

综述

杂交瘤细胞的无血清培养

杜世或

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨)

细胞融合和杂交技术, 同 DNA 重组技术一样, 是生物工程领域中的重大突破。自从杂交瘤技术问世以来^[1], 此技术在生产人们所期望的 McAb (单克隆抗体) 方面一直在不断发展。

近几年, McAb 的主要商业价值是诊断药盒的生产, 用于检查生物系统中的特异性物质, 例如, 妊娠检查、传染病的检验及其他高需要量的应用。至于在对病原细胞的选择性攻击 (如, 免疫毒素)、在为生产有高商业价值的高纯度制品的亲合系统、甚至在植物疾病的诊断^[2]等当中 McAb 的潜在性应用正在引起人们的注意。McAb 的广泛应用使其大规模生产成为必要。McAb 可以通过杂交瘤细胞体内和体外两种培养途径来生产。目前通常是采用体内法, McAb 是从杂交瘤细胞生长在组织相容性动物 (小鼠) 腹腔中所产生的腹水中获得的。在这样的腹水中可达到高的杂交瘤细胞密度和相当高的抗体含量 (1mg/ml)。然而, 按大规模生产的观点来看, 这样的产品是不纯的; 所能收集的腹水量毕竟是有限, 须养大量的小鼠; 更重要的是, 人类杂交瘤细胞不可能在体内培养。因此有理由相信, 体外培养法大规模生产 McAb 也将兴起。

体外培养系统是令人关注的研究领域, 它们将显著地左右 McAb 的生产。至今已有不少人致力于发展体外大规模培养哺乳动物细胞的培养系统的研究^[3-6]。为产 McAb 的细胞培养的专门技术包括中空纤维膜系统 (Hollow fibre membrane systems)、细胞恒化器 (Cytostat)、气液反应器 (Air-lift fermenter) 及琼脂糖微珠 (Agarose microbeads) 等等。无论那种技术都应该考虑提供尽可能简化的在细胞微环境中 pH、溶解氧、温度、葡萄糖和氨基酸的消耗

及乳酸形成等重要参数的监测和控制系统。科学家们也应该留心细胞克隆本身的遗传稳定性、应熟知其特定的 S 生长曲线、营养需求及生长调节机制。

为了扩大 McAb 商业性生产, 其体外培养基组份成为最关键的问题之一。其他的问题主要与培养系统有关, 如, 氧传输的受限性、有毒废物的累积、在过程控制中调节用软件和硬件的缺乏等等。本文主要涉猎有关杂交瘤无血清培养的资料。

(一) 无血清培养基的发展

众所周知, 在体外培养的所有类型的杂交瘤细胞的生长培养基中需要有胚胎或新生哺乳动物的血清, 如, 胎牛血清。这不仅需要高的花费, 而且胎牛血清的供给是有限的。由于它含有 152 种之多的蛋白质, 给 McAb 的纯化带来麻烦。此外, 它还有一些未确定的复杂成分及质量上的不恒定性使实验结果的分析复杂化。因此, 某些实验室试图从培养基中取消血清而寻找变通方式取而代之。然而, 血清是很复杂的混合物并有多功能, 当血清从培养基中省去的时候, 必须找到具有这些功能的替代物。因此, 并不奇怪, 要找到这种替代物确实是困难的。

Ham 实验室^[7]和 Iscove 实验室^[8]先成功地建立和发展了在无血清或减少了血清的培养基中培养哺乳动物细胞的方法。Sato^[9]实验室另辟途径。他们的考虑是基于血清的主要功能之一是供给激素和生长因子的混合物刺激细胞生长这一概念。该实验室为各种类型的细胞系设计了多种激素、营养物及纯蛋白的各种各样的组合以代替血清。近年, 已有越来越多的研究者关注这

本文于 1988 年 5 月 16 日收到。

个实践性的论题。一些实验室已发展了替代培养基中血清的方法培养杂交瘤细胞。

1. 含有大豆类脂的无血清培养基: Iscove's 无血清培养基首先被成功地应用到杂交瘤细胞培养上^[8,10]。它是Dulbecco修改的 Eagle's 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) 又进一步被 Iscove 修改的培养基 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM) 作为基础培养基, 在生长培养基中省掉胎牛血清而加特殊制备的大豆类脂系列、牛血清白蛋白及转铁蛋白。大量培养杂交瘤到培养基耗竭时 Ig 可达 $500\mu\text{g}$ — 1mg/ml 。为在细胞恒化器中培养杂交瘤细胞, Fäzekas de St. Groth 和 Scheidegger^[11,12] 发展和丰富了 Iscove's 配方, 附加了氨基酸、维生素、胱氨酸、转铁蛋白、大豆类脂等系列及牛血清白蛋白。其他研究者也利用了大豆类脂作为无血清培养基中的必要成分^[13,14]。

2. 含有酪蛋白的无血清培养基: Darfler 等^[15,16] 已报道一种无血清培养基, 它是 Ham's F₁₂ 和 DMEM (1:1) 的混合物并补充有酪蛋白、胰岛素、转铁蛋白、睾酮及亚油酸 (CITTL), 有效地支持了 T-淋巴细胞瘤、正常 T 细胞和杂交瘤等多种细胞的生长。某些杂交瘤细胞系在 CITTL 培养基中制造的 McAb 可以同在含血清的生长培养基中产生的抗体量相比较。

3. 化学限定性无血清培养基: Chang 等^[17] 报告了某些杂交瘤细胞系在一简单的无血清培养基中成功地生长了三个多月, 所分泌的 McAb 在量上可以同在含胎牛血清培养基中所产生的相比拟。此培养基是由 RPMI 或 MEM、胰岛素、转铁蛋白及 1% 非必需的氨基酸构成的。Murakami 等^[18] 设计了化学限定无血清培养基, 它是 Ham's F₁₂ 和 DMEM (1:1) 的混合物并加有化学补充物——胰岛素、转铁蛋白、乙醇胺及亚硒酸钠 (ITES)。杂交瘤细胞 MPC11-BL 长期培养在此化学限定培养基中几乎接近在含血清培养基中所观察到的生长速率。他们也观察了如象松弛素、催乳激素、ACTH、生长激素等激素的作用。特别有趣的是, 此杂交瘤表现出与其亲代浆细胞瘤有不同的需求。浆细胞瘤细胞系绝对不需要胰岛素。由骨髓瘤 NS₁ 诱导来的杂交瘤在

ITES 培养基中生长得不好。Kawamoto 等^[19] 描述了 RPMI₁₆₄₀、DMEM 和 Ham's F₁₂ 成 2:1:1 的混合并补充了胰岛素、转铁蛋白、 α -氨基乙醇、 α -巯基乙醇、亚硒酸钠、低密度脂蛋白 (LDL), 油酸和不含脂肪酸的牛血清白蛋白的无血清培养基。产抗体的杂交瘤细胞的产量在此无血清培养基中和在供血清的培养基中是相似的。此现象被解释为 NS₁ 细胞对 LDL 和油酸或亚油酸的需求^[20]。近来, 相似的培养基已用来连续生产由人-鼠杂交瘤产生的 McAb, 这种杂交瘤细胞通过藻酸钙固定化并在反应器中培养 40 日之久^[21]。Kovar 和 Franek^[22,23] 也利用 RPMI₁₆₄₀ 作为基础培养基并补充有乙醇胺、转铁蛋白、胰岛素、亚油酸、血清白蛋白、抗坏血酸、氢化可的松及如象硒、锰等 12 种微量元素。此培养基适合长期培养杂交瘤细胞而且不中断 McAb 的产生。他们系统地研究了各个成分的作用。

4. 无蛋白的培养基: 为使 McAb 的纯化更为容易, Cleveland^[14] 报告了一种没利用血清、血清蛋白或蛋白脂体的化学限定培养基。此种无蛋白培养基是由 Ham's F₁₂ 和 IMDM (1:1) 基础培养基、 α -硫代甘油、黄体酮、及特别加有两组微量元素的混合物组成的。在 Kovar 和 Franek^[24] 所报告的化学限定性无蛋白培养基中高浓度可溶性铁化合物 ($50\mu\text{mol/L}$ — 5mmol/L) 能使杂交瘤生长和产生 McAb。

5. 含有血清低分子量成分的“无血清”培养基: 已有报道, 杂交瘤细胞能在通过透析袋培养法补充排阻了胎牛血清的 10000 以上道尔顿物质的生长培养基中^[25] 或在排阻分子量 50000 道尔顿的人工微管培养系统 (Artificial capillary culture system) 中^[26,27] 生长。近来, Kitano 等人^[28] 报道, 分泌人 McAb 的鼠-人-人杂交瘤于含有 55—70% 饱和硫酸铵沉降的成牛血清部分以及乙醇胺、胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠的培养基中可成功地生长。笔者 (待发表的资料) 利用成牛血清超滤液作为生长培养基的成分加到基础培养基 RPMI₁₆₄₀ 或 IMDM 与 Ham's F₁₂ (1:1) 的混合液中, 再补充以转铁蛋白、乙醇胺、胰岛素和亚硒酸钠, 培养杂交瘤细胞。培养在如此培养基中最高细胞密度可以达到甚至超过

培养在含血清的标准生长培养基中的最高细胞密度。我们的结果表明, Klinman^[29] 关于成年动物血清超滤液不支持杂交瘤生长的结论是不妥的。

(二) 无血清培养基中主要补充物的功能

利用于杂交瘤培养的基础培养基是以平衡盐溶液为基础, 然后将专门的营养物质、维生素、激素、生长因子及微量元素加入其中。对于含血清的培养基, 胎牛或新生牛血清总是被优先选用, 这是由于它只存有少量免疫球蛋白, 却存有刺激细胞分裂的有丝分裂原和生长因子。一般说来, 平衡盐溶液(BSS) 提供无机离子以维持培养基生理上的 pH(7.2) 和渗透压。葡萄糖和谷氨酰胺被引述为最常用的生长限制因子。葡萄糖作为能源供给所培养的细胞。谷氨酰胺作为中心代谢物涉及许多代谢途径而关联到细胞生长、能源、氨基酸摄取、葡萄糖利用、蛋白质的转换、氨基供体^[30]。某些营养物的相对浓度是重要的, 例如, 葡萄糖和谷氨酰胺的比率, 但是它有一个 0.6—6.0 的宽范围^[31]。

综前所述, 人们不难发现, 为培养杂交瘤细胞, 代替血清的合成混合物至少应含有四个必需的成分: 乙醇胺、转铁蛋白、胰岛素及亚硒酸钠, 其次是氯化可的松或睾酮、亚油酸、抗坏血酸及白蛋白等。尚有未确定的因素有待研究。

1. 乙醇胺: 这是杂交瘤细胞的必需生长因子。Murakami 等^[18] 指出, 带有 $20\mu\text{mol/L}$ 乙醇胺和带有 $200\mu\text{mol/L}$ 磷酸乙醇胺的无血清培养基同样程度地刺激杂交瘤 MPC₁₁-BL 系的生长。这意味着磷酸乙醇胺在为细胞摄入前转化成乙醇胺。已有资料表明, 外源性的乙醇胺或磷酸乙醇胺能够显著地改变大鼠乳房癌细胞原生质膜上磷脂酰乙醇胺的含量^[32]。乙醇胺在无血清培养基中的浓度在 $20—50\mu\text{mol/L}$ 被认为是适宜的。在较高的浓度时其生长刺激效应减弱, 可能是由于产生了毒性的缘故^[22, 23], 随后的研究者们大都采用了 $20\mu\text{mol/L}$ 乙醇胺这一最适浓度。Ethier 的报告认为乙醇胺在减少大鼠乳腺上皮细胞对 FBS(胎牛血清) 的需求上是有作用的^[33]。

2. 转铁蛋白: 转铁蛋白是杂交瘤细胞为存在无血清条件下最必要的因子^[17, 23]。转铁蛋白的生长支持作用是显著的。有转铁蛋白培养时的细胞数目, 甚至其浓度在 $0.1\mu\text{g/ml}$ 下也显

著地高于无转铁蛋白培养时的数目。其最适浓度范围是 $5—10\mu\text{g/ml}$ ^[18]。值得指出的是, 高浓度的转铁蛋白仍然有效而无毒。转铁蛋白从培养基中缺失会导致杂交瘤细胞生长的总体抑制和细胞死亡。这种影响在快速生长型的杂交瘤比在慢速生长型的要更为显著。转铁蛋白的作用紧密地同控制杂交瘤细胞增殖的机制相关。转铁蛋白的刺激作用可能同它的携铁性质有关。它的另一作用可能在于结合培养基中浓度处于有毒状态的其他金属离子以消除毒性^[8]。

3. 胰岛素: 胰岛素几乎是所有细胞系培养基的必需成分。它在培养基中达到刺激细胞生长所需浓度非常高, 其范围在 $50—100\mu\text{g/ml}$ 。它除了刺激细胞生长外, 在无血清培养中也见到如象增强脂肪糖原合成这样的经典的胰岛素效应。高浓度胰岛素之所以被需要是因为胰岛素在含有半胱氨酸的 Ham's F₁₂ 中在 37°C 下很快被灭活。如果半胱氨酸被胱氨酸替代, 胰岛素在糖原合成上的有效剂量可能降低到 $5—10\mu\text{g/ml}$ 的范围^[9]。然而象这样的浓度仍然远远超出生理范围。这是由于胰岛素可能模拟胰岛素样生长因子的作用, 要占据对胰岛素样因子有高度亲和力的受体就需要过剩的胰岛素去补偿胰岛素对这些受体的低亲和力。

胰岛素和转铁蛋白是无血清培养各种哺乳动物细胞的共同成分。杂交瘤细胞在无血清条件下的生长严格地依赖转铁蛋白的存在, 而有的细胞系对胰岛素的需求并不严格^[22]。

4. 硒和微量元素: 象亚硒酸钠这样的硒化合物作为无血清培养基中的成分广泛用来培养许多种细胞^[18, 34]。亚硒酸钠对杂交瘤有着显著的生长支持效应。它的最适浓度是 $30—60\text{nmol/L}$, 在高浓度时刺激效应逐渐降低。缺失硒生长 3 天后细胞数目仅是有硒生长时细胞数目的 60—70%^[23]。Ham 已指出, 细胞对硒的需求与硒以谷胱甘肽过氧化酶的成分存在有关, 它保护细胞不受过氧化物的毒性影响。

锰对在无血清培养基中杂交瘤生长的刺激效应新近才发现。最适浓度大约在 0.5nmol/L , 在高浓度时刺激效应减弱, 但并不表现毒性作用。锰的缺失导致降低杂交瘤细胞的生长能力。

Kovar 比较了 12 种之多的微量元素对杂交瘤生长

的影响,除了上述的硒、锰以及有人想用来代替转铁蛋白作用的铁^[24]外,其他的未见明显的影响。

5. 白蛋白和酪蛋白:白蛋白是许多种部分限定性培养基的成分之一^[35]。白蛋白作为载体结合类脂、金属离子和激素,其刺激细胞的能力在无血清培养中证明是有用的。此外,白蛋白以相似于转铁蛋白的作用方式作为脱毒因素也是可能的^[6,36]。Darfler和Insel^[15,16]在他们的培养基中用酪蛋白代替白蛋白作为类脂的载体。因为加到培养基中的过氧化氢酶消除了对白蛋白或酪蛋白的需求。他们认为,白蛋白、酪蛋白和硒在无血清培养基中执行同一功能,即防止过氧化物介导的细胞毒性,在此功能上过氧化氢酶可能会更有效。

6. 亚油酸和油酸:Kawamoto等^[19,37]报告低密度脂蛋白(LDL)对于NS-1细胞的生长是非常重要的。LDL能满足这些细胞对类脂的绝对需要。LDL也可由胆甾醇-牛血清白蛋白复合物代替。可是LDL对新形成的杂交瘤似乎是轻度有害的而油酸却显著地增加新生杂交瘤的存活和生长^[20]。

亚油酸能够替代如象胆甾醇这样的类脂。亚油酸是同白蛋白相结合应用的。取消无血清培养基中的亚油酸会显著地抑制杂交瘤的生长。它在无血清培养中刺激杂交瘤生长的最适浓度大约10 μ g/ml。浓度高于20 μ g/ml时,由于出现毒性作用,刺激效应显著减低。应该指出,亚油酸与无脂肪酸的白蛋白的浓度比不可超过1:100(W/W),否则会出现脂肪酸的毒性效应^[22,23]。

7. 其他补充物:氢化可的松也影响在无血清条件下的杂交瘤生长。它表现生长刺激作用时的最适浓度在2ng/ml,最适范围比较窄。氢化可的松缺失对杂交瘤生长的影响不如上述补充物缺失时影响的显著^[23]。

抗坏血酸作为无血清培养基的一种成分支持杂交瘤的生长^[23]。有效的生长刺激浓度的范围比较窄,最适浓度约在3 μ g/ml,它的缺失明显地减低杂交瘤的生长。抗坏血酸的生长支持效应可能同它的抗氧化剂活性相关,它保护细胞不受过氧化物的毒性影响。

α -巯基乙醇是杂交瘤培养中共有的培养基

成分。然而,按Kovar^[22]的经验,对于已建好的稳定的杂交瘤无论在有无血清的还是无血清的培养中 α -巯基乙醇都不具有生长支持效应。

在补充有胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺的无血清培养基中缺失松弛素、ACTH、催乳素或生长激素减低细胞增殖近18%。而腐胺(0.1mmol/L)、雌二醇(5nmol/L)及神经生长因子(NGF, 0.25ng/ml)的影响就更小^[12,18]。Kovar^[22]认为,许多物质,如,三碘甲腺原氨酸、 α -生育酚、睾酮、视黄醛及腐胺对杂交瘤无任何生长刺激性效应。

上述中有效的因子只是在无血清培养中支持杂交瘤生长的主要因素。正如Mukaiami指出的,某些新的因素有待发现。在他们的无血清培养基中,杂交瘤细胞表现了生长初始的延搁,这种延搁不被添加松弛素、ACTH、生长激素及催乳素所消除,在长期的无血清培养后也不消除。这暗示细胞需要某些另外的生长因子,它们没含在此限定性培养基中而是存在于血清中。

应该考虑,由于因子间在质上和量上的协同作用是常见的及某些因子可能替代其他因子,所以因子间的相互关系可能是或可能变得相当复杂。随着实验条件的改变,最适剂量也会改变。Chang^[11]报道了转铁蛋白和胰岛素之间剂量效应的相互关系。杂交瘤细胞在无血清培养基中无转铁蛋白就不生长,尽管胰岛素浓度增加到50 μ g/ml。而在含5 μ g/ml转铁蛋白和低到0.5 μ g/ml胰岛素的培养基中细胞数目照样增加。同样地,无胰岛素,即使增加转铁蛋白浓度到50 μ g/ml,细胞也不增殖。而含5 μ g/ml胰岛素和仅含1 μ g/ml的转铁蛋白引起细胞数的增加。可见,胰岛素和转铁蛋白两者对维持杂交瘤无血清培养是必需的,缺那一个都会阻碍细胞生长。不仅如此,而且其他一些因子也需要通过它们才表现出刺激作用。例如象亚油酸或油酸这样的类脂需要转铁蛋白或白蛋白等作为载体。

(三) 杂交瘤细胞无血清培养的现状和前景

不难发现,现存的无血清培养基配方仍属于经验式阶段并正处于试验之中。换言之,这些培养基是不理想的,所培养的细胞密度刚刚达到10⁶/ml的峰值。这些配方有待发展和完善。大多数上述培养基适用于杂交瘤的初级培养,至

今还未见到无血清培养基用于真正的体外大规模生产McAb的报道。这是由于制备完全的限定培养基尚有难点及它的商业制品的高花费使它替代含血清培养尚有困难。

体外大规模生产McAb的核心问题是如何降低生产成本。在减少培养基花费上的努力是值得的,但是要做到显著的节省则在于怎样配制生长培养基而不在于基础培养基。有可能节省的是Ham等所描述的培养基。他们已证实自血清中许多微量元素支持杂交瘤在无蛋白培养基中生长。如果同总的生产成本相比较来考虑,无血清培养虽然贵,但纯化和质量控制上的花费却可以减半,有意义的节省还是可以做到的。已经有公司,如Ventriex Laboratories Inc.利用上述信息生产和出售完全的限定性无血清培养基。

笔者认为,发展无血清培养尚存在不少问题,前景却无容置疑,下面几点需加以重视。

1. 对化学限定性培养基的合理控制:为了充分利用培养基各成分,任一成分所表现的生长限制起始点必须被推迟到它们的累积作用出现使细胞生长停止的时候。培养基各成分的浓度阈值应以用来维持最适的细胞内浓度为准。此外,某些营养物的相对浓度是应该给予注意的。

2. 成年哺乳动物血清在相对限定性培养基中的应用:成年哺乳动物血清,例如牛血清和猪血清,同胎牛血清相比是广阔的自然资源。可透

析的血清成分支持杂交瘤生长的,这一事实证明,血清中高分子量的物质,如某些蛋白质,为细胞增殖大多不是必需的。我们的结果暗示,成年动物血清的低分子量超滤液可用来补充基础培养基。笔者相信这将会是一条成功的途径。

3. 饲养细胞的利用:在杂交瘤诱生过程中需要某些生长因子。释放淋巴刺激素的胸腺细胞、或其他非分裂的细胞(巨噬细胞、T淋巴细胞)可用来作“饲养者”廉价地提供必要的生长因子给主要的细胞系。在发展无血清培养中混合的“饲养培养(Feeder culture)”可能有效地替代血清中的生长因子。

4. 培养系统的改进:应该指出,除了上述培养基本身外,培养系统的改进也关系到经济上的耗费。提供更好的防腐设备会是合算的投资。防腐设备的足够可靠性能够允许省去用抗菌素而节省整体上的花费。

5. 细胞系的选择:从长远看,细胞系的选择将引起更显著的改观。投资在选择适应培养基的细胞克隆比设计一种培养基去适应细胞系更为聪明。

6. 人们应该想到,通过研究杂交瘤在小鼠体内腹水中的生长动力学并且在体外模拟这一过程而找到更好的培养基配方和更佳的培养系统将是可能的。至少含胎牛血清的培养对于杂交瘤体外培养来说决不会是唯一的最适培养方式。

参 考 文 献

- [1] Kohler, G. and Milstein, C., *Nature*, 256:495—497, 1975.
- [2] Klausner, A., *Bio/Technology*, 5:551—556, 1987.
- [3] Mizrahi, A., *Process Biochemistry*, 21:108—112, 1986.
- [4] Nilsson, K., *TIBTECH*, 5:73—78, 1987.
- [5] Randerson, D. H., *J. Biotechnol.*, 2:241—255, 1985.
- [6] Griffiths, J. B., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 38:217—219, 1987.
- [7] Ham, R. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53:288—293, 1965.
- [8] Iscove, N. N. and Melchers, F., *J. Exp. Med.*, 147:923—933, 1978.
- [9] Barnes, D. and Sato, G., *Anal. Biochem.*, 102:255—270, 1980.
- [10] Andersson, J. and Melcher, F., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 81:130—139, 1978.
- [11] Fäzekas de St. Groth, S. and Scheidegger, D., *J. Immunol. Methods*, 35:1—21, 1980.
- [12] Fäzekas de St. Groth, S., *J. Immunol. Methods*, 57:121—136, 1983.
- [13] Murakami, H. et al., Suspension culture of hybridoma cells in serum-free medium, Soybean phospholipids as essential components, in: *Growth of Cells in Hormonally Defined Media* (Sato, G. et al.), Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- [14] Cleveland, W. L. et al., *J. Immunol. Methods*, 56:221—234, 1983.
- [15] Darfler, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5993—5997, 1980.
- [16] Darfler, F. and Insel, P., *Exp. Cell Res.*, 138:287—295, 1982.

(下转96页)

- [17] Chang, T.H. et al.: *J. Immunol Methods*, 36:369—376, 1980.
- [18] Murakami, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:1158—1162, 1982.
- [19] Kawamoto, T. et al.: *Anal. Biochem.*, 130:445—453, 1983.
- [20] Sato, J.D. et al.: *Mol. Biol. Med.*, 2:121—134, 1984.
- [21] Shirai, Y. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26:495—499, 1987.
- [22] Kovar, J. and Franek, F.: *Immunol. Lett.*, 7:339—345, 1984.
- [23] Kovar, J. and Franek, F.: *Methods Enzymol.*, 121:277—292, 1986.
- [24] Kovar, J. and Franek, F.: *Biotech. Lett.*, 9:258—264, 1987.
- [25] Adamson, S.R. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 5:573—578, 1983.
- [26] Calabresi, P. et al.: *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 22:362, 1981.
- [27] Wiemann, M. C. et al.: *Clin. Res.*, 31:511A, 1983.
- [28] Kitano, K. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24:282—286, 1986.
- [29] Klinman, D.M. and McKean, T.J.: *J. Immunol. Methods*, 42:1—9, 1981.
- [30] Griffiths, J.B.: *TIBTECH*, 4:268—272, 1986.
- [31] Luan, Y.T. et al.: *Biotech. Lett.*, 9:535—538, 1987.
- [32] Kano-Sueoka, T. and Errick, J.E.: *J. Exp. Cell Res.*, 136:136—146, 1981.
- [33] Ethier, S.: *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, 22:485—490, 1986.
- [34] McKeehan, W.L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:2023—2027, 1976.
- [35] Spieker-Polet, H. and Polet, H.: *J. Biol. Chem.*, 251:987—992, 1976.
- [36] Guibert, L.J. and Iscove, N.N.: *Nature*, 262:594—595, 1976.
- [37] Kawamoto, T. et al.: *Methods Enzymol.*, 121:266—277, 1986.