. Med.* 1, 457-459 (1983).
11. Barre-Sinoussi, F.等 *Science* 220, 868-871 (1983).
12. Czepulkowski, B. H., Bhatt, B., Rooney, D. E. 于 *Human cytogenetics: A practical approach*. 第2卷, IRL Press, Oxford University Press (1992).
13. Winter, G.和 Milstein, C. *Nature* 349, 293-299 (1991).
14. Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E.和 Hoogenboom, H. *R. Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455 (1994).
15. Bruggemann, M.和 Neuberger, M. S. *Immunol. Today* 17, 391-397 (1996).
16. Shulman 等 *Nature* 276, 269-270 (1978).
17. Panova & Gustafsson, (1995) *Hybridoma* 14, 3, 265-269.