

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532645

(P2004-532645A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004. 10. 28)

(51) Int.Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	39/395	X	4 B O 2 4
G O 1 N	33/15	G O 1 N	33/15	Z	4 B O 6 3
G O 1 N	33/50	G O 1 N	33/50	Z	4 C O 8 5
G O 1 N	33/53	G O 1 N	33/53	M	
		審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 380 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2003-506327 (P2003-506327)		(71) 出願人	500549847	
(86) (22) 出願日	平成13年11月14日 (2001. 11. 14)			ユニバーシティ オブ ロチェスター	
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月19日 (2003. 5. 19)			アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ロチェ	
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/043076			スター ハイラン ビルディング 5 1 8	
(87) 国際公開番号	W02002/102855			オフィス オブ テクノロジー トラン	
(87) 国際公開日	平成14年12月27日 (2002. 12. 27)			スファア	
(31) 優先権主張番号	60/249, 268		(74) 代理人	100102978	
(32) 優先日	平成12年11月17日 (2000. 11. 17)			弁理士 清水 初志	
(33) 優先権主張国	米国 (US)		(74) 代理人	100108774	
(31) 優先権主張番号	60/262, 067			弁理士 橋本 一憲	
(32) 優先日	平成13年1月18日 (2001. 1. 18)		(72) 発明者	ザウディラー モーリス	
(33) 優先権主張国	米国 (US)			アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ビッツ	
(31) 優先権主張番号	60/271, 424			フォード ウッドランド ロード 4 4	
(32) 優先日	平成13年2月27日 (2001. 2. 27)				
(33) 優先権主張国	米国 (US)			最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 真核細胞において免疫グロブリン分子を製造および同定するインビトロにおける方法

(57) 【要約】

本発明は、真核細胞において免疫グロブリン分子を発現する高効率の方法に関する。本発明は、真核細胞において発現させるために、特に三分子組換え法を用い、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ライブラリーを製造する方法についてさらに開示している。本発明は更に、抗原特異的免疫グロブリン分子及びそれらの抗原特異的断片を選択及びスクリーニングする方法を提供する。本発明は、抗原特異的免疫グロブリン分子を製造、スクリーニング、及び選択するキットも提供する。最終的には、本発明は、本明細書において提供された方法により製造された免疫グロブリン分子及びそれらの抗原特異的断片を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、抗原特異的免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片をコードするポリヌクレオチドを選択する方法：

(a) 該免疫グロブリン分子の発現が可能な真核宿主細胞の集団に、転写調節領域との操作可能な結合を介して、複数の第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの第一のライブラリーを導入する段階であって、各第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは：

(i) 重鎖定常領域及び軽鎖定常領域からなる群より選択される第一の免疫グロブリンの定常領域、

10

(i i) 該第一の定常領域に対応する免疫グロブリン可変領域、及び

(i i i) 該第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの細胞表面発現又は分泌を指示することが可能なシグナルペプチドを含む段階；

(b) 該宿主細胞に、転写調節領域との操作可能な結合を介して、複数の第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの第二のライブラリーを導入する段階であって、各第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは：

(i) 重鎖定常領域及び軽鎖定常領域からなる群より選択される、該第一の免疫グロブリン定常領域と同一でない第二の免疫グロブリンの定常領域、

(i i) 該第二の定常領域に対応する免疫グロブリン可変領域、及び

(i i i) 該第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの細胞表面発現又は分泌を指示することが可能なシグナルペプチドを含み；

20

ここで該第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは、該第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドと結合して、該宿主細胞の膜表面に付着した免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を形成することが可能である段階；

(c) 該宿主細胞から免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現させる段階；

(d) 該免疫グロブリン分子を抗原と接触させる段階；並びに

(e) 該抗原に特異的な免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現している該第一のライブラリーのこれらのポリヌクレオチドを回収する段階。

【請求項 2】

30

以下の段階を更に含む、請求項 1 記載の方法：

(f) 回収されたポリヌクレオチドを、免疫グロブリン分子を発現することが可能な宿主細胞集団に導入する段階；

(g) 該宿主細胞へ該ポリヌクレオチドの第二のライブラリーを導入する段階； (h) 該宿主細胞から免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現させる段階；

(i) 該宿主細胞を該抗原と接触させる段階；並びに

(j) 該抗原に特異的な免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現している該第一のライブラリーのこれらのポリヌクレオチドを回収する段階。

【請求項 3】

段階 (f) ~ (j) を 1 回又は複数回繰り返し、それにより免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部として、該抗原に特異的に結合する第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードする該第一のライブラリーのポリヌクレオチドを濃縮することを更に含む、請求項 2 記載の方法。

40

【請求項 4】

第一のライブラリーから回収されたそれらのポリヌクレオチドを単離する段階を更に含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

以下の段階を更に含む、請求項 4 記載の方法：

(k) 免疫グロブリン分子を発現することが可能な真核宿主細胞集団へ、ポリヌクレオチドの第二のライブラリーを導入する段階；

50

(l) 該宿主細胞へ、該第一のライブラリーから単離されたこれらのポリヌクレオチドを導入する段階；

(m) 該宿主細胞から、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現させる段階；

(n) 該宿主細胞を該特異的抗原と接触させる段階；並びに

(o) 該抗原に特異的な免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現している該第二のライブラリーのこれらのポリヌクレオチドを回収する段階。

【請求項 6】

以下の段階を更に含む、請求項 5 記載の方法：

(p) 回収されたポリヌクレオチドを、免疫グロブリン分子を発現することが可能な宿主細胞集団へ導入する段階； 10

(q) 該宿主細胞へ、該第一のライブラリーから単離されたこれらのポリヌクレオチドを導入する段階；

(r) 該宿主細胞から、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現させる段階；

(s) 該宿主細胞を該抗原と接触させる段階；並びに

(t) 該抗原に特異的な免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現する該第二のライブラリーのこれらのポリヌクレオチドを回収する段階。

【請求項 7】

段階 (p) ~ (t) を 1 回又は複数回繰り返し、それにより免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部として、該抗原に特異的に結合する第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードする該第二のライブラリーのポリヌクレオチドを濃縮することを更に含む、請求項 6 記載の方法。 20

【請求項 8】

第二のライブラリーから回収されたこれらのポリヌクレオチドを単離する段階を更に含む、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

免疫グロブリン分子がヒト免疫グロブリン分子である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドが、免疫グロブリン重鎖又はそれらの抗原特異的断片である、請求項 1 記載の方法。 30

【請求項 11】

免疫グロブリン重鎖又はそれらの抗原特異的断片が、免疫グロブリン重鎖の膜結合型である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

免疫グロブリン重鎖又はそれらの抗原特異的断片が、天然の免疫グロブリン膜貫通ドメインを含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

免疫グロブリン重鎖又はそれらの抗原特異的断片が、融合タンパク質の一部として宿主細胞に付着している、請求項 11 記載の方法。 40

【請求項 14】

融合タンパク質が異種膜貫通ドメインを含む、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

融合タンパク質が Fas デスドメインを含む、請求項 13 記載の方法。

【請求項 16】

免疫グロブリン重鎖又はそれらの抗原特異的断片が、IgM 重鎖、IgD 重鎖、IgG 重鎖、IgA 重鎖、IgE 重鎖、及び該重鎖のいずれかの抗原特異的断片からなる群より選択される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 17】

免疫グロブリン重鎖定常領域配列が、変更された免疫エフェクター機能を支持する修飾を 50

含む、請求項 10 記載の方法。

【請求項 18】

免疫グロブリン重鎖又はそれらの抗原特異的断片が、IgM重鎖又はそれらの抗原特異的断片を含む、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドが、免疫グロブリン軽鎖又はそれらの抗原特異的断片である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 20】

免疫グロブリン軽鎖又はそれらの抗原特異的断片が、該免疫グロブリン重鎖又はそれらの抗原特異的断片に結合し、それにより免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片が生産される、請求項 19 記載の方法。 10

【請求項 21】

免疫グロブリン軽鎖が、κ軽鎖及びλ軽鎖からなる群より選択される、請求項 19 記載の方法。

【請求項 22】

ポリヌクレオチドの第一のライブラリーが真核ウイルスベクターにおいて構築されている、請求項 1 記載の方法。

【請求項 23】

ポリヌクレオチドの第二のライブラリーが真核ウイルスベクターにおいて構築されている、請求項 1 記載の方法。 20

【請求項 24】

第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドが、真核ウイルスベクターにより導入される、請求項 5 記載の方法。

【請求項 25】

ポリヌクレオチドの第二のライブラリーが、プラスミドベクターにおいて構築されている、請求項 1 記載の方法。

【請求項 26】

宿主細胞が、第一のライブラリーに約 1～約 10 の範囲のMOIで感染し、該第二のライブラリーの最大 20 個のポリヌクレオチドが各感染宿主細胞により取込まれることが可能な条件下で第二のライブラリーが導入される、請求項 22 記載の方法。 30

【請求項 27】

第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドが、プラスミドベクター内の宿主細胞へ導入される、請求項 5 記載の方法。

【請求項 28】

真核ウイルスベクターが動物のウイルスベクターである、請求項 22 記載の方法。

【請求項 29】

真核ウイルスベクターが動物のウイルスベクターである、請求項 23 記載の方法。

【請求項 30】

ウイルスベクターが、哺乳類細胞における感染性ウイルス粒子を生産することができる、請求項 28 記載の方法。 40

【請求項 31】

ウイルスベクターの天然のゲノムがDNAである、請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

ウイルスベクターの天然のゲノムがRNAである、請求項 30 記載の方法。

【請求項 33】

ウイルスベクターの天然のゲノムが、直鎖状の二本鎖DNAである、請求項 31 記載の方法。

【請求項 34】

ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、及びポックスウイルスベクターからなる群より選択される、請求項 33 記載の方法。 50

【請求項 35】

ウイルスベクターがボックスウイルスベクターである、請求項 34 記載の方法。

【請求項 36】

ボックスウイルスベクターが、オルトボックスウイルスベクター、アビボックスウイルスベクター、カプリボックスウイルスベクター、レポリボックスウイルスベクター、エントモボックスウイルスベクター、及びスイボックスウイルスベクターからなる群より選択される、請求項 35 記載の方法。

【請求項 37】

ボックスウイルスベクターが、ワクシニアウイルスベクター及びアライグマボックスウイルスベクターからなる群より選択されるオルトボックスウイルスベクターである、請求項 36 記載の方法。 10

【請求項 38】

動物ウイルスベクターがワクシニアウイルスベクターである、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

宿主細胞が、ウイルスの感染性ウイルス粒子の産生を許容する、請求項 38 記載の方法。

【請求項 40】

ワクシニアウイルスが弱毒化されている、請求項 38 記載の方法。

【請求項 41】

ワクシニアウイルスベクターが D4R 合成において欠損している、請求項 40 記載の方法。 20

【請求項 42】

ポリヌクレオチドの第一のライブラリーの転写調節領域が、ボックスウイルスに感染した細胞の細胞質において機能する、請求項 35 記載の方法。

【請求項 43】

プラスミドベクターが、転写調節領域との操作可能な結合を介して、ボックスウイルスに感染した細胞の細胞質における第二の免疫グロブリンサブユニットの合成を指示する、請求項 25 記載の方法。

【請求項 44】

転写調節領域がプロモーターを含む、請求項 42 記載の方法。

【請求項 45】

プロモーターが構成的である、請求項 44 記載の方法。 30

【請求項 46】

プロモーターがワクシニアウイルス p7.5 プロモーターである、請求項 45 記載の方法。

【請求項 47】

プロモーターが合成の初期／後期プロモーターである、請求項 45 記載の方法。

【請求項 48】

プロモーターが、T7 RNAポリメラーゼが発現されている細胞において活性な T7 ファージプロモーターである、請求項 44 記載の方法。

【請求項 49】

転写調節領域が転写終結領域を含む、請求項 42 記載の方法。 40

【請求項 50】

以下の段階を含む方法により、ポリヌクレオチドの第一のライブラリーが真核ウイルスベクターにおいて構築される、請求項 22 記載の方法：

(a) 単離された直鎖状 DNA ウイルスゲノムを切断し、第一のウイルス断片及び第二のウイルス断片を製造する段階であって、該第一の断片が、該第二の断片と相同でない段階；

(b) 5' フランキング領域及び 3' フランキング領域が隣接した転写調節領域との操作可能な結合を介して、複数の免疫グロブリン重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む伝達性プラスミドの集団を提供する段階であって、該 5' フランキング領域は該第一のウイ 50

ルス断片と相同であり、かつ該3'フランキンク領域は該第二のウイルス断片と相同であり；かつ、該伝達性プラスミドは、該第一及び第二のウイルス断片との相同的組換えが可能であり、その結果生存可能なウイルスゲノムが形成される段階；

(c) 該伝達性プラスミド並びに該第一及び第二のウイルス断片を、伝達性プラスミド及び該ウイルス断片がインビボでの相同的組換えを受ける条件下で、宿主細胞へ導入する段階であって、それにより免疫グロブリン重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む生存可能な修飾されたウイルスゲノムが製造される段階；並びに

(d) 該修飾されたウイルスゲノムを回収する段階。

【請求項51】

以下の段階を含む方法により、ポリヌクレオチドの第二のライブラリーが真核ウイルスベクターにおいて構築される、請求項23記載の方法： 10

(a) 単離された直鎖状DNAウイルスゲノムを切断して第一のウイルス断片及び第二のウイルス断片を製造する段階であって、該第一の断片が、該第二の断片と相同でない段階；

(b) 5'フランキンク領域及び3'フランキンク領域が隣接した転写調節領域との操作可能な結合を介して、該複数の免疫グロブリン軽鎖をコードする該ポリヌクレオチドを含む伝達性プラスミドの集団を提供する段階であって、該5'フランキンク領域は該第一のウイルス断片と相同であり、かつ該3'フランキンク領域は該第二のウイルス断片と相同であり；かつ、該伝達性プラスミドは、該第一及び第二のウイルス断片との相同的組換えが可能であり、その結果生存可能なウイルスゲノムが形成される段階； 20

(c) 該伝達性プラスミド並びに該第一及び第二のウイルス断片を、伝達性プラスミド及び該ウイルス断片がインビボでの相同的組換えを受ける条件下で、宿主細胞へ導入する段階であり、それにより免疫グロブリン軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む生存可能な修飾されたウイルスゲノムが製造される段階、並びに

(d) 該修飾されたウイルスゲノムを回収する段階。

【請求項52】

抗原特異的免疫グロブリン分子をコードするポリヌクレオチドが：

(a) 抗原誘導型細胞死；

(b) 抗原誘導型シグナル伝達；及び

(c) 抗原特異的結合からなる群より選択される作用の検出により同定される、請求項1記載の方法。 30

【請求項53】

抗原特異的免疫グロブリン分子をコードするポリヌクレオチドが：

(a) 抗原誘導型細胞死；

(b) 抗原誘導型シグナル伝達；及び

(c) 抗原特異的結合からなる群より選択される作用の検出により同定される、請求項5記載の方法。

【請求項54】

作用が抗原誘導型細胞死である、請求項52記載の方法。

【請求項55】

作用が抗原誘導型細胞死である、請求項53記載の方法。

【請求項56】

宿主細胞が、それらの表面に免疫グロブリン分子を発現し、抗原に結合する免疫グロブリン分子を発現している該宿主細胞が、アポトーシスの誘導により抗原特異的免疫グロブリン受容体の架橋結合に直接反応する、請求項54記載の方法。

【請求項57】

宿主細胞が、それらの表面に免疫グロブリン分子を発現し、抗原に結合する免疫グロブリン分子を発現している該宿主細胞が、アポトーシスの誘導により抗原特異的免疫グロブリン受容体の架橋結合に直接反応する、請求項55記載の方法。

【請求項58】

作用が抗原誘導型シグナル伝達である、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 9】

作用が抗原誘導型シグナル伝達である、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 6 0】

宿主細胞が、それらの表面に免疫グロブリン分子を発現し、抗原に結合する免疫グロブリン分子を発現している該宿主細胞が、検出可能なレポーター分子の発現により抗原特異的免疫グロブリン受容体の架橋結合に反応する、請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 1】

宿主細胞が、それらの表面に免疫グロブリン分子を発現し、抗原に結合する免疫グロブリン分子を発現している該宿主細胞が、検出可能なレポーター分子の発現により抗原特異的免疫グロブリン受容体の架橋結合に反応する、請求項 5 9 記載の方法。 10

【請求項 6 2】

レポーター分子が、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、及び β -ガラクトシダーゼからなる群より選択される、請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 3】

レポーター分子が、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、及び β -ガラクトシダーゼからなる群より選択される、請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 4】

作用が抗原特異的結合である、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 6 5】

20

以下の段階を含む、請求項 6 4 記載の方法：

(a)、宿主細胞により発現された抗原特異的免疫グロブリン分子が抗原に結合する条件下で、該宿主細胞を該抗原と接触させる段階；及び

(b) 該抗原が結合した免疫グロブリン分子を発現している、これらの宿主細胞プールから又は先に取り分けたポリヌクレオチドの複製プールから該第一のライブラリーのポリヌクレオチドを回収する段階。

【請求項 6 6】

以下の段階を更に含む、請求項 6 5 記載の方法：

(c) 回収されたポリヌクレオチドを複数のサブプールに分割し、かつ該サブプールを該免疫グロブリン分子を発現することが可能な宿主細胞の集団に導入する段階； 30

(d) 該宿主細胞から、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現させる段階；

(e) 該宿主細胞により発現された抗原特異的免疫グロブリン分子が該抗原に結合する条件下で、該プールを該抗原と接触させる段階；及び

(f) 該抗原が結合した免疫グロブリン分子を発現している、これらの宿主細胞プールから又は先に取り分けたポリヌクレオチドの複製プールから、該第一のライブラリーのポリヌクレオチドを回収する段階。

【請求項 6 7】

段階 (c) ~ (f) を 1 回又は複数回繰り返し、それにより免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部として、抗原に特異的に結合する第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードする第一のライブラリーのポリヌクレオチドを濃縮することを更に含む、請求項 6 6 記載の方法。 40

【請求項 6 8】

抗原が、合成粒子、ポリマー、磁気ビーズ、及びタンパク質で被覆した組織培養プレートからなる群より選択される基質に付着している、請求項 6 4 記載の方法。

【請求項 6 9】

抗原が、抗原発現性の提示細胞の表面上に発現され、該抗原発現性の提示細胞は、該抗原を操作可能にコードするポリヌクレオチドによる抗原フリー提示細胞のトランスフェクションにより構築される、請求項 6 4 記載の方法。

【請求項 7 0】

50

抗原発現性の提示細胞が、L細胞、C o s 7細胞、2 9 3細胞、H e L a細胞、及びN I H 3 T 3細胞からなる群より選択される抗原フリー提示細胞において構築される、請求項6 9記載の方法。

【請求項7 1】

抗原が蛍光タグに結合され、抗原に結合する免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞プールが、蛍光活性化された細胞選別により同定される、請求項6 5記載の方法。

【請求項7 2】

作用が抗原特異的結合である、請求項5 3記載の方法。

【請求項7 3】

以下の段階を含む、請求項7 2記載の方法：

10

(a) 宿主細胞により発現された抗原特異的免疫グロブリン分子が抗原に結合する条件下で該宿主細胞のプールを該抗原と接触させる段階；及び

(b) 該抗原が結合した免疫グロブリン分子を発現している、これらの宿主細胞プールから又は先に取り分けたポリヌクレオチドの複製プールから、第二のライブラリーのポリヌクレオチドを回収する段階。

【請求項7 4】

以下の段階を更に含む、請求項7 3記載の方法：

(c) 回収されたポリヌクレオチドを複数のサブプールに分割し、かつ該サブプールを該免疫グロブリン分子を発現することが可能な宿主細胞の集団に導入する段階；

(d) 該宿主細胞から、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現させる段階；

20

(e) 該宿主細胞により発現された抗原特異的免疫グロブリン分子が該抗原に結合する条件下で、該プールを該抗原と接触させる段階；及び

(f) 該抗原が結合した免疫グロブリン分子を発現している、これらの宿主細胞プールから又は先に取り分けたポリヌクレオチドの複製プールから、該第二のライブラリーのポリヌクレオチドを回収する段階。

【請求項7 5】

段階(c)～(f)を1回又は複数回繰り返し、それにより免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部として、該抗原に特異的に結合する第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている該第一のライブラリーのポリヌクレオチドを濃縮することを更に含む、請求項7 4記載の方法。

30

【請求項7 6】

抗原が、合成粒子、ポリマー、磁気ビーズ、及びタンパク質で被覆した組織培養プレートからなる群より選択される基質に付着している、請求項7 2記載の方法。

【請求項7 7】

抗原が抗原発現性の提示細胞の表面上に発現され、該抗原発現性の提示細胞が、該抗原を操作可能的にコードするポリヌクレオチドによる抗原フリー提示細胞のトランスフェクションにより構築される、請求項7 2記載の方法。

【請求項7 8】

抗原発現性の提示細胞が、L細胞、C o s 7細胞、2 9 3細胞、H e L a細胞、及びN I H 3 T 3細胞からなる群より選択される抗原フリー提示細胞において構築される、請求項7 7記載の方法。

40

【請求項7 9】

抗原が蛍光タグに結合され、抗原に結合する免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞プールが、蛍光活性化された細胞選別により同定される、請求項7 3記載の方法。

【請求項8 0】

(a) 転写調節領域との操作可能な結合を介して、複数の第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの第一のライブラリーであって、各第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドが：

(i) 重鎖定常領域及び軽鎖定常領域からなる群より選択される第一の免疫グロブリン定

50

常領域、

(i i) 該第一の定常領域に対応する免疫グロブリン可変領域、及び

(i i i) 該第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの細胞表面発現又は分泌を指示することが可能なシグナルペプチドを含む、

真核ウイルスベクターにおいて構築される第一のライブラリー；

(b) 転写調節領域との操作可能な結合を介して、複数の第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの第二のライブラリーであって、各々が：

(i) 重鎖定常領域及び軽鎖定常領域からなる群より選択される、該第一の免疫グロブリン定常領域と同一でない第二の免疫グロブリン定常領域、

(i i) 該第二の定常領域に対応する免疫グロブリン可変領域、及び

(i i i) 該第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの細胞表面発現又は分泌を指示することが可能なシグナルペプチドを含む、

ここで、該第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは、該第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドと結合して、表面免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を形成することができ、かつ真核ウイルスベクターにおいて構築される第二のライブラリー；及び

(c) 該免疫グロブリン分子を発現することが可能な宿主細胞の集団

を含む、真核宿主細胞において発現された抗原特異的組換え免疫グロブリンを選択するためのキットであって；

該第一及び第二のライブラリーが、感染性ウイルス粒子及び失活されたウイルス粒子の両方として提供され、該失活されたウイルス粒子は、該宿主細胞に感染し、該第一及び第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの発現を可能にするが、ウイルス複製は受けない；かつ

該宿主細胞により発現された抗原特異的免疫グロブリン分子は、抗原との相互作用を介して選択される、キット。

【請求項 8 1】

請求項 1 記載の方法により製造された抗体又はそれらの抗原特異的断片。

【請求項 8 2】

請求項 8 1 記載の抗体及び薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 8 3】

以下の段階を含む、単一ドメイン抗原特異的免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片をコードしているポリヌクレオチドを選択する方法：

(a) 転写調節領域との操作可能な結合を介して、複数の単一ドメイン免疫グロブリンポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのライブラリーを、該免疫グロブリン分子を発現することが可能な真核宿主細胞の集団に導入する段階であって、各免疫グロブリンポリペプチドが：

(i) 免疫グロブリン重鎖定常領域、

(i i) ラクダ化された免疫グロブリン重鎖可変領域、及び

(i i i) 該免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの細胞表面発現又は分泌を指示することが可能なシグナルペプチドを含む段階；

(b) 該宿主細胞から、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現させる段階；

(c) 該免疫グロブリン分子を抗原と接触させる段階；及び

(d) 該抗原に結合する免疫グロブリン分子を発現しているこれらの宿主細胞から該ライブラリーのポリヌクレオチドを回収する段階。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

発明の分野

10

20

30

40

50

本発明は、真核細胞において免疫グロブリン分子を発現する高効率の方法、真核細胞において発現するために免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のライブラリーを製造する方法、特異的抗原に結合する免疫グロブリンを単離する方法、並びにこれらの方法のいずれかにより製造された免疫グロブリンに関する。

【0002】

関連技術

免疫グロブリンの製造

特異性が定義された抗体は、数が増大しつつある多様な治療的用途において使用されている。

【0003】

自己抗原に対して定義された抗体は、インビボにおける治療及び診断の目的に特に価値がある。多くの齧歯類のモノクローナル抗体が、ハイブリドーマ技術を用いて単離されており、かつヒトにおけるインビボにおける治療及び診断の目的に利用されている。例えば、これらのマウスのモノクローナル抗体の初期の用途は、腫瘍を殺傷又は造影するための標的化剤としてであった（F. H. Deland 及び D. M. Goldenberg、1982年、「放射性核種造影（Radionuclide Imaging）」、D. E. Kuhl 編集、289-297頁、Pergamon、パリ；R. Levy 及び R. A. Miller、Ann. Rev. Med.、34:107-116（1983））。しかし、このような抗体のインビボにおける使用は、問題となり得る。外来免疫グロブリンは、治療を妨害し得る抗免疫グロブリン応答を誘起するか（R. A. Miller ら、Blood、62:988-995（1983））、もしくはアレルギー又は免疫複合体過敏症を引き起こすことがある（B. Ratner、1943年、「アレルギー、アナフィラキシス及び免疫療法（Allergy, Anaphylaxis and Immunotherapy）」Williams and Wilkins、ボルチモア）。従って、それら自身宿主において免疫原性でないような抗体を開発すること、例えば、ヒトにおいてそれら自身免疫原性でないようなヒト抗原に対する抗体を開発することが、このような用途には特に重要である。

【0004】

自己抗原に対する特異性を伴う抗体断片を単離することは過酷な作業である。動物は、通常自己抗原に対する抗体を産生せず、この現象は免疫寛容と呼ばれる（Nossal、G. J.、Science、245:147-153（1989））。概して、自己抗原によるワクチン接種は、循環血中抗体産生を招かない。従って、自己抗原に対する抗体を生じることが困難である。

【0005】

先に、「自己」抗原を特異的に認識する免疫グロブリン分子を作成するために、3つの一般的戦略が使用されている。ひとつの方法において、齧歯類抗体配列は、ヒト抗体のフレームワーク領域に選択された齧歯類モノクローナル抗体の抗原結合部位を含む特定化された相補性決定領域（CDR）を移植することにより、ヒト抗体配列に転換されている（Winter ら、英国特許第GB2188638B号（1987）；Reichmann、L. ら、Nature（London）、332:323-327（1988）；Fote、J. 及び Winter、G.、J. Mol. Biol.、224:487-499（1992））。抗体のヒト化と称されるこの方法において、各齧歯類免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の3種のCDRループが、対応するヒト免疫グロブリン鎖の4個のフレームワーク領域の相同の位置に移植される。このフレームワーク残基の一部は、抗体親和性にも寄与しているので、この構造は概して、親和性を増強するために、追加のフレームワーク置換により更に純化されなければならない。これは、労力と経費のかかるプロセスである。

【0006】

更に最近になって、ヒト免疫グロブリン配列を発現しているトランスジェニックマウスが作出されている（Mendez、M. J. ら、Nat. Genet.、15:146-

10

20

30

40

50

156 (1997))。この戦略は、ヒト抗体の選択を促進する可能性があるが、抗体は、ヒトゲノムよりむしろマウスゲノムにおいてコードされたタンパク質により形作られた利用可能なマウスレパトアから選択されるという制限を、抗体ヒト化法と共有している。これは、特異的抗原に対する反応において選択された抗体のエピトープ特異性にバイアスをかける。例えば、マウスホモログが存在するヒトタンパク質によるマウスの免疫感作は、主としてヒト及びマウスにおいて異なるエピトープについて特異的な抗体を生じると予想される。しかし、これらは、最適な標的エピトープではない。

【0007】

これと同じ制限を受けない別の方法は、バクテリオファージ上に展示された組換えヒト抗体断片のスクリーニングである (Vaughan, T. J. ら、Nat. Biotechnol.、14:309-314 (1996); Barbas, C. F.、III Nat. Med.、1:837-839 (1995); Kay, B. K. ら (編集)、「ペプチド及びタンパク質のファージディスプレイ (Phage Display of Peptides and Proteins)」Academic Press 社 (1996))。ファージディスプレイ法において、機能性免疫グロブリンドメインは、それらをコードしているポリヌクレオチド配列を保持するファージ粒子の表面に展示される。典型的ファージディスプレイ法において、免疫グロブリン断片、例えば Fab、Fv 又はジスルフィド安定化された Fv の免疫グロブリンドメインは、融合タンパク質として展示される、すなわち、ファージ表面タンパク質に融合される。抗体を作成するために使用することができるファージディスプレイ法の例は、Brinkman U. ら、J. Immunol. Methods、182:41-50 (1995); Ames, R. S. ら、J. Immunol. Methods、184:177-186 (1995); Kettleborough, C. A. ら、Eur. J. Immunol.、24:952-958 (1994); Persic, L. ら、Gene、187:9-18 (1997); Burton, D. R. ら、Advances in Immunology、57:191-280 (1994); PCT/GB9L/01134 号; 国際公開公報第 90/02809 号; 国際公開公報第 91/10737 号; 国際公開公報第 92/01047 号; 国際公開公報第 92/18619 号; 国際公開公報第 93/11236 号; 国際公開公報第 95/15982 号; 国際公開公報第 95/20401 号; 及び、米国特許第 5,698,426 号、第 5,223,409 号、第 5,403,484 号、第 5,580,717 号、第 5,427,908 号、第 5,750,753 号、第 5,821,047 号、第 5,571,698 号、第 5,427,908 号、第 5,516,637 号、第 5,780,225 号、第 5,658,727 号及び第 5,733,743 号に開示されているものを含む (これらの参考文献はその全体が本明細書に参照として組入れられている)。

【0008】

ファージディスプレイ法は、通常免疫グロブリン分子の抗原結合断片の発現のみを生じるので、ファージ選択後、このファージ由来の免疫グロブリンコード領域は、単離及び再クローニングし、ヒト抗体、又はいずれか他の所望の抗原結合断片を含む、抗体全体を作出し、かつ哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌を含む、いずれか所望の宿主において発現されなければならない。例えば、組換えにより Fab、Fab' 及び F(ab')₂ 断片を作成する技術も、国際公開公報第 92/22324 号; Mullinax, R. L. ら、BioTechniques、12(6):864-869 (1992); 及び、Sawai, H. ら、AJRI、34:26-34 (1995); 及び、Better, M. ら、Science、240:1041-1043 (1988) に説明されたような、当技術分野において公知の方法を用い使用することができる (これらの参考文献は、その全体が本明細書に参照として組入れられている)。

【0009】

バクテリオファージにおいて構築された免疫グロブリンライブラリーは、ナイーブな又は特異的に免疫感作された個体の抗体産生細胞に由来し、かつ原則として、ヒト免疫グロブ

リン重鎖及び軽鎖の新規かつ多様な対形成を含む。この戦略は、固有のレパトリア制限 (repertoire limitation) により損なわれないが、発現された免疫グロブリン断片の相補性決定領域 (CDR) が細菌細胞において合成され、かつ適切に折り畳まれることが必要である。しかし、多くの抗原結合領域は、細菌細胞において融合タンパク質として正確に集成することが困難である。加えてこのタンパク質は、正常な真核細胞の翻訳後修飾を受けないと考えられる。結果として、この方法は、得られた抗体特異性に異なる選択フィルターを課している。

【0010】

従って、真核細胞において合成され、適切にグリコシル化され、かつ正確に集成されたバイアスのかかっていない免疫グロブリンレパトリアから、免疫グロブリン分子、及びそれらの抗原特異的断片を同定する別法の必要性が存在する。

10

【0011】

真核細胞発現ライブラリー 分子生物学の分野での基本的ツールは、ポリ (A) ⁺ mRNA の二本鎖 (ds) cDNA への転換であり、これはその後クローニングベクターに挿入され、かつ適当な宿主細胞において発現される。多くの cDNA クローニング戦略に共通の方法は、関心のある生物の細胞由来のポリ (A) ⁺ mRNA から cDNA クローンの収集である「cDNA ライブラリー」の構築に関連している。例えば、免疫グロブリン遺伝子を発現している cDNA を単離するために、プレ B 細胞、B 細胞、又は形質細胞から cDNA ライブラリーが調製される。繊維状バクテリオファージ、バクテリオファージ λ、コスミド及びプラスミドベクターを含む様々な発現ベクターにおいて cDNA ライブラリーを構築する方法は、公知である。一般に使用される方法の一部は、例えば、Sambrook らの「分子クローニング；実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第 2 版、Cold Spring Harbor Laboratory 出版、コールドスプリングハーバー、N. Y. (1990) に説明されている。

20

【0012】

cDNA ライブラリーから標的遺伝子を単離する多くの異なる方法が利用され、様々な成功がもたらされている。これらは、例えば、標的遺伝子の DNA 配列と相補的な配列を有する核酸断片が標識されている、核酸ハイブリダイゼーションプローブの使用を含む。この方法が、形質転換された細菌宿主の cDNA クローンに適用された場合は、このプローブに強力にハイブリダイズしているコロニー又はプラークは、恐らく標的 DNA 配列を含むと考えられる。しかしハイブリダイゼーション法は、特定の cDNA クローンが発現されているかどうかは必要とせず、又測定しない。別のスクリーニング法は、細菌宿主における発現に頼っており、例えば、コロニー又はプラークは、関心のあるタンパク質に対して生じた抗体に対する結合の免疫アッセイによりスクリーニングすることができる。しかし細菌宿主における発現のアッセイは、妨げられることが多く、その理由はこのタンパク質は、細菌宿主において十分には発現されず、劣悪なコンホメーションで発現され、かつ真核システムにおいてのようにはプロセッシング及び／又は輸送されないからである。これらの問題点の多くは、先に暗示したような、細菌宿主における免疫グロブリン分子作出の試みにおいて遭遇する。

30

40

【0013】

従って、免疫グロブリン分子をコードしている cDNA を単離するための哺乳類発現ライブラリーの使用は、細菌ライブラリーに勝るいくつかの利点を供すると考えられる。例えば、真核宿主において発現された免疫グロブリン分子、及びそれらのサブユニットは、機能性であるはずであり、かつ通常の翻訳後修飾を受けるはずである。通常細胞内膜システムを通して細胞表面に輸送されるタンパク質は、完全な輸送プロセスを受けるはずである。更に真核システムの使用は、真核 RNA 又はタンパク質の機能発現を基にしたポリヌクレオチドの単離を可能にすると考えられる。例えば、免疫グロブリン分子は、所定の抗原に関するそれらの特異性を基に単離される。

【0014】

50

いくつかの最近のCOS細胞における発現により単離されたリンホカインcDNAを除き (Wong, G. G. ら、Science、228:810-815 (1985); Lee, F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83:2061-2065 (1986); Yokota, T. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83:5894-5898 (1986); Yang, Y. ら、Cell、47:3-10 (1986))、ほとんどのcDNAは哺乳類発現ライブラリーから単離されていない。これにはふたつの主な理由があるように思われ：第一には、巨大なプラスミドライブラリーの構築のための現存する技術 (Okayama, H. ら、Mol. Cell Biol.、2:161-170 (1982)) は、マスターすることが困難であり、ファージクローニング技術 (Huynh, T. ら、「DNAクローニング (DNA Cloning)、第I巻、A Practical Approach, Glover, D. M. (編集)、IRL Press社、オックスフォード、(1985年)、49-78頁) により達成可能なライブラリーサイズには、近づくことが稀であるからである。第二には、現存するベクターは、ひとつの例外 (Wong, G. G. ら、Science、228:810-815 (1985)) を除き、高レベル発現への適合が難しいからである。従って、哺乳類宿主における発現は、より従来型クローニング法により単離された遺伝子によりコードされたタンパク質の同一性を証明する手段としてのみ最も頻繁に使用されている。

【0015】

ボックスウイルスベクター ボックスウイルスベクターは、真核細胞におけるタンパク質及び抗原の発現のための発現運搬体として広範に使用されている。様々な宿主細胞におけるワクシニアのクローニング及び繁殖の容易さは、外来タンパク質の発現のため、及びワクチン送達運搬体としてのボックスウイルスベクターの広範な使用につながっている (Moss, B.、Science、252:1662-7 (1991))。

【0016】

大きなDNAウイルスは、様々な細胞株においてそれらの未変性型で多くの異なるタンパク質を発現することができるような細胞プロセシングの研究にとって特に有用な発現ベクターである。加えて、組換えワクシニアウイルスにおいて発現された遺伝子産物は、効率的にプロセシングされかつ細胞傷害性T細胞の刺激についてMHCクラスIに関連して提示されることが示されている。関心のある遺伝子は、通常プラスミドにおいて、ウイルスの非必須領域に相同の配列にフランキングしたプロモーターの制御下でクローニングされ、かつこのカセットは、相同的組換えによりゲノムへ導入される。発現、選択及び検出のためのベクター一式は、様々なクローニング及び発現の戦略に順応するように考案されている。しかし相同的組換えは、複合体ライブラリーの作成に必要な状況又は関心のあるDNAが大きい場合には、組換えウイルスの作出には無効な手段である。挿入断片へのウイルスのDNA「アーム」の直接ライゲーション及びそれに続く感染性ウイルスのレスキューに頼った組換えゲノムの構築のための別の戦略は、ボックスウイルスゲノム (Merchhinsky ら、Virology、190:522-526 (1992); Pfeiderer ら、J. General Virology、76:2957-2962 (1995); Scheifflinger ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:9977-9981 (1992))、ヘルペスウイルスゲノム (Rixon ら、J. General Virology、71:2931-2939 (1990)) 及びバキュロウイルスゲノム (Ernst ら、Nucleic Acids Research、22:2855-2856 (1994)) の探索である。

【0017】

ボックスウイルスは、外来タンパク質を高レベルで発現するために容易に構築しかつ操作することができるので、真核細胞研究のための普遍的ベクターである。このウイルスの広範な宿主範囲は、様々な細胞型におけるタンパク質の忠実な発現を可能にする。直接のクローニング戦略が、組換えゲノムが、DNA断片のワクシニア「アーム」への直接的ライゲーション及びDNA混合物のヘルパーウイルスにより感染した細胞へのトランスフェク

ションによりインビトロにおいて構築されるような、ポックスウイルスのウイルスキメラの適用の範囲を広げるために考案されている (Merchliinskyら、Virology、190:522-526 (1992); Scheifflingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:9977-9981 (1992))。この方法は、外来タンパク質の高レベル発現 (Pfleidererら、J. Gen. Virology、76:2957-2962 (1995)) 及び長さが26 kbと大きい断片の効率的クローニング (Merchliinskyら、Virology、190:522-526 (1992)) に使用される。

【0018】

裸のワクシニアウイルスDNAは感染性ではなく、その理由は、このウイルスは、細胞転写機構を利用することができず、かつウイルスRNAの合成に関してはそれ自身のタンパク質に頼っているからである。これまでに、温度感受性条件付け致死性 (Merchliinskyら、Virology、190:522-526 (1992)) 又は非相同ポックスウイルス鶏痘 (Scheifflingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:9977-9981 (1992)) が、パッケージングのヘルパーウイルスとして利用されている。理想的なヘルパーウイルスは、インプットDNAからの感染性ウイルスの作成を効率的に促進するが、宿主細胞において複製することもワクシニアDNA産物と組換えることもないと考えられる。鶏痘ウイルスは、これらの理由により非常に有用なヘルパーウイルスである。これは、哺乳類細胞へ侵入することができ、かつインプットワクシニアウイルスDNAの複製に必要なタンパク質を提供する。しかし、これは、ワクシニアDNAとは組換えせず、かつ感染性鶏痘ビリオンは、哺乳類細胞においては作出されない。従って、これは比較的高い感染多重度 (MOI) で使用することができる。

【0019】

慣習的に、外来タンパク質コード配列は、感染性ウイルスによる相同的組換えにより、ポックスウイルスゲノムへ導入される。この従来型の方法において、先に単離された外来DNAは、ウイルスの複製には必須でないポックスウイルス中の領域に相同である配列によりフランキングされたワクシニアプロモーターの後ろへ伝達性プラスミドにおいてクローニングされる。この伝達性プラスミドは、ポックスウイルス-感染細胞へ導入され、伝達性プラスミド及びポックスウイルスゲノムの、相同的組換えによるインビボ組換えを可能にする。相同的組換えの結果として、外来DNAは、ウイルスのゲノムへ転移される。

【0020】

ポックスウイルスにおける従来型相同的組換えは、ポックスウイルスにおける先に単離された外来DNAの発現に有用であるが、この方法はライブラリーの構築には役に立たず、その理由は、回収されたウイルスの圧倒的多数は、外来DNA挿入断片を獲得していないからである。従来型相同的組換えを使用すると、組換え効率は、およそ0.1%又はそれ未満の範囲である。従ってポックスウイルスベクターの使用は、タンパク質発現及びワクチン開発の目的での、先に単離されたDNA分子のサブクローニングに限られている。

【0021】

直接的ライゲーションベクターを使用する別法は、相同的組換えに容易に順応し難いキメラゲノムの効率的構築のために開発されている (Merchliinsky, M. ら、Virology、190:522-526 (1992); Scheifflinger, F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:9977-9981 (1992))。このようなプロトコルにおいて、このゲノム由来のDNAは、消化され、挿入断片DNAにインビトロにおいてライゲーションされ、かつヘルパーウイルスに感染した細胞へトランスフェクションされる (Merchliinsky, M. ら、Virology、190:522-526 (1992); Scheifflinger, F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:9977-9981 (1992))。あるプロトコルにおいて、このゲノムは、独自のNot I部位において消化され、かつキメラゲノムの選択又は検出のためのエレメントを含むDNA挿入断片は

、ゲノムアームにライゲーションされる (Scheifflinger, F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:9977-9981 (1992))。この直接的ライゲーション法は、外来DNAのワクシニアウイルスゲノムへの挿入について説明されている (Pfleiderer ら、J. General Virology、76:2957-2962 (1995))。

【0022】

あるいは、このワクシニアWRゲノムは修飾され、HindIII F断片のNotI部位を取除き、かつこの座位での配列の挿入がチミジンキナーゼ遺伝子を破壊し、薬剤選択を使用することによりキメラゲノムの単離を可能にするように、チミジンキナーゼ遺伝子の近傍にNotI部位を再導入することにより、vNotI/tkを作出する (Merchlinsky, M. ら、Virology、190:522-526 (1992))。直接的ライゲーションベクターvNotI/tkは、長さが少なくとも26kb対の先に単離されたDNA挿入断片を効率的にクローニングしかつ繁殖することができる (Merchlinsky, M. ら、Virology、190:522-526 (1992))。大きいDNA断片は、このゲノムへ効率的にクローニングされるが、DNA挿入断片によりコードされたタンパク質は、ワクシニアにおいて比較的弱く発現された初期遺伝子クラス (early class gene) である、チミジンキナーゼ遺伝子に対応して低レベルで発現されるのみであると考えられる。加えてこのDNAは、NotI部位で両方向へ挿入され、その結果全く発現されないであろう。加えて、直接的ライゲーションを使用する組換え効率は、従来型の相対的組換えにより認められるものよりも高いが、得られる力価は比較的低い。

【0023】

従って、ボックスウイルスベクターは、クローン複合体集団からの関心のあるそれまで未知の遺伝子の同定には今までの所使用されておらず、その理由は高効率、高力価形成のクローニング法はボックスウイルスについては存在しなかったからである。しかしより最近になって、本発明者らは、三分子組換え (tri-molecular recombination) を用いて組換えボックスウイルスを作成する方法を開発した。2000年5月18日に公開され、その全体が本明細書に参照として組入れられている、Zaudererの国際公開公報第00/028016号を参照のこと。

【0024】

三分子組換えは、組換えボックスウイルスを作成するための、新規の高効率で高力価の形成法である。ワクシニアウイルスにおける三分子組換え法を使用し、本発明者らは、少なくとも90%の組換え効率、及び直接的ライゲーションにより得られるものよりも少なくとも2桁大きい力価を達成した。三分子組換え法に従い、ボックスウイルスゲノムは切断され、2個の非同相断片又は「アーム」を作成する。これら2個のボックスウイルスアームに相同の領域によりフランキングされた異種挿入断片DNAを保持する導入ベクターが作成される。これらのアーム及び導入ベクターは、レシピエントの宿主細胞へ送達され、これら3種のDNA分子のインピボにおける組換えを可能にする。この組換えの結果、2種のボックスウイルスアームの各々及び挿入断片DNAを含む単独のボックスウイルスゲノム分子が作成される。

【0025】

発明の概要

本発明の一つの局面に従い、真核細胞において発現されたポリヌクレオチドのライブラリーから、抗原特異的免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片をコードしているポリヌクレオチドを同定する方法が提供される。

【0026】

更に変更されたエフェクター機能を有する免疫グロブリン分子、又はそれらの断片をコードしているポリヌクレオチドを同定する方法も提供される。

【0027】

同じくウイルスベクターを用い、真核細胞において免疫グロブリンサブユニットポリペプ

チドをコードしているポリヌクレオチドのライブラリーを構築する方法も提供され、ここでこれらのライブラリーは、三分子組換えにより構築される。

【0028】

更に、抗原誘導型細胞死、抗原誘導型シグナル伝達、又は抗原特異的結合の選択及び／又はスクリーニングにより、それらの表面上に抗原特異的免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現している宿主細胞を同定する方法も提供される。

【0029】

同じく、抗原結合による又は免疫グロブリン分子の抗原特異的もしくは生物特異的機能の検出により、可溶性の分泌された免疫グロブリン分子をコードしているポリヌクレオチドのライブラリーを発現している真核宿主細胞から発現された可溶性免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片のスクリーニングする方法も提供される。 10

【0030】

好ましい態様の詳細な説明

本発明は、真核システムにおいて、機能的抗原特異的免疫グロブリン分子、又はそれらの抗原特異的断片（すなわち、抗原結合断片）を同定および／または製造する方法を広く目的としている。加えて本発明は、そのような免疫グロブリン分子又は断片をコードしているポリヌクレオチドの複合発現ライブラリーから、抗原特異的免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片をコードしているポリヌクレオチドを同定する方法を目的とし、ここでこれらのライブラリーは、真核宿主細胞において構築及びスクリーニングされている。更なる態様は、前記方法のいずれかにより製造された、単離された抗原特異的免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片、並びにこのような単離された免疫グロブリンの作成を可能にするキットを含む。 20

【0031】

特に好ましい本発明の局面は、三分子組換えにより構築されたボックスウイルスベクターを用いる、真核宿主細胞における複合免疫グロブリンライブラリーの構築である。ボックスウイルスベクターのベクターにおいて複合cDNAライブラリーを構築する能力、並びに抗原が誘導した細胞死、抗原が誘導したシグナル伝達、又は抗原特異的結合のいずれかを基にした特異的組換え体を選択及び／又はスクリーニングする能力は、真核細胞において様々な良く定義された特異性を伴う免疫グロブリン、特にヒト免疫グロブリンの同定の基礎となることができる。これは齧歯類における抗体レパトアの選択により付与されるパイアス又はファージもしくは細菌における合成及び集成の制限を克服すると考えられる。 30

【0032】

「ある（a， a_n）」実体という用語は、1種又は複数のその実体を意味し；例えば、「ある免疫グロブリン分子」は、1個又は複数の免疫グロブリン分子を表わしていると理解されるべきである。このように「ある（a）」（又は「a_n」）、「1個又は複数」及び「少なくとも1個」という用語は、本明細書において互換的に使用される。

【0033】

「真核生物」又は「真核生物」という用語は、原虫、真菌、酵母、緑藻類、単細胞植物、多細胞植物、並びに脊椎及び無脊椎動物の両方の全ての動物を含む、動物界、植物界、及び原生生物界の全ての生体を包含することが意図されている。この用語は、細菌又はウイルスは包含していない。「真核細胞」は、単数の「真核細胞」に加え、複数の「真核細胞」を包含し、かつ真核生物由来の細胞を含むことが意図されている。 40

【0034】

「脊椎動物」という用語は、単数の「脊椎動物」に加え、複数の「脊椎動物」を包含し、かつ哺乳類、鳥類に加え、魚類、爬虫類、及び両生類を含むことが意図されている。

【0035】

「哺乳類」という用語は、単数の「哺乳類」及び複数の「哺乳類」を包含することが意図され、かつヒト；類人猿、サル、オランウータン、及びチンパンジーのような霊長類；イヌ及びオオカミのようなイヌ科；ネコ、ライオン、及びトラのようなネコ科；ウマ、ロバ及びシマウマのようなウマ科；ウシ、ブタ及びヒツジのような食用動物；シカ及びキリン 50

のような有蹄類；マウス、ラット、ハムスター及びモルモットのような齧歯類；並びにクマを含むが、これらに限定されるものではない。好ましい哺乳類は、ヒト対象である。

【0036】

「組織培養」もしくは「細胞培養」又は「培養物」もしくは「培養」という用語は、インビトロにおける、細胞構造の保存、細胞機能の保存、更には分化、又は3種全てを可能にする条件下での、植物又は動物の組織又は細胞の維持又は成長を意味する。「初代組織細胞」は、組織から直接採取されたもの、すなわち生体において同じ機能を発揮する同じ種類の細胞の集団である。このような組織細胞のタンパク質分解酵素トリプシンによる処理は、例えば、これらを、培養プレート上に播種した場合に、細胞構造が成長又は維持される個々の初代組織細胞へ解離する(dissociate)。組織培養物における初代細胞の操作から生じる細胞培養物は、「二次細胞培養物」と称される。ほとんどの二次細胞は、有限回数分裂し、その後死滅する。しかしわずかな二次細胞は、この「危機的期間」を通過し、その後これらは無限に複製し、継続的「細胞株」を形成することができる。細胞が培養される液体培地は、本明細書において、「培養培地」又は「培養媒質」と称される。望ましい分子、例えば免疫グロブリン分子が細胞の培養時に分泌される培養培地は、本明細書において「馴化培地」と称される。

10

【0037】

「ポリヌクレオチド」という用語は、核酸又は構築物中に存在する、1種又は複数の核酸セグメント、又は核酸分子、例えばDNA又はRNA断片を意味する。「免疫グロブリンサブユニットをコードしているポリヌクレオチド」は、このようなポリペプチドのコード領域を含むポリペプチドを意味する。加えて、ポリヌクレオチドは、プロモーター又は転写ターミネーターのような調節エレメントをコードすることができるか、もしくは分泌シグナルペプチド又は機能ドメインのような、ポリペプチド又はタンパク質の特異的エレメントをコードすることができる。

20

【0038】

本明細書において使用される「同定する」という用語は、所望の分子、例えば所望の特異性又は機能を伴う免疫グロブリン分子をコードしているポリヌクレオチドが、そのような分子の複数の又はライブラリーから識別されるような方法の意味する。同定法は、「選択」及び「スクリーニング」を含む。本明細書において使用される「選択」法は、所望の分子がライブラリーから直接分離されるようなものである。例えば、本明細書に説明されたある選択法において、所望のポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、溶解事象を受けることにより、そのライブラリーの残余を含む宿主細胞から直接分離され、かつこれにより宿主細胞の残余が付着した基質から放出される。本明細書において使用される「スクリーニング」法は、所望の分子を含むプールに、この所望の分子を検出することができるようなアッセイが施されるようなものである。この分子が検出されるプールのアリコートは、その後連続してより小さいプールに分割され、これは同様にアッセイされ、これが所望の分子が高度に濃縮されたプールに達するまで続けられる。例えば、本明細書において説明されたひとつのスクリーニング法において、免疫グロブリン分子をコードしているポリヌクレオチドライブラリーを含む宿主細胞のプールは、レポーター分子の発現を介して、抗原結合についてアッセイされる。

30

40

【0039】

免疫グロブリン 本明細書において使用される「免疫グロブリン分子」とは、完全な二分子免疫グロブリンとして定義され、すなわち一般的には、4個の「サブユニットポリペプチド」、すなわち2個の同一重鎖及び2個の同一軽鎖を含む。場合によっては、例えばラクダ科の種に由来する免疫グロブリン分子か、もしくはラクダ科の免疫グロブリン分子を基に操作したような免疫グロブリン分子などの場合、完全な免疫グロブリン分子は、重鎖のみからなり、軽鎖を伴わない。例えば、Hammers-Castermanら、Nature、363:446-448(1993)参照。従って「免疫グロブリンサブユニットポリペプチド」は、単独の重鎖ポリペプチド又は単独の軽鎖ポリペプチドを意味する。免疫グロブリン分子は「抗体」とも称され、かつこれらの用語は本明細書において互換的

50

に使用される。「単離された免疫グロブリン」は、タンパク質又は他の物質の環境から実質的に除去され、かつ特異的抗原に結合している、ひとつの免疫グロブリン分子、又は2個もしくはそれ以上の免疫グロブリン分子を意味する。

【0040】

免疫グロブリン分子の「クラス」を決定する重鎖は、比較的大きい2個のサブユニットポリペプチドであり、可変領域及び定常領域を含む。「重鎖」は、完全長の分泌された重鎖型、すなわち細胞から放出されるもの、もしくは膜結合した重鎖型、すなわち膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを含むもののいずれかを意味する。膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインは、ある種の重鎖に関連した天然のドメインであり、すなわちこのドメインは、記憶B細胞上に認められるか、もしくは例えば異なる免疫グロブリンクラス由来又は異種ポリペプチド、すなわち非免疫グロブリンポリペプチド由来のような、異種膜貫通及び細胞内ドメインである。本発明のある局面は、細胞膜に結合した免疫グロブリン分子を用いて実行されることが好ましいが、別の局面は、分泌された免疫グロブリン分子、すなわち膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを欠くものを用いて実行されることが好ましいことが明らかになる。免疫グロブリン「クラス」は、宿主において異なる機能を果たす免疫グロブリンの広範なグループを意味する。例えば、ヒト免疫グロブリンは、5種のクラス、すなわち、 γ 重鎖を含むIgG、 μ 重鎖を含むIgM、 α 重鎖を含むIgA、 ϵ 重鎖を含むIgE、及び δ 重鎖を含むIgDに分けられる。免疫グロブリンのあるクラスは更に、「サブクラス」に分けられる。例えば、ヒトにおいて、4種の異なるIgGサブクラス、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4があり、各々、 $\gamma-1$ 、 $\gamma-2$ 、 $\gamma-3$ 、及び $\gamma-4$ 重鎖を含み、かつ2種類のIgAサブクラス、IgA-1及びIgA-2があり、各々、 $\alpha-1$ 及び $\alpha-2$ 重鎖を含む。免疫グロブリンのこれらのクラス及びサブクラスの表記は、動物種間で変動し、ある動物種は追加の免疫グロブリンクラスを含むことは注意しなければならない。例えば、鳥類は、IgYを生成し、これは卵黄に認められる。

【0041】

「軽鎖」は、重鎖のアミノ末端領域に結合している比較的小さい免疫グロブリンサブユニットを意味する。重鎖のように、軽鎖は、可変領域及び定常領域を含む。2種の異なる軽鎖の種類、 κ 及び λ が存在し、これらの対は、様々な重鎖のいずれかの対と結合し、免疫グロブリン分子を形成している。

【0042】

免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは、各々、定常領域及び可変領域を含む。ほとんどの種において、重鎖可変領域又は V_H ドメイン、及び軽鎖可変領域又は V_L ドメインは一緒に、「相補性決定領域」又はCDRを形成し、これは抗原エピトープを特異的に認識する免疫グロブリン分子の一部である。しかし、ラクダ科の種において、 $V_H H$ と称される重鎖可変領域は、全CDRを形成している。ラクダ科の $V_H H$ 可変領域と通常の抗体(V_H)由来のものとの大きな違いは、(a) $V_H H$ の対応する領域と比べ V_H の軽鎖接触面におけるより多くの疎水性アミノ酸、(b) $V_H H$ 中のより長いCDR3、及び(c) 頻出する $V_H H$ 中のCDR1とCDR3の間のジスルフィド結合を含む。完全な免疫グロブリン分子は各々、2個の同一CDRを含む。重鎖及び軽鎖定常領域に結合された可変領域の大きいレパトアは、所定の可変領域をコードしている遺伝子の形成を生じる一連の生殖系列DNAセグメントの再構成を通じ、動物の抗体産生細胞の分化時に形成される。重鎖及び軽鎖可変領域の更なる変動は、分化した細胞における体細胞変異を介して生じる。免疫グロブリン分子の構造及びインビボ形成は、免疫学の分野の業者にはよく理解されている。免疫グロブリンの多様性の形成に関する簡潔な検証は、例えば、Harlow及びレーン、「抗体、実験マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)、Cold Spring Harbor Laboratory、コールドスプリングハーバー、N. Y. (1988) (以後「Harlow」と称す)；並びに、Roittら、「免疫学(Immunology)、Gower Medical Publishing社、ロンドン(1985) (以後「Roitt」と称す)に見ることができる。Harlow及びRoittは、その全体が本明細書に参照として組入れられ

ている。

【0043】

免疫グロブリンは更に、エフェクター分子の結合により媒介されたいくつかのエフェクター機能を有する。例えば、免疫グロブリンに対する補体のC1成分の結合は、補体システムを活性化する。補体活性化は、細胞病原体のオプソニン作用及び溶解において重要である。補体活性化は、炎症反応も刺激し、かつ自己免疫過敏症に関連することもある。更に免疫グロブリンは、Fc領域を介して細胞に結合し、抗体のFc領域上のFc受容体部位は、細胞上のFc受容体(FcR)に結合する。抗体の異なるクラスに特異的であるFc受容体が多く存在し、これはIgG(γ 受容体)、IgE(η (eta)受容体)、IgA(α 受容体)及びIgM(μ 受容体)を含むが、これらに限定されるものではない。抗体の細胞表面上のFc受容体への結合は、多くの重要かつ多様な生体反応の引き金となり、これは抗体で被覆された粒子の貪食(engulfment)及び破壊、免疫複合体のクリアランス、抗体で被覆された標的細胞のキラー細胞による溶解(抗体依存性細胞性細胞傷害作用、又はADCC)、炎症メディエーターの放出、胎盤通過(placental transfer)及び免疫グロブリン産生の制御を含む。

【0044】

本発明の免疫グロブリンは、鳥類、魚類、及び哺乳類を含む、いずれかの動物に起源することができる。好ましくはこれらの抗体は、ヒト、マウス、イヌ、ネコ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、又はニワトリ起源である。好ましい本発明の局面において、「自己」抗原と特異的に相互作用する免疫グロブリン、例えば、ヒト抗原に特異的に結合するヒト免疫グロブリンが、同定される。

【0045】

本明細書において使用される免疫グロブリン分子の「抗原特異的断片」とは、抗原に結合することが依然可能である免疫グロブリン分子の断片又は変種のいずれかである。抗原特異的断片は、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fd、単鎖Fv(scFv)、単鎖免疫グロブリン(例えば、ここでは重鎖又はそれらの一部、及び軽鎖又はそれらの一部が融合されている)、ジスルフィド結合したFv(sdFv)、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、scFvミニ抗体、Fabミニ抗体、及び二量体scFv、並びに特異的CDRが形成されるようなコンホメーションでV_L及びV_Hドメインを含むいずれか他の断片を含むが、これらに限定されるものではない。抗原特異的断片も、ラクダ抗体由来のV_HHドメインを含むことができる。V_HHは、他の種からのCDR、例えばヒト抗体からのCDRを含むように操作することもできる。あるいは、ヒト由来の重鎖V_H断片は、単鎖ラクダCDRに類似するように操作することができ、このプロセスは「ラクダ化(camelization)」と称される。例えば、Davies J. 及びRiechmann, L.、FEBS Letters、339:285-290(1994)、並びにRiechmann, L. 及びMuyldermans, S.、J. Immunol. Meth.、231:25-38(1999)を参照し、これらは両方とも全体が本明細書に参照として組入れられている。

【0046】

単鎖免疫グロブリンを含む抗原特異的免疫グロブリン断片は、可変領域(複数)を単独で又は下記の全体もしくは一部と組合わせて含むことができる:重鎖定常ドメイン、又はその一部、例えば重鎖上の、CH1、CH2、CH3、膜貫通及び/又は細胞質ドメイン、並びに、軽鎖定常ドメイン、例えば軽鎖上の、C_κもしくはC_λドメイン、又はそれらの一部。更に本発明には、可変領域(複数)並びにCH1、CH2、CH3、C_κ、C_λ、膜貫通及び/又は細胞質ドメインの組合せも含まれる。

【0047】

当技術分野において公知であるように、Fvは、VHドメイン及びVLドメインを含み、Fabは、CH1及びL鎖に結合したVHを含み、Fabミニ抗体は、CH3ドメインのFabなどへの融合を含む。

【0048】

当技術分野において公知であるように、s c F v は、通常長さが 15 ～ 20 残基であるペプチドリンカーにより V L に結合した V H を含み、二重特異性抗体は、長さ約 5 残基のペプチドリンカーを伴う s c F v を含み、三重特異性抗体は、ペプチドリンカーを伴わない s c F v を含み、四重特異性抗体は、長さ約 1 残基のペプチドリンカーを伴う s c F v を含み、s c F v ミニ抗体は、C H 3 ドメインの s c F v への融合を含み、並びに二量体 s c F v は、別のペプチドリンカーを使用する 2 個の s c F v の縦列での融合を含む（検証は、Chames 及び Batty、FEMS Microbiol. Lett s.、189：1-8（2000））。好ましくは、抗原特異的免疫グロブリン断片は、両方の抗原結合ドメイン、すなわち V_H 及び V_L を含む。他の免疫グロブリン断片は、当技術分野において周知であり、本明細書に記されたような周知の参考文献において明らかにされている。

10

【0049】

ある態様において、本発明は、抗原特異的免疫グロブリン分子、それらの抗原特異的断片、又は特異的抗原結合機能を持つ免疫グロブリン分子もしくは断片を、単独で又は集合的にコードしているポリヌクレオチドを同定する、すなわち、選択あるいはスクリーニングする方法を描いている。関連した態様において、本発明は、これらの方法により同定されたポリヌクレオチドによりコードされた単離された免疫グロブリン分子を描いている。

【0050】

好ましい方法は、二段階スクリーニング及び／又は選択プロセスを含む。第一の段階において、第一の免疫グロブリンサブユニット、すなわち重鎖又は軽鎖のいずれかをコードしているポリヌクレオチドは、そのライブラリーを真核宿主細胞集団に導入し、この免疫グロブリンサブユニットを第二の免疫グロブリンサブユニットの 1 種又は複数種と組合わせて発現することにより、そのサブユニットをコードしているポリヌクレオチドのライブラリーから同定され、ここで第二の免疫グロブリンサブユニットは、第一の免疫グロブリンサブユニットと同じではなく、すなわち、第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドが重鎖ポリペプチドである場合は、第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは軽鎖ポリペプチドであろう。

20

【0051】

第一の段階において、1 種又は複数の第一の免疫グロブリンサブユニットをコードしている 1 種又は複数のポリヌクレオチドがライブラリーから一旦単離されたならば、第二の免疫グロブリンサブユニットが、第二の段階において同定される。単離された第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチド（複数）をコードしている単離されたポリヌクレオチドは、宿主細胞へ移され、かつ宿主細胞において発現され、ここで第二の免疫グロブリンサブユニットをコードしているポリヌクレオチドのライブラリーが発現され、これにより第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの同定が可能であり、これは第一の段階で同定された第一の免疫グロブリンサブユニットと一緒にされた場合には、機能的免疫グロブリン分子、又はそれらの断片を形成し、これは、特異的抗原を認識し及び／又は特異的機能を発揮する。

30

【0052】

免疫グロブリン断片がひとつのポリペプチドで構成される、すなわち単鎖断片又は V_H H ドメインを含む断片であり、その結果ひとつのポリヌクレオチドによりコードされている場合、好ましい方法は、一段階スクリーニング及び／又は選択プロセスを含む。重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、もしくは V_H H 領域を含む単鎖断片をコードしているポリヌクレオチドは、ライブラリーの真核細胞のような宿主細胞への導入、及び免疫グロブリン断片をコードしているそれらの宿主細胞からの該ライブラリーのポリヌクレオチドの回収により、ライブラリーから同定される。

40

【0053】

ある態様において、特定の免疫グロブリン分子は、抗原に対する免疫グロブリン分子をそれらの表面に発現している宿主細胞との接触を介して同定され、これは、以下に説明するような多くの異なる方法での抗原結合細胞の選択及び／又はスクリーニングを可能にする

50

。別の態様において、所望の可溶性の分泌された免疫グロブリン分子は、例えばウイルス中和のような、免疫グロブリン分子の所望の機能特性に関する馴化培地のプールのアッセイにより同定される。

【0054】

免疫グロブリン分子が宿主細胞表面に結合される場合、第一の段階は、転写調節領域との操作可能な結合を介した複数の第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの第一のライブラリーを、免疫グロブリン分子を発現することが可能な宿主細胞集団へ導入すること、転写調節領域との操作可能な結合を介して、複数の第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを第二のライブラリーの同じ宿主細胞へ導入すること、宿主細胞の膜表面上の免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の発現を許容すること、宿主細胞を抗原と接触すること、並びに抗原に結合しているこれらの宿主細胞から第一のライブラリー由来のポリヌクレオチドを回収することを含む。

10

【0055】

免疫グロブリン分子が完全に細胞培地に分泌されている場合、第一の段階は、転写調節領域との操作可能な結合を介した複数の第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの第一のライブラリーを、免疫グロブリン分子を発現することが可能な宿主細胞集団へ導入すること、転写調節領域との操作可能な結合を介して、複数の第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを第二のライブラリーの同じ宿主細胞へ導入すること、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の発現及び細胞培地への分泌を許容すること、所望の抗原に結合した抗体機能についての馴化培地のアリコートを実行すること、並びに所望の機能が認められた馴化培地において増殖したこれら宿主細胞プールからの第一のライブラリー由来のポリヌクレオチドを回収することを含む。

20

【0056】

本明細書において使用される「ライブラリー」とは、ポリヌクレオチドの代表的部類 (genus)、すなわち例えば、単独の動物種、組織型、臓器、又は細胞型のそれらの起源を通じて関連したポリヌクレオチド群であり、ここでライブラリーは、ポリヌクレオチドの所定の部類内の少なくともふたつの異なる種を集合的に含む。ポリヌクレオチドライブラリーは、好ましくは、ポリヌクレオチドの所定の部類内の少なくとも 10 、 100 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 又は 10^9 種の異なる種を含む。より詳細には、本発明のライブラリーは、複数の特定の免疫グロブリンサブユニットポリペプチド、すなわち重鎖サブユニットポリペプチド又は軽鎖サブユニットポリペプチドのいずれかをコードしている。この状況において、本発明の「ライブラリー」は、共通の部類のポリヌクレオチドを含み、この部類は、ある型及びクラスの免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドであり、例えばライブラリーは、ヒト μ 、 $\gamma-1$ 、 $\gamma-2$ 、 $\gamma-3$ 、 $\gamma-4$ 、 $\alpha-1$ 、 $\alpha-2$ 、 ϵ 、もしくは δ 重鎖、又はヒト κ もしくは λ 軽鎖をコードし得る。本発明のいずれかひとつのライブラリーの各メンバーは、同じ重鎖又は軽鎖定常領域をコードし、このライブラリーは、集合的に少なくとも 2 種、好ましくは少なくとも 10 、 100 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 又は 10^9 種の異なる可変領域を含み、すなわち「複数」の可変領域が共通の定常領域に結合されていると考えられる。

30

40

【0057】

別の態様において、ライブラリーは、軽鎖可変領域又は重鎖可変領域のような可変領域を含む、好ましくは軽鎖可変領域及び重鎖可変領域の両方を含む複数の免疫グロブリン単鎖断片をコードしている。任意に、このようなライブラリーは、ある型及びクラスの免疫グロブリンサブユニットポリペプチド、又はそれらのドメインをコードしているポリヌクレオチドを含む。

【0058】

ある局面において、本発明は、免疫グロブリンサブユニットをコードしているポリヌクレ

50

オチドのライブラリーを作成する方法を包含している。更に本発明は、本明細書に記された方法に従い真核発現ベクターにおいて構築された免疫グロブリンサブユニットのライブラリーを包含している。このようなライブラリーは、好ましくは、真核ウイルスベクターにおいて、更により好ましくはポックスウイルスベクターにおいて作成される。このような方法及びライブラリーは、本明細書において説明されている。

【0059】

「レシピエント細胞」又は「宿主細胞」又は「細胞」は、本発明のポリヌクレオチドライブラリーが導入される細胞又は細胞集団を意味する。本発明の宿主細胞は、好ましくは真核細胞又は細胞株であり、好ましくは植物、動物、脊椎動物、哺乳類、齧歯類、マウス、霊長類又はヒトの細胞又は細胞株である。「宿主細胞の集団」は、本発明の「ライブラリー」が導入されかつ発現される培養された細胞の群を意味する。所定のベクターにおいて構築された所定のライブラリーからの発現を支持するあらゆる宿主細胞が意図されている。適当かつ好ましい宿主細胞は、本明細書において明らかにされている。更に、特定のベクター並びに特定の選択及び／又はスクリーニング計画との併用が好ましいある宿主細胞が、本明細書において明らかにされている。宿主細胞集団を単独培養すること、すなわち集団内の各細胞が同じ細胞型であることは好ましいが、細胞の混合培養も企図されている。本発明の宿主細胞は、接着性であることができ、すなわち、増殖した宿主細胞は、固形基質に接着するか、あるいはこの宿主細胞は懸濁状態であることができる。宿主細胞は、原発性腫瘍由来の細胞、転移性腫瘍由来の細胞、初代細胞、接触阻害を喪失した細胞、形質転換された初代細胞、不死化された初代細胞、アポトーシスを受ける細胞、及びそれら由来の細胞株であることができる。

10

20

【0060】

前述のように、免疫グロブリン分子を同定する好ましい方法は、宿主細胞集団へのポリヌクレオチドの「第一の」ライブラリーの導入に加え、同じ宿主細胞集団へのポリヌクレオチドの「第二の」ライブラリーの導入を含む。この第一及び第二のライブラリーは相補的であり、すなわち、「第一の」ライブラリーが免疫グロブリン重鎖をコードしているならば、「第二の」ライブラリーは免疫グロブリン軽鎖をコードし、これにより宿主細胞集団における免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の集成が可能である。さらに前述のように、免疫グロブリン又は免疫グロブリン断片を同定する別法は、単鎖断片をコードしているポリヌクレオチドの単独のライブラリーの宿主細胞集団への導入を含む。従って、ポリヌクレオチドライブラリー、ライブラリー内のポリヌクレオチドの組成、及びポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチドの説明は、「第一のライブラリー」を含むポリヌクレオチド及び「第二のライブラリー」を含むポリヌクレオチドの両方、並びにこれらによりコードされたポリペプチドを包含している。これらのライブラリーは、いずれか適当なベクターにより構築され得るが、両方のライブラリーが同じベクターで構築されてもよいが、必ずしもではない。第一及び第二のライブラリーのための適当かつ好ましいベクターは以下に明らかにする。

30

【0061】

本発明のライブラリーに含まれたポリヌクレオチドは、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドを、「転写調節領域との操作可能な結合」を介してコードしている。所定のポリヌクレオチド内の1個又は複数の核酸分子は、それらが操作可能な関係で配置された場合には、「操作可能に結合され」ている。この関係は、ポリペプチドのコード領域と、適当な分子（例えば、転写アクチベータータンパク質、ポリメラーゼなど）が調節配列（複数）に結合された場合にこのコード領域の発現を許容する方法で結合された調節配列（複数）の間の関係であることができる。「転写調節領域」は、プロモーター、エンハンサー、オペレーター、及び転写終結シグナルを含むが、これらに限定されるものではなく、その転写を指示するためにこのポリヌクレオチドと共に含まれる。例えば、プロモーターが核酸分子の転写に影響することが可能であるならば、プロモーターは、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている核酸分子と操作可能に結合される。一般に、「操作可能に結合された」とは、DNA配列がポリヌクレオチドにおいて隣接しているか又は

40

50

密接に結合されていることを意味する。しかし、一部の転写調節領域、例えばエンハンサーは、隣接していなければならないことはない。

【0062】

「調節配列」又は「調節領域」は、特定の宿主生物において操作可能に結合されたコード配列の発現に必要なDNA配列を意味する。原核生物に適した調節配列は、例えば、プロモーター、任意にオペレーター配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを利用することがわかっている。

【0063】

様々な転写調節領域が、当業者に公知である。好ましい転写調節領域は、脊椎動物細胞中で機能するものを含み、例えば、ポックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、例えばヒトサイトメガロウイルス（好ましくは、前初期プロモーター、好ましくはイントロン-Aとの複合において）、シミアンウイルス40（好ましくは初期プロモーター）、レトロウイルス（例えばラウス肉腫ウイルス）、及びピコナウイルス（特に内部リボソーム結合サイト又はIRES、エンハンサー領域、本明細書においてはCITE配列とも称される）からのプロモーター配列及びエンハンサー配列などであるが、これらに限定されるものではない。他の好ましい転写調節領域は、哺乳類遺伝子由来のもの、例えばアクチン、熱ショックタンパク質、及びウシ成長ホルモン、更には真核細胞における遺伝子発現の制御が可能である他の配列を含む。追加の適当な転写調節領域は、組織特異的プロモーター及びエンハンサーに加え、誘導可能なプロモーター（例えば、テトラサイクリンにより誘導可能なプロモーター、及び温度感受性プロモーター）を含む。より詳細に以下に考察するように、特に好ましいのは、ポックスウイルス感染細胞の細胞質において機能することが可能なプロモーターである。

【0064】

ある好ましい態様において、各「免疫グロブリンサブユニットポリペプチド」、すなわち、「第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチド」又は「第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチド」のいずれかは、(i)重鎖定常領域、重鎖定常領域の膜結合型又は重鎖定常領域の完全な分泌型のいずれか；並びに、軽鎖定常領域からなる群より選択される、第一の免疫グロブリン定常領域、(ii)第一の定常領域に相当している免疫グロブリン可変領域、すなわち、免疫グロブリン定常領域が重鎖定常領域である場合には、免疫グロブリン可変領域は、好ましくはV_H領域を含み、かつ免疫グロブリン定常領域が軽鎖領域である場合には、免疫グロブリン可変領域は、好ましくはV_L領域を含むようなもの、並びに、(iii)膜結合又は完全に分泌された重鎖、又は重鎖に結合した軽鎖のいずれかとして、小胞体を介して及び宿主細胞形質膜を通して、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの輸送を指示することが可能なシグナルペプチドを含む。従って、2種の同一重鎖及び2種の同一軽鎖の結合により、表面免疫グロブリン分子又は完全に分泌された免疫グロブリン分子のいずれかが形成される。

【0065】

同じく免疫グロブリン断片の状況のある好ましい態様において、単鎖断片は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域からなる群より選択される免疫グロブリン可変領域を含み、好ましくは両方の可変領域を含む。免疫グロブリン断片が重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の両方を含む場合、これらは直接結合される（すなわち、これらはペプチドも他のリンカーも有さない）か、もしくはこれらは別の手段により結合される。これらが別の手段により結合される場合は、これらは以下に考察するように、直接又は発現時に形成されたジスルフィド結合又はペプチドリンカーにより結合される。従って、重鎖可変領域と軽鎖可変領域の結合を介して、CDRが形成される。

【0066】

リンカーの種類に応じて、ひとつの単鎖断片の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、互いに結合することができるか、もしくはひとつの単鎖断片の重鎖可変領域は、他の単鎖断片の軽鎖可変領域と結合することができ、及びその逆も当てはまる。ひとつの態様において、単鎖断片は、重鎖定常領域、又はそれらのドメイン、及び軽鎖定常領域、又はそれらのド

メインからなる群より選択される定常領域も含む。2種の単鎖断片は、それらの定常領域を介して他方に結合することができる。

【0067】

前述のように、ある態様において、単鎖断片の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域をコードしているポリヌクレオチドは、リンカーをコードしている。この単鎖断片は、配列 V_H - リンカー - V_L 又は V_L - リンカー - V_H を伴う単独のポリペプチドを含むことができる。一部の態様において、リンカーは、単独のポリペプチドの重鎖及び軽鎖が、それらの適切なコンホメーション配向において互いに結合することが許容されるように選択される。例えば、Huston, J. S. ら、Methods in Enzymol., 203: 46-121 (1991) 参照。従ってこれらの態様において、リンカーは、未変性の Fv コンホメーションの歪みを伴わずに可変ドメインへ融合するそれらの地点間の距離が 3.5 nm の幅でなければならない。これらの態様において、リンカーを構成しているアミノ酸残基は、この距離の幅であることができ、かつ 5 個のアミノ酸又はそれよりも長くなければならない。5 個のアミノ酸型のリンカーを伴う単鎖断片は、単量体及び優先的には二量体型で認められる。好ましくは、このリンカーは、長さが少なくとも約 10 個又は少なくとも約 15 個の残基である。別の態様において、リンカー長は、scFv 四量体（四重特異性抗体）の形成を促進するように選択され、かつ長さ 1 個のアミノ酸である。一部の態様において、可変領域は、scFv 三量体（三重特異性抗体）の形成を促進するために直接結合される（すなわち、単鎖断片はペプチドリンカーを含まない）。これらの変型は当技術分野において周知である。（例えば、Chames 及び Batty, FEMS Microbiol. Lett., 189: 1-8 (2000) 参照）。このリンカーは、結合部位と立体障害を引き起してはならない。従ってこれは、好ましくは長さが約 25 残基又はそれ未満である。

【0068】

ペプチドリンカーのアミノ酸は、好ましくは、リンカーが親水性であり、その結果抗体に埋もれないように選択される。リンカー (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (配列番号: 6) は、十分な柔軟性 (flexibility) を提供するので、これは多くの抗体に広範に適用可能な好ましいリンカーである。他のリンカーとしては以下のものが含まれる:

Glu

Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser (配列番号: 7), Glu

Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr (配列番号: 8), Glu Gly

Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln (配列番号: 9), Glu Gly

Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp (配列番号: 10), Gly Ser Thr

Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly (配列番号: 11), Lys Glu Ser Gly

Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser Leu Asp (配列番号: 12), および

Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp (配列番

号: 13).

あるいは、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (配列番号: 6) リンカーのようなリンカーは、いずれかの配列を利用することができるが、突然変異誘発されるか、もしくはこのリンカー内のアミノ酸がランダム化され、ファージディスプレイベクター又は本発明の方法を用い、異なるリンカーを伴う抗体が、最高の親和性又は表現型に対する最大の作用に関してスクリーニング又は選択される。より短いリンカーの例は、前記リンカーの断片を含み、かつより長いリンカーの例は、前記リンカーの組合せ、前記リンカー断片の組合せ、及び前記リンカーの前記リンカー断片との組合せを含む。

【0069】

前述の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの変種又は断片である免疫グロブリンサ

ブユニットポリペプチドも好ましい。免疫グロブリン分子の抗原結合断片を生じるいずれかの変種又は断片も企図されている。このような変種は、宿主細胞表面へ、例えば天然の膜貫通ドメインとの結合を介して、受容体ーリガンド相互作用を介して、又は異種膜貫通ドメインとの融合として接着することができるか、もしくは細胞培地へ分泌することができる。免疫グロブリン分子の抗原結合断片の例は、本明細書に説明されている。

【0070】

免疫グロブリンサブユニットポリペプチドが重鎖ポリペプチドを含むようなこれらの態様において、いずれかの動物種由来の免疫グロブリン重鎖が意図されている。適当で好ましい免疫グロブリン重鎖は、本明細書において説明されている。鳥類、特にニワトリ、魚類、及び哺乳類のような脊椎動物由来の免疫グロブリン重鎖が含まれ、哺乳類免疫グロブリン重鎖が好ましい。哺乳類免疫グロブリン重鎖の例は、ヒト、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、ヤギ、ラット、ヒツジ、ウシ、ブタ、モルモット、ラクダ、ラマ、及びハムスターの免疫グロブリン重鎖を含む。これらの中で、ヒト免疫グロブリン重鎖が特に好ましい。更にマウス／ヒトハイブリッドの免疫グロブリン重鎖又は「ラクダ化された」ヒト免疫グロブリン重鎖のような1種又は複数種由来の重鎖の一部を含む、ハイブリッド免疫グロブリン重鎖も企図されている。ヒト免疫グロブリン重鎖の中で、本発明の免疫グロブリン重鎖は、好ましくは μ 重鎖、すなわちIgM免疫グロブリンの重鎖、 $\gamma-1$ 重鎖、すなわちIgG1免疫グロブリンの重鎖、 $\gamma-2$ 重鎖、すなわちIgG2免疫グロブリンの重鎖、 $\gamma-3$ 重鎖、すなわちIgG3免疫グロブリンの重鎖、 $\gamma-4$ 重鎖、すなわちIgG4免疫グロブリンの重鎖、 $\alpha-1$ 重鎖、すなわちIgA1免疫グロブリンの重鎖、 $\alpha-2$ 重鎖、すなわちIgA2免疫グロブリンの重鎖、及び ϵ 重鎖、すなわちIgE免疫グロブリンの重鎖、並びに、 δ 重鎖、すなわちIgD免疫グロブリンの重鎖からなる群より選択される。ある態様において、好ましい免疫グロブリン重鎖は、ヒトの μ 、 $\gamma-1$ 、 $\gamma-2$ 、 $\gamma-3$ 、 $\gamma-4$ 、 $\alpha-1$ 、 $\alpha-2$ 、 ϵ 、及び δ 重鎖の膜結合型を含む。特に好ましいのは、ヒト μ 重鎖の膜結合型である。

【0071】

免疫グロブリンの膜結合型は典型的には、重鎖mRNAの選択的(alternative)転写終結及びスプライシングを介して重鎖ポリペプチドの一部を形成している膜貫通ドメインにより、細胞表面に係留されている。例えば、Roittの9.10頁参照。「膜貫通ドメイン」「膜に広がる領域」又は関連用語は、本明細書において互換的に使用され、細胞膜に係留された重鎖ポリペプチドの一部を意味する。典型的膜貫通ドメインは、以下により詳細に考察された疎水性アミノ酸を含む。「細胞内ドメイン」「細胞質ドメイン」「細胞質ゾル領域」又は関連用語は、本明細書において互換的に使用され、細胞膜に係留された又は細胞表面に露出されている部分とは反対側の、細胞の内側にあるポリペプチドの一部を意味する。免疫グロブリン重鎖ポリペプチドの膜結合型は、典型的には約3個のアミノ酸の非常に短い細胞質ドメインを含む。本発明の免疫グロブリン重鎖ポリペプチドの膜結合型は、好ましくは、通常免疫グロブリン重鎖と結合されている膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを含み、例えば、プレーB細胞内の μ 及び δ 重鎖と結合された膜貫通ドメイン及び細胞内ドメイン、もしくはB記憶細胞内のいずれかの免疫グロブリン重鎖と結合された膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを含む。しかし、異種膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインが、所定の免疫グロブリン重鎖ポリペプチドにより結合されること、例えば μ 重鎖の膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインが γ 重鎖の細胞外部分と結合されることも企図されている。あるいは、完全に異種ポリペプチドの膜貫通ドメイン及び／又は細胞質ドメインを使用し、例えば、主要組織適合性分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメイン、細胞表面受容体、ウイルス表面タンパク質、キメラドメイン、又は合成ドメインが使用される。

【0072】

免疫グロブリンサブユニットポリペプチドが軽鎖ポリペプチドを含むようなこれらの態様において、いずれかの動物種由来の免疫グロブリン軽鎖が意図されている。適当で好ましい免疫グロブリン軽鎖は、本明細書において説明されている。鳥類、特にニワトリ、魚類

、及び哺乳類のような脊椎動物由来の免疫グロブリン軽鎖が含まれ、哺乳類免疫グロブリン軽鎖が好ましい。哺乳類免疫グロブリン軽鎖の例は、ヒト、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、ヤギ、ラット、ヒツジ、ウシ、ブタ、モルモット、ラクダ、ラマ、及びハムスターの免疫グロブリン軽鎖を含む。これらの中で、ヒト免疫グロブリン軽鎖が特に好ましい。更にマウス／ヒトハイブリッドの免疫グロブリン軽鎖のような1種又は複数種からの軽鎖の一部を含む、ハイブリッド免疫グロブリン軽鎖も企図されている。好ましい免疫グロブリン軽鎖は、ヒト κ 及び λ 軽鎖を含む。いずれかの軽鎖の対が、重鎖のいずれかの同一対と結合され、当業者によく理解されている特徴的 H_2L_2 構造を伴う免疫グロブリン分子を形成している。

【0073】

10

本発明の好ましい局面に従い、本明細書に記されたようなポリヌクレオチドライブラリー、例えばポリヌクレオチドの第一のライブラリー又はポリヌクレオチドの第二のライブラリーのいずれかのメンバーは、(a)このライブラリーの全てのメンバーに共通の免疫グロブリン定常領域をコードしている第一の核酸分子、及び(b)免疫グロブリン可変領域をコードしている第二の核酸分子を含み、ここで第二の核酸分子は、第一の核酸分子の直ぐ上流及びインフレイムである。従って、本発明のポリヌクレオチドライブラリーのメンバーによりコードされた免疫グロブリンサブユニットポリペプチド、すなわち、このようなポリヌクレオチドによりコードされた免疫グロブリン軽鎖又は免疫グロブリン重鎖は、好ましくは、免疫グロブリン可変領域と結合された免疫グロブリン定常領域を含む。

【0074】

20

「第一の核酸分子」によりコードされた軽鎖定常領域は、このサブユニットポリペプチドのおよそ半分を含み、かつC末端、すなわち軽鎖ポリペプチドの後半に配置される。 C_L 定常領域、より詳細には C_{κ} 定常領域又は C_{λ} 定常領域と称される軽鎖定常領域は、鎖内ジスルフィド結合により「ループ」内に互いに維持された約110個のアミノ酸を含む。

【0075】

「第一の核酸分子」によりコードされた重鎖定常領域は、このサブユニットポリペプチドの3/4又はそれ以上を含み、かつC末端、すなわち重鎖ポリペプチドの後半部分に配置される。 C_H 定常領域と称される重鎖定常領域は、3又は4個のいずれかのペプチドループ又は鎖内ジスルフィド結合により各々囲い込まれた約110個のアミノ酸の「ドメイン」を含む。より詳細に述べると、ヒト免疫グロブリンの重鎖定常領域は、 C_{μ} 定常領域、 C_{δ} 定常領域、 C_{γ} 定常領域、 C_{α} 定常領域、及び C_{ϵ} 定常領域を含む。 C_{γ} 、 C_{α} 及び C_{δ} 重鎖は、各々3個の定常領域ドメインを含み、一般に C_{H1} 、 C_{H2} 及び C_{H3} と称されるのに対し、 C_{μ} 及び C_{ϵ} 重鎖は、4個の定常領域ドメインを含み、一般に C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 及び C_{H4} と称される。ヒト免疫グロブリン定常領域をコードしている核酸分子は、当業者に周知でありかつ下記実施例において説明されているPCRのような方法により、例えばヒトB細胞又はそれらの前駆体由来したcDNAライブラリーから、容易に得ることができる。

30

【0076】

本発明の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは各々、「第二の核酸分子」によりコードされた免疫グロブリン可変領域を含む。ポリヌクレオチドのライブラリー内において、各ポリヌクレオチドは同じ定常領域を含むが、このライブラリーは、複数の、すなわち少なくとも2種の、好ましくは少なくとも10、100、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 又は 10^9 種の異なる可変領域を含むと考えられる。当業者に周知であるように、軽鎖可変領域は、再構成された核酸分子によりコードされ、各々は、軽鎖 V_L 領域、詳細には V_{κ} 領域又は V_{λ} 領域、並びに軽鎖J領域、詳細には J_{κ} 領域又は J_{λ} 領域を含む。同様に、重鎖可変領域は、再構成された核酸分子によりコードされ、各々は、重鎖 V_H 領域、D領域及びJ領域を含む。これらの再構成は、細胞分化時にDNAレベルで生じる。重鎖及び軽鎖可変領域をコードしている核酸分子は、例えば、最終的に分化され特定のエピトープに対する特異性を伴う抗体を発現する成熟B細胞及び形質細胞からのPCRにより、誘導することができる。更に、特異的抗原に対する抗体が望ましい場合

40

50

、可変領域は、その抗原で免疫感作された動物の成熟B細胞及び形質細胞から単離することができ、かつこれにより、この抗原と相互作用する抗体可変領域の拡張されたレパトアが作成される。あるいは、より多様なライブラリーが望ましい場合、可変領域は、前駆体細胞、例えばプレ-B細胞及び未成熟B細胞から単離され、これは免疫グロブリン遺伝子の再構成を受けるが、自己又は非自己の抗原には曝されない。例えば、可変領域は、複数のドナーからプールされた正常なヒト骨髄からのPCRにより単離され得る。あるいは可変領域は合成されたものであり、例えば合成オリゴヌクレオチドの作成により実験室において形成されるか、もしくは生殖系列DNAのインビトロ操作により誘導され、免疫グロブリン遺伝子の再構成を生じる。

【0077】

各々、免疫グロブリン定常領域及び可変領域をコードしている第一及び第二の核酸分子に加え、先に説明された本発明のポリヌクレオチドライブラリーの各メンバーは、更に可変領域をコードしている第二の核酸分子の直ぐ上流及びインフレームのシグナルペプチドをコードしている第三の核酸分子を含むことができる。

【0078】

「シグナルペプチド」とは、例えば発生期の免疫グロブリンポリペプチドサブユニットの宿主細胞表面への輸送を指示するポリペプチド配列を意味する。シグナルペプチドは、当技術分野において「シグナル配列」、「リーダー配列」、「分泌シグナルペプチド」又は「分泌シグナル配列」とも称される。シグナルペプチドは、通常完全な又は「未熟な」ポリペプチドの一部として発現され、かつ通常N末端に位置する。様々なタンパク質由来のシグナルペプチドの共通構造は、一般に、正帯電したn-領域、それに続く疎水性h-領域、及び中性であるが極性のあるc-領域として説明される。多くの場合において、シグナルペプチドを含むアミノ酸は、このタンパク質が一旦その最終目的地に到達したならば切断され、このポリペプチドの「成熟」型を形成する。この切断は、シグナルペプチダーゼとして公知の酵素により触媒される。(−3, −1)ルールは、−3及び−1位(切断部位に対して)の残基は、小さくかつ正確に発生する切断に対して中立でなければならないことを説明している。例えば、McGeoch、Virus Res.、3:271−286(1985)、及びvon Heinje、Nucleic Acids Res.、14:4683−4690(1986)を参照のこと。

【0079】

本発明の宿主細胞を含む全ての細胞は、構成的分泌経路を有し、これは排出される運命にある分泌型免疫グロブリンサブユニットポリペプチドを含むタンパク質が、この細胞から分泌される。これらのタンパク質は、修飾が生じ得るER−ゴルジプロセッシング経路を通過する。更にこのタンパク質上でシグナルが検出されないならば、これは分泌のために細胞表面に向けられる。あるいは免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは、最後には宿主細胞の表面上に発現された内在性膜成分となる。免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの膜結合型は、これらが最初は分泌型と同じ経路を辿り、膜透過停止シグナル又は「膜貫通ドメイン」の存在によりER膜に維持される場合以外は、ER管腔を通過する。膜貫通ドメインは、それらが膜を横切るように α -ヘリックスコンホメーションを採用する約20個のアミノ酸残基の疎水性の伸長である。膜に埋め込まれたタンパク質は、形質膜のリン脂質二重層内に係留される。分泌タンパク質同様、膜貫通タンパク質のN末端領域は、膜を通過し、かつER管腔へ出る際には、切断されるシグナルペプチドを有する。免疫グロブリン重鎖ポリペプチドの膜貫通型は、分泌型と同じシグナルペプチドを利用する。

【0080】

本発明のシグナルペプチドは、天然の免疫グロブリンシグナルペプチド、すなわち天然の重鎖又は軽鎖転写産物の一部である配列によりコードされているものか、もしくはこれに操作可能に結合された免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの分泌を指示する能力を維持しているその配列の機能性誘導体であるかのいずれかである。あるいは、異種シグナルペプチド、又はそれらの機能性誘導体を使用することができる。例えば、天然の免疫グ

10

20

30

40

50

ロブリンサブユニットポリペプチドのシグナルペプチドは、ヒト組織プラスミノゲンアクチベーター又はマウス β -グルクロニダーゼのシグナルペプチドで置換することができる。

【0081】

シグナル配列、膜貫通ドメイン、及び細胞質ゾルドメインは、多種多様な膜結合タンパク質について知られている。これらの配列は、従って特定のタンパク質の対（例えば、シグナル配列と膜貫通ドメイン、又はシグナル配列と細胞質ゾルドメイン、又は膜貫通ドメインと細胞質ゾルドメイン）、又は3つ組として一緒に使用することができるか、もしくは各成分は、異なるタンパク質から採取されるか、あるいはこれらの配列は、合成することができ、かつ前述のように人工の送達ドメインとしてのコンセンサスに全体が由来することができる。

10

【0082】

特に好ましいシグナル配列及び膜貫通ドメインは、CD8、ICAM-2、IL-8R、CD4及びLFA-1に由来するものを含むが、これらに限定されるものではない。追加の有用な配列は、下記由来の配列を含む：1) クラスI内在性膜タンパク質、例えばIL-2受容体 β -鎖（残基1~26はシグナル配列であり、241~265は膜貫通残基である；Hatakeyamaら、Science、244:551(1989)、及びHeijneら、Eur. J. Biochem.、174:671(1988)参照）、並びにインスリン受容体 β -鎖（残基1~27はシグナルであり、957~959は膜貫通ドメインであり、及び960~1382は細胞質ドメインである；Hatakeyama、前掲、及びEbinaら、Cell、40:747(1985)参照）；2) クラスII内在性膜タンパク質、例えばニュートラルエンドペプチダーゼ（残基29~51は膜貫通ドメインであり、2~28は細胞質ドメインである；Malfroyら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、144:59(1987)参照）；3) III型タンパク質、例えばヒトチトクロムP450 NF25（Hatakeyama、前掲）；及び、4) IV型タンパク質、例えばヒトP-糖タンパク質（Hatakeyama、前掲）。これらの代替において、CD8及びICAM-2が特に好ましい。例えば、CD8及びICAM-2由来のシグナル配列は、この転写産物の最5'末端に位置する。これらは、CD8の場合はアミノ酸1~32からなり（Nakachiら、PNAS USA、82:5126(1985)）、及びICAM-2の場合は1~21 30からなる（Stauntonら、Nature (ロンドン)、339:61(1989)）。これらの膜貫通ドメインは、CD8由来のアミノ酸145~195（Nakachi、前掲）及びICAM-2由来の224~256（Staunton、前掲）により包含される。

20

30

【0083】

あるいは、膜係留ドメインは、GPIアンカーを含み、これは例えばDAFにおいて、グリコシル-ホスファチジルイノシトール結合により、この分子と脂質二重層の間に共有結合を生じる（Homansら、Nature、333(6170):269-72(1988)、及びMoranら、J. Biol. Chem.、266:1250(1991)参照）。これを行うために、Thy-1由来のGPI配列を、膜貫通配列の代わりに、 40免疫グロブリン又は免疫グロブリン断片の3'側にカセット化することができる。

【0084】

同様に、ミリスティル化配列は、膜係留ドメインとして役に立つ。c-srcのミリスティル化は、これを形質膜にリクルートすることはわかっている。このタンパク質の最初の14個のアミノ酸が単にこの機能に寄与している場合は、これは膜局在化の単純かつ効果的方法である（Crossら、Mol. Cell. Biol.、4(9):1834(1984)；Spencerら、Science、262:1019-1024(1993)参照）。このモチーフは既に、レポーター遺伝子の局在化に効果があることが示されており、かつTCRの ζ 鎖の係留に使用することができる。このモチーフは、この構築物を形質膜に局在化するために、免疫グロブリン又は免疫グロブリン断片の5'側に位置し 50

ている。パルミトイル化のようなその他の修飾を使用し、構築物を形質膜に係留することができ；例えば、Gタンパク質-結合した受容体キナーゼGRK6配列由来のパルミトイル化配列（Stoffelら、J. Biol. Chem.、269：27791（1994））；ロドプシン由来のパルミトイル化配列（Barnstableら、J. Mol. Neurosci.、5（3）：207（1994））；並びに、p21H-ras 1タンパク質（Caponら、Nature、302：33（1983））がある。

【0085】

各々免疫グロブリン定常領域及び可変領域をコードしている第一及び第二の核酸分子に加え、先に説明された本発明のポリヌクレオチドライブラリーの各メンバーは、更に異種ポリペプチドをコードしている追加の核酸分子を含む。このような追加のポリヌクレオチドは、シグナルペプチドをコードしている別の第三の核酸分子に、またはその代わりとして添加することができる。このような異種ポリペプチドをコードしている追加の核酸分子は、可変鎖領域又は重鎖領域をコードしている核酸分子の上流又は下流であることができる。

10

【0086】

追加核酸分子によりコードされた異種ポリペプチドは、レスキュー配列であることができる。レスキュー配列は、免疫グロブリンもしくはそれらの断片又はそれをコードしているポリヌクレオチドのいずれかを精製又は単離のために使用することができる配列である。従って例えば、ペプチドレスキュー配列は、Niアフィニティーカラムで使用するための6-Hisタグ及び検出、免疫沈降、又はFACS（蛍光標示式細胞分取器）のためのエピトープタグのような精製配列を含む。適当なエピトープタグは、myc（市販の9E10抗体と共に使用するため）、細菌酵素BirAのBSPビオチン化標的配列、fluタグ、LacZ、及びGSTを含む。追加の核酸分子は、ペプチドリンカーもコードしている。

20

【0087】

好ましい態様において、異種ポリペプチドの組合せが使用される。従って例えば、リンカー配列を伴い又は伴わずに、シグナル配列、レスキュー配列、及び安定化配列のかなり多数の組合せを使用することができる。ひとつは、免疫グロブリン又はそれらの断片をコードしているポリヌクレオチドの異種ポリペプチド5'及び3'をコードしている様々な融合ポリヌクレオチドにカセット化することができる。当業者に理解されるように、これらの配列モジュールは、非常に多数の組合せ及び変型において使用することができる。

30

【0088】

第一及び第二のライブラリーに含まれるポリヌクレオチドは、適当な宿主細胞へ導入される。適当な宿主細胞は、それらの表面に付着した免疫グロブリン分子を発現することが可能であることを特徴としている。ポリヌクレオチドは、当業者に周知の方法により、宿主細胞へ導入される。適当で好ましい導入法は本明細書に明らかにされている。

【0089】

容易に理解されるように、導入法は、ポリヌクレオチドライブラリーが構築されたベクターの性質に応じて変動する。例えば、DNAプラスミドベクターは、宿主細胞へ、例えば、リポフェクション（アニオン性リポソームによるなど（例えば、Feignerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、84：7413（1987）参照）、又はカチオン性リポソーム（例えば、Brigham, K. L. ら、Am. J. Med. Sci.、298（4）：278-2821（1989）；米国特許第4,897,355号（Eppsteinら）参照）、電気穿孔法、リン酸カルシウム沈降法（例えば全般的に、Sambrookら、「分子クローニング；実験マニュアル、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、コールドスプリングハーバー、NY、1989参照）、プロトプラスト融合法、スフェロプラスト融合法、又はDEAEデキストラン法（Susmanら、Cell. Biol.、4：1641-1643（1984）参照）により導入することができる。前記参考文献は、その全体が本明細書に参照として組入れられている。

40

50

【0090】

選択された方法がリポフェクションである場合、この核酸は、カチオン性リポソーム、例えばDOTMA:DOPE、DOTMA、DOPE、DC-コレステロール、DOTAP、Transfectam（登録商標）（Promega社）、Tfx（登録商標）（Promega社）、LipoTAXI（登録商標）（Stratagene社）、PerFect Lipid（登録商標）（Invitrogen社）、SuperFect（登録商標）（Qiagen社）などにより複合され得る。核酸がアニオン性リポソームによりトランスフェクションされる場合は、アニオン性リポソームは、この核酸を封入することができる。好ましくは、DNAは、製造業者のプロトコルを使用し、リポソームが媒介したトランスフェクションにより導入される（例えばLipofectamineについて；Life Technologies社）。 10

【0091】

プラスミドはウイルスベクターである場合、宿主細胞への導入は、標準の感染により最も都合良く実行される。しかし多くの場合、ウイルスの核酸は、前述のいずれかの方法により細胞に導入され、かつウイルスの核酸は「感染性」であり、すなわちウイルスの核酸の細胞への導入は、より多くではなくとも、細胞が生存可能な子孫ウイルス粒子を産生するのに十分なものである。しかしある種のウイルス核酸、例えばボックスウイルス核酸は、感染性ではなく、従って提供された追加エレメント、例えばウイルスの核酸を封入しているウイルス粒子、必要なウイルスのエレメントを産生するように操作された細胞、又はヘルパーウイルスにより、導入されなければならない。 20

【0092】

ポリヌクレオチドの第一及び第二のライブラリーは、いずれかの順、又は同時に、宿主細胞へ導入される。例えば、ポリヌクレオチドの第一及び第二のライブラリーが、ウイルスベクターにおいて構築され、感染性又は失活されたかのいずれかのベクターは、混合物として同時感染により導入されるか、又は連続感染において導入され得る。ひとつのライブラリーがウイルスベクターにおいて構築され、かつ他方がプラスミドベクターにおいて構築されたならば、一方のライブラリーの導入は、他方よりも先に導入されることにより、最も簡便に行われうる。

【0093】

ポリヌクレオチドの第一及び第二のライブラリーの宿主細胞への導入後、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の発現が許容され、該宿主細胞の膜表面上、又は細胞培地への分泌を通じてのいずれかが生じる。「発現が許容される」とは、宿主細胞に導入されたベクターが、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの転写及び翻訳を受けることが可能になる、好ましくは宿主細胞が完全に集成された免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を膜表面上又は細胞培地へ輸送することが可能になることを意味する。典型的には、発現の許容には、ポリヌクレオチドが導入される宿主細胞の、発現を可能にする適当な条件下でのインキュベーションを必要としている。これらの条件、及び発現を可能にするのに必要な時間は、当業者に周知であるように、宿主細胞の選択及びベクターの選択を基に変動しうる。 30

【0094】

ある態様において、それらの表面上への免疫グロブリン分子の発現を可能にしている宿主細胞、又は細胞培地に分泌された可溶性免疫グロブリン分子は、その後抗原と接触される。本明細書において使用される「抗原」は、抗体、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片に特異的に結合することができるいずれかの分子である。「特異的な結合」は、抗原が、抗体のCDRに結合することを意味する。CDRと特異的に相互作用する抗原の部分は、「エピトープ」、又は「抗原決定基」と称される。抗原は単独のエピトープを含むが、典型的には抗原は少なくとも2種のエピトープを含み、かつ抗原のサイズ、コンホメーション、及び型に応じて、かなり多くのエピトープを含むことができる。 40

【0095】

抗原は、典型的にはペプチド又はポリペプチドであるが、分子又は化合物であることもで 50

きる。例えば、有機化合物、例えばジニトロフェノール又はDNP、核酸、糖質、又はこれらの化合物の混合物は、ペプチド又はポリペプチドを伴う又は伴わないのいずれかで、適当な抗原であることができる。ペプチド又はポリペプチドエピトープの最小サイズは、約4～5個のアミノ酸であると考えられる。ペプチド又はポリペプチドエピトープは、好ましくは、少なくとも7個の、より好ましくは少なくとも9個の、及び最も好ましくは少なくとも約15～約30個のアミノ酸を含む。CDRはその三次元型で抗原性ペプチド又はポリペプチドを認識することができるので、エピトープを含むアミノ酸は、非連続である必要があり、場合によっては、同じペプチド鎖上にないことさえある。本発明において、ペプチド又はポリペプチド抗原は、好ましくは少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、より好ましくは少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、及び最も好ましくは約15～約30個のアミノ酸の配列を含む。抗原エピトープを含む、あるいは抗原エピトープからなる好ましいペプチド又はポリペプチドは、長さが少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95又は100個のアミノ酸残基である。この抗原は、いずれかの型であることができ、かつ遊離、例えば、溶液中に溶解しているか、又はいずれかの基質に付着していることができる。適当かつ好ましい基質が本明細書において説明されている。ある態様において、抗原は、より詳細に以下に説明されているような、抗原発現性の提示細胞の一部であることができる。

10

【0096】

いずれかの抗原に特異的な免疫グロブリン分子は、本発明の方法に従い作成することができることは理解されるはずである。好ましい抗原は、「自己」抗原、すなわち作成される免疫グロブリン分子と同一種に由来する抗原である。例として、CEA抗原、GM2抗原、Tn抗原、sTn抗原、Thompson-Friedenreich抗原(TF)、Globo H抗原、Le(y)抗原、MUG1抗原、MUC2抗原、MUC3抗原、MUC4抗原、MUC5AC抗原、MUC5B抗原、MUC7抗原、癌胎児性抗原、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンβ鎖(hCGβ)抗原、HER2/neu抗原、PSMA抗原、EGFRvIII抗原、KSA抗原、PSA抗原、PSCA抗原、GP100抗原、MAGE1抗原、MAGE2抗原、TRP1抗原、TRP2抗原、及びチロシナーゼ抗原などであるが、これらに限定されるものではない、ヒト腫瘍抗原に対するヒト抗体を産生することが望ましいと考えられる。他の望ましい「自己」抗原は、サイトカイン、受容体、リガンド、糖タンパク質、及びホルモンを含むが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0097】

感染性物質上の抗原に対する抗体を産生することも企図されている。このような抗原の例は、細菌性抗原、ウイルス性抗原、寄生虫性抗原、及び真菌性抗原を含むが、これらに限定されるものではない。ウイルス性抗原の例は、アデノウイルス抗原、αウイルス抗原、カリチウイルス抗原、例えばカリチウイルスキャプシド抗原、コロナウイルス抗原、ジステンバーウイルス抗原、エボラウイルス抗原、エンテロウイルス抗原、フラビウイルス抗原、肝炎ウイルス(A-E)抗原、例えばB型肝炎コア又は表面抗原、ヘルペスウイルス抗原、例えば単純ヘルペスウイルス又は水痘ウイルス糖タンパク質抗原、免疫不全ウイルス抗原、例えばヒト免疫不全ウイルスエンベロープ又はプロテアーゼ抗原、感染性腹膜炎ウイルス抗原、インフルエンザウイルス抗原、例えばインフルエンザA赤血球凝集素、又はノイラミニダーゼ抗原、白血病ウイルス抗原、マーブルグウイルス抗原、癌ウイルス抗原、オルソミクソウイルス抗原、パピローマウイルス抗原、パラインフルエンザウイルス抗原、例えば赤血球凝集素/ノイラミニダーゼ抗原、パラミクソウイルス抗原、パルボウイルス抗原、ペスチウイルス抗原、ピコナウイルス抗原、例えばポリオウイルスキャプシド抗原、狂犬病ウイルス抗原、例えば狂犬病ウイルス糖タンパク質G抗原、レオウイルス抗原、レトロウイルス抗原、ロタウイルス抗原、更には他の癌を惹起する又は癌に関連したウイルス抗原を含むが、これらに限定されるものではない。

40

【0098】

50

細菌性抗原の例としては、アクチノミセス抗原、バシラス抗原、バクテロイド抗原、ボルデテラ抗原、バルトネラ抗原、ボレリア抗原、例えば、ボレリア・バルグドルファO s p A抗原、ブルセラ抗原、カンピロバクター抗原、カプノチトファーガ抗原、クラミジア抗原、クロストリジウム抗原、コリネバクテリウム抗原、コクシエラ抗原、デルマトフィルス抗原、腸球菌抗原、エールリヒア抗原、大腸菌抗原、フランシセラ抗原、フゾバクテリウム抗原、ヘルモバルトネラ抗原、ヘモフィルス抗原、例えば、ヘルモフィス・インフルエンザb型外膜タンパク質抗原、ヘリコバクター抗原、クレブシエラ抗原、L-型細菌抗原、レプトスピラ抗原、リステリア抗原、マイコバクテリア抗原、マイコプラズマ抗原、ナイセリア抗原、ネオリケッチア抗原、ノカルジア抗原、パスツレラ抗原、ペプトコッカス抗原、ペプトストレプトコッカス抗原、肺炎球菌抗原、プロテウス抗原、ユードモナス抗原、リケッチア抗原、ロシャリメア抗原、サルモネラ抗原、シゲラ抗原、ブドウ球菌抗原、レンサ球菌抗原、例えば化膿レンサ球菌Mタンパク質抗原、梅毒抗原、及びエルシニア抗原、例えばイペスチス (Y p e s t i s) F1及びV抗原が含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【0099】

真菌性抗原の例としては、ユミケカビ抗原、アクレモニウム抗原、アルテルナリア抗原、アスペルギルス抗原、バシディオボルス抗原、ビポラリス抗原、ブラストミセス抗原、カンジダ抗原、コクシディオイデス抗原、コクシディオボラス抗原、クリプトコッカス抗原、クルブラリア抗原、エピデルモフィトン抗原、エキソフィアラ抗原、ゲオトリクム抗原、ヒストプラズマ抗原、マズレラ抗原、マラセジア抗原、小孢子菌抗原、モニリエラ抗原、クサレケカビ抗原、ケカビ抗原、ペシロマイセス抗原、アオカビ抗原、フィアレモニウム (P h i a l e m o n i u m) 抗原、フィアロフォア抗原、プロトテカ抗原、シュードアレシエリア抗原、シュードミクロドキウム (P s e u d o m i c r o d o c h i u m) 抗原、ピチウム抗原、リノスポリジウム抗原、リゾプス抗原、スコレコバシディウム抗原、スポロトリックス抗原、ステムフィリウム抗原、白癬菌抗原、トリコスポロン抗原、及び乾生菌抗原が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0100】

寄生原生動物の抗原の例としては、バベシア抗原、バランチジウム抗原、ベスノイチア抗原、イヌ糸状虫抗原、エイメリア抗原、エンセファリトズーン抗原、赤痢アメーバ抗原、ランブル鞭毛虫抗原、トキソプラズマ抗原、肝胞子虫抗原、イソスポラ抗原、リーシュマニア抗原、微胞子虫抗原、ネオスポラ抗原、ノセマ抗原、ペントトリコモナス抗原、マラリア抗原、例えば熱帯熱マラリア原虫の環状スポロゾイト周囲タンパク質 (P f C S P)、スポロゾイト表面タンパク質2 (P f S S P 2)、うっ血肝抗原1-C末端 (P f L S A-1 c-ter m)、及び排出された (e x p o r t e d) タンパク質1 (P f E x p-1) 抗原、ニューモシチス抗原、サルコシスト抗原、住血吸虫抗原、タイレリア抗原、トキソプラズマ抗原、及びトリパノソーマ抗原が含まれるが、これらに限定されるものではない。寄生蠕虫の抗原の例としては、常在糸状虫抗原、アエルロストロンギアラス (A e l u r o s t r o n g y l u s) 抗原、鉤虫抗原、広東住血線虫抗原、回虫抗原、ブルジア抗原、ブノストムム抗原、毛頭虫抗原、シャベルチア抗原、クーペリア抗原、クレノソマ (C r e n o s o m a) 抗原、ジクチロカウルス抗原、線虫抗原、デイペタロネーマ抗原、裂頭条虫抗原、瓜実条虫抗原、ディロフィラリア抗原、メジナ虫抗原、蟯虫抗原、フィラリア抗原、ヘモンカス抗原、ラゴキルアスカリス抗原、ロア糸状虫抗原、マンソネラ抗原、ムエレリウス (M u e l l e r i u s) 抗原、ナノフィエタス抗原、アメリカ鉤虫抗原、線虫抗原、腸結節虫抗原、回旋糸状虫抗原、オピストルキス抗原、オステルタジア抗原、パラフィラリア抗原、肺吸虫抗原、パラアスカリス抗原、フィサロプテラ抗原、プロトストロンギルス抗原、セタリア抗原、スピロセルカ抗原、スピロメトラ抗原、ステファノフィラリア抗原、糞線虫抗原、ストロンギルス抗原、テラジア抗原、トキサスカリス抗原、トキソカラ抗原、旋毛虫抗原、毛様線虫抗原、鞭虫抗原、鉤虫抗原、及び糸状虫抗原が含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

40

【0101】

50

免疫グロブリン分子が宿主細胞の表面に発現されるある選択及びスクリーニングの計画において、本発明の宿主細胞は、宿主細胞の表面に発現された免疫グロブリン分子のCDRを特異的に認識する抗原が、CDRに結合する方法により、抗原と「接触」され、これにより抗原に特異的に結合する宿主細胞をこの抗原に結合していないそれらの宿主細胞から識別することが可能になる。抗原特異的抗体を発現している宿主細胞をこの抗原と相互作用させるいずれかの方法が含まれる。例えば、宿主細胞が懸濁液中に存在する場合、及び抗原が固形基質に付着されている場合、抗原に特異的に結合する細胞は、固形基質に捕獲され、この抗原と結合していないそれらの細胞を洗浄除去することを可能にし、かつ引き続き結合した細胞が回収される。あるいは、宿主細胞が固形基質に付着されていない場合、特異的に結合している抗原により細胞が基質から放出されることが引き起される場合（例えば細胞死により）、これらは、細胞上清から回収することができる。本発明の宿主細胞が抗原と接触することを可能にする好ましい方法で、特に三分子組換えによりワクシニアウイルスベクターにおいて構築されたライブラリーを使用する方法が、本明細書において明らかにされている。

10

20

30

40

50

【0102】

宿主細胞の表面に発現された抗原特異的免疫グロブリン分子の検出のための好ましいスクリーニング法において、本発明の宿主細胞は、フルオレセイン-5-イソチオシアネート（FITC）により直接的に標識されるか又はビオチンにより間接的に標識され、その後FITC-標識されたストレプトアビジンにより検出されるような選択抗原と一緒にインキュベーションされる。当業者になじみがある別の蛍光プローブを、使用することができる。インキュベーション期間に、標識された選択抗原は、抗原特異的免疫グロブリン分子に結合する。特異的蛍光タグ付けした抗原の抗体受容体を発現している細胞は、蛍光標式細胞分取器により選択され、これにより、抗原に特異的に結合している宿主細胞が抗原に結合していない宿主細胞から識別できるようになる。1時間に 1×10^8 個を超える細胞の選別が可能な細胞分取器の出現により、選択抗原に対する特異的抗体受容体を発現する細胞サブセットを選択するために、免疫グロブリン遺伝子の組換えワクシニアライブラリーにより感染した多数の細胞をスクリーニングすることが実現可能になっている。

【0103】

抗原に特異的に結合した宿主細胞の回収後に、第一のライブラリーのポリヌクレオチドが、これらの宿主細胞から回収される。「回収」は、望ましい成分のこれらの望ましくない成分からの粗分離を意味する。例えば、抗原に結合する宿主細胞は、固形基質からのそれらの脱離を基に「回収」され、かつ第一のライブラリーのポリヌクレオチドが、他の細胞成分からの粗分離によりこれらの細胞から回収される。用語「回収」は、ウイルス及び他の成分からの精製又は単離のいかなる種類も含蓄しないことは注目される。ポリヌクレオチドの回収は、当業者に公知の標準法により実現することができる。好ましい局面において、ポリヌクレオチドは、感染性ウイルス粒子、例えばそこに第一のライブラリーが構築され、抗原に結合した宿主細胞中に含まれたようなワクシニアウイルスベクター粒子の収集により回収される。

【0104】

免疫グロブリン分子が宿主細胞の表面から完全に分泌されるあるスクリーニングの計画において、宿主細胞のプールが培養される細胞培地、すなわち「馴化培地」が、免疫グロブリン分子のCDRを特異的に認識する抗原をCDRに結合することを可能にする方法により、抗原と「接触」され、かつこれが更に抗原-抗体相互作用の検出を可能にする。このような方法は、イムノブロット、ELISAアッセイ、RIAアッセイ、RASTアッセイ、及び免疫蛍光アッセイを含むが、これらに限定されるものではない。あるいは、馴化培地は、特異的抗体に関する機能アッセイが施される。このようなアッセイの例は、ウイルス中和アッセイ（特異的ウイルスに対する抗体について）、細菌のオプソニン作用/食作用アッセイ（特異的細菌に対する抗体について）、抗体-依存型細胞細胞傷害性（ADCC）アッセイ、ある細胞機能の阻害又は促進に関するアッセイ、マスト細胞からのIgE-媒介されたヒスタミン放出を検出するアッセイ、赤血球凝集素アッセイ、及び赤血

球凝集阻止アッセイを含むが、これらに限定されるものではない。このようなアッセイは、望ましい機能特性を伴う抗原特異的抗体の検出を可能にすると考えられる。

【0105】

特異的に抗原に結合する、又は望ましい機能特性を有する免疫グロブリン分子を含む馴化培地プールの同定後に、更なるスクリーニング段階が、望ましい免疫グロブリン分子を産生する宿主細胞が回収されるまで実行され、その後第一のライブラリーのポリヌクレオチドが、それらの宿主細胞から回収される。

【0106】

当業者に容易に理解されるように、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの同定には、2回以上の前述のような選択ラウンドを必要とすることができ、2回以上の前述のようなスクリーニングラウンドが必ず必要であると考えられる。1回の選択では、所望の第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの純粋なセットの単離を必ずしも生じず；1回目以降に得られた混合物は、所望のポリヌクレオチドについて濃縮することができるが、非標的挿入断片配列と夾雑することもある。本明細書に記されたスクリーニングアッセイは、反応性宿主細胞、及び／又は免疫グロブリン分子を含有するプールを同定するが、このようなプールは、非反応性種も含むと考えられる。従って、反応性プールは更に分画化され、かつスクリーニングの更なるラウンドが施される。従って、第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドとの結合において望ましい免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の形成を可能にする、第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドコードしているポリヌクレオチドの同定は、選択及び／又はスクリーニングの数回のラウンドが必要であるか、又はこれにより恩恵を受け、結果として望ましいポリヌクレオチドを含む細胞集団を増大する。従ってこの態様は更に、1回目のラウンド後に回収されたポリヌクレオチドの第二の細胞集団への導入、及び2回目の選択ラウンドの実行を提供する。

【0107】

従って、説明されたように、第一の選択段階は、1回又は複数回繰り返すことができ、もしくは繰り返さなければならず、これにより所望の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが濃縮される。この態様の第一の段階を反復するために、前述のように回収されたこれらのポリヌクレオチド、又はポリヌクレオチドのプールが、ライブラリー内のポリヌクレオチドによりコードされた免疫グロブリン分子を発現することが可能な宿主細胞の集団に導入される。この宿主細胞は、1回目の選択ラウンドにおいて使用される型と同じであるか、又はそれらが免疫グロブリン分子を発現することができる限りは、異なる宿主細胞であることができる。ポリヌクレオチドの第二のライブラリーも、これらの宿主細胞へ導入され、かつ該宿主細胞の膜表面上の又は細胞培地中での、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の発現がもたらされる。この細胞又は馴化培地は、同様に抗原と接触されるか、又はこの培地は、機能アッセイにおいて試験され、かつ第一のライブラリーのポリヌクレオチドは、抗原に特異的に結合している、及び／又は望ましい機能特性を有する、これらの細胞又は免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞のプールから再度回収される。これらの段階は、1回又は複数回反復され、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部として、抗原に特異的に結合する及び／又は機能的特性を有するような免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている第一のライブラリー由来のポリヌクレオチドの濃縮を生じる。

【0108】

前述のような第一のライブラリーからの望ましいポリヌクレオチドの適当な濃縮の後、回収されるこれらのポリヌクレオチドが、「単離」され、すなわち、それらの固有の環境から実質的に除去され、かつ抗原特異的免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしていないライブラリー内のポリヌクレオチドから大部分は分離される。例えば、ベクターに含まれるクローン化されたポリヌクレオチドは、本発明の目的のために単離されるとみなされる。同じ抗原に特異的に結合する2種以上の異なる免疫グロブリンサブユニットポリペプチドが、本明細書に説明された方法により回収することができることは理解され

10

20

30

40

50

る。従って、同じ抗原に結合しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの混合物も、「単離」されているとみなされる。更なる単離されたポリヌクレオチドの例は、異種宿主細胞において維持されたもの又は溶液中の精製（部分的又は実質的に）されたDNA分子を含む。しかし、混合されたライブラリーのメンバーであり、かつ例えば抗原特異的免疫グロブリンサブユニットポリペプチドのコードによりライブラリーの他のクローンから単離されているようなクローンに含まれたポリヌクレオチドは、本発明の目的に関しては「単離」されていない。例えば、ウイルスベクターに含まれたポリヌクレオチドは、回収された後に、「単離」され、かつプラーク精製され、かつプラスミドベクターに含まれたポリヌクレオチドは、単独の細菌コロニーから増殖された後単離される。

【0109】

抗原が2種以上のエピトープを含み得、かついくつかの異なる免疫グロブリン分子がいずれか所定のエピトープへ結合し得るならば、いくつかの適当なポリヌクレオチド、例えば2、3、4、5、10、100又はそれ以上のポリヌクレオチドが、この態様の第一段階から回収され、その全ては第二のライブラリーポリヌクレオチドによりコードされた適当な免疫グロブリンサブユニットポリペプチドと一緒にされた場合に、関心のある抗原へ特異的に結合することが可能な免疫グロブリン分子又はそれらの抗原結合断片を形成する免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしていることが企図されている。第一のライブラリーから回収された異なるポリヌクレオチドの各々は、個別に分離されることが企図されている。しかし、これらのポリヌクレオチドは、同じ抗原特異性を伴うポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの群として単離することができ、かつこれらのポリヌクレオチドは互いに「単離」され得る。個別に又は集合的のいずれかで単離されたこのようなポリヌクレオチドの混合物は、以下に説明されるように、第二の段階で宿主細胞へ、個別に、又は2、3、4、5、10、100又はそれ以上の互いにプールされたポリヌクレオチドと共に、導入することができる。

【0110】

1種又は複数の適当なポリヌクレオチドが第一のライブラリーから一旦単離されると、この態様の第二の段階において、1種又は複数のポリヌクレオチドは、第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドによりコードされた免疫グロブリンサブユニットポリペプチド（複数）と結合することが可能である免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている第二のライブラリーにおいて同定され、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原結合断片を形成し、これは 関心のある抗原に特異的に結合するか、もしくは所望の機能的特性を有する。

【0111】

従って第二の段階は、第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの第二のライブラリーの、免疫グロブリン分子の発現が可能な宿主細胞集団への導入、先に説明されたような第一のライブラリーから単離された少なくとも1種のポリヌクレオチドの、同じ宿主細胞集団への導入、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の宿主細胞の表面での発現の許容もしくは細胞培地への完全な分泌、これらの宿主細胞、もしくはそこで宿主細胞が増殖している馴化培地との関心のある特異的抗原との接触、又は馴化培地への機能アッセイの実施、かつ関心のある抗原に結合しているこれらの宿主細胞、又は望ましい反応性を示す馴化培地において増殖したそれらの宿主細胞からの、第二のライブラリーのポリヌクレオチドの回収を含む。従って第二の段階は、第二のライブラリーのポリヌクレオチドによりコードされた第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドが、第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドのみを伴う宿主細胞と一緒にされることを除いて、第一の段階と非常に類似して実施される。前述のように、第一のライブラリーから単離された単独のクローン化されたポリヌクレオチドを使用されるか、あるいは、第一のライブラリーから単離されたいくつかのポリヌクレオチドのプールが、同時に導入され得る。前述の第一の段階のように、濃縮の1回又は複数回のラウンドが実行され、すなわち連続的により小さいプールの選択又はスクリーニングのいずれかが実行され、これにより、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部

として、関心のある抗原へ特異的に結合する、又は望ましい機能特性を発揮する第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている第二のライブラリーのポリヌクレオチドが濃縮される。同じく第一の段階のように、その後第二のライブラリー由来の1種又は複数の望ましいポリヌクレオチドが単離される。単離されたポリヌクレオチドのプールが第二の段階時により早期の濃縮ラウンドにおいて使用されるならば、好ましい引き続きの濃縮段階は、第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドのより小さいプールを使用することができ、又は更により好ましくは第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドが個別にクローニングされる。その後第二のライブラリーのポリヌクレオチドの選択段階に使用される第一のライブラリーから単離された個別のポリヌクレオチドに関して、いくつかの、すなわち2、3、4、5、10、100又はそれ以上のポリヌクレオチドが、第一のライブラリーからのポリヌクレオチドによりコードされた第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドと結合することが可能な第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている第二のライブラリーから単離されることが可能であり、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原結合断片を形成し、これは関心のある抗原に特異的に結合するか、又は望ましい機能的特性を示す。

10

【0112】

単鎖断片をコードしているライブラリーの選択／スクリーニング法は、第一及び第二のライブラリーよりもむしろ唯一のライブラリーを必要とし、かつ唯一の選択／スクリーニング段階が必要とされる。免疫グロブリンの2段階の各々と同様に、この1段階選択／スクリーニング法も、2回以上の濃縮ラウンドから恩恵を受ける。

20

【0113】

ベクター 真核細胞における抗体ライブラリーの構築において、真核細胞において発現が可能ないずれか標準のベクターを使用することができる。例えば、このライブラリーは、選択された特定のベクターが真核細胞において機能することが可能な転写及び翻訳の調節領域を含む限りは、ウイルス、プラスミド、ファージ、又はファージミドベクターにおいて構築することができる。しかし、前述のような抗体ライブラリーは、好ましくは真核ウイルスベクターにおいて構築される。

【0114】

真核ウイルスベクターは、例えば、動物ウイルスベクター又は植物ウイルスベクターのようないずれかの型であることができる。ウイルスベクターの天然のゲノムは、RNA、プラス鎖又はマイナス鎖、もしくは二本鎖のいずれか、又はDNAであり、かつこの天然のゲノムは環状又は線状のいずれかであることができる。動物ウイルスベクターの中で、例えば昆虫、原生動物、又は寄生蠕虫のような無脊椎動物に感染するもの；又は、例えば哺乳類、鳥類、魚類、爬虫類、及び両生類のような脊椎動物に感染するものが含まれる。ウイルスベクターの選択は、最大挿入断片サイズ、及び達成されるタンパク質発現レベルによってのみ制限される。適当なウイルスベクターは、酵母及び他の真菌細胞、昆虫細胞、原生動物細胞、植物細胞、鳥類細胞、魚類細胞、爬虫類細胞、両生類細胞、又は哺乳類細胞を感染するものであり、哺乳類ウイルスベクターが特に好ましい。標準のウイルスベクターを本発明において使用することができ、これはポックスウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルス）、ヘルペスウイルスベクター（例えば、単純ヘルペスウイルス）、アデノウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ピコナウイルスベクター（例えば、ポリオウイルス）、αウイルスベクター（例えば、シンドビスウイルス）、及びエンテロウイルスベクター（例えば、メングウイルス）を含むが、これらに限定されるものではない。DNAウイルスベクター、例えば、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、及びアデノウイルスが好ましい。以下により詳細に説明されるように、ポックスウイルス、特にオルトポックスウイルス、及び特別にはワクシニアウイルスが、特に好ましい。好ましい態様において、ウイルスベクターが選択される限りは、感染性ウイルスの粒子の産生を許容する宿主細胞が利用される。ワクシニアウイルスのような多くの標準ウイルスベクターは、非常に広範な宿主範囲を有し、これにより多種多様な宿主細胞の使用を可能にしている。

30

40

50

【0115】

前述のように、本発明の第一及び第二のライブラリーは、同じベクター内で構築することができ、もしくは、異なるベクター内で構築することができる。しかし、好ましい態様において、第一及び第二のライブラリーは、第一の段階において、第一のライブラリーのポリヌクレオチドが、第二のライブラリーのポリヌクレオチドから都合良く回収、例えば分離され、かつ第二の段階において、第二のライブラリーのポリヌクレオチドは、第一のライブラリーのポリヌクレオチドから都合良く回収されるように調製される。例えば、第一の段階において、第一のライブラリーがウイルスベクターにおいて構築され、かつ第二のライブラリーがプラスミドベクターにおいて構築されるならば、第一のライブラリーのポリヌクレオチドは、感染性ウイルス粒子として容易に回収される一方で、第二のライブラリーのポリヌクレオチドは、細胞デブリと共に残留される。同様に、第二の段階において、第二のライブラリーがウイルスベクターにおいて構築される一方で、第一の段階において単離された第一のライブラリーのポリヌクレオチドがプラスミドベクターに導入されるならば、第二のライブラリーのポリヌクレオチドを含有する感染性ウイルス粒子は、容易に回収される。

10

【0116】

ポリヌクレオチドの第二のライブラリー、又は第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドがプラスミドベクター中で宿主細胞へ導入される場合は、このようなプラスミドベクター内に含まれたポリヌクレオチドによりコードされている免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは、他のライブラリーを含むウイルスベクターによりコードされたタンパク質により起動される転写調節領域と操作可能に結合されることが好ましい。例えば、第一のライブラリーがボックスウイルスベクターにおいて構築され、かつ第二のライブラリーがプラスミドベクターにおいて構築されるならば、プラスミドライブラリー内に構築された第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、ボックスウイルス感染細胞の細胞質において機能する転写調節領域、好ましくはプロモーターと操作可能に結合されることが好ましい。第二の段階と同様に、第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドをプラスミドベクターへ挿入し、かつ第二のライブラリーがボックスウイルスベクターにおいて構築されることが望ましい場合は、第一のライブラリーから単離されかつプラスミドに挿入されたポリヌクレオチドが、ボックスウイルス感染細胞の細胞質において機能する転写調節領域、好ましくはプロモーターに操作可能に結合されるることが好ましい。この方法において、第二のライブラリーのポリヌクレオチドは、ボックスウイルスによっても感染されているこれらの細胞において発現されるのみである。

20

30

【0117】

しかし、2種の異なるベクターシステムにおいて一方又は両方のライブラリーを維持することよりも、ウイルスベクターのみにおいて、第一のライブラリーから単離されたこのようなポリヌクレオチドに加え、第一及び第二の両ライブラリーを維持することが都合がよい。従って本発明は、ウイルスベクターにおいて維持された第一又は第二のライブラリーの試料が失活され、その結果このウイルスベクターが細胞に感染し、かつウイルスベクターのゲノムは転写されるが、このベクターは複製されない、すなわち、このウイルスベクターが細胞へ導入された場合に、ウイルスゲノム上に保持された遺伝子産物、例えば免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは発現されるが、感染性ウイルス粒子は産生されないことを提供する。

40

【0118】

好ましい局面において、真核ウイルスベクターにおいて構築された第一又は第二のライブラリーのいずれかの失活は、4'-アミノメチルトリオキサレン（ソラレン）による、ウイルスベクターにおいて構築されたライブラリー試料の処理、その後のウイルスベクターの紫外線（UV光）への曝露により実行される。ウイルスのソラレン及びUVによる失活は、当業者に周知である。例えば、Tsung, K. ら、J. Virol.、70: 165-171（1996）を参照し、これはその全体が本明細書に参照として組入れら

50

れている。

【0119】

ソラレン処理は、典型的には、ウイルスベクターの細胞-非含有試料の、ソラレン濃度範囲約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約17.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は約9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と一緒にインキュベーションを含む。従って、ソラレン濃度は、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であることができる。好ましくは、ソラレン濃度は、約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。本明細書に使用される「約」という用語は、典型的には実験室又は製造施設において測定される時間、化学物質濃度、温度、pH、及び他の要因の測定値が、決して精密ではなく、測定の種類及び測定のために使用した装置を基に所定の量変動し得ることを考慮している。

10

【0120】

ソラレンとのインキュベーションは、典型的にはUV曝露前に一定時間行われる。この時間は、好ましくはUV曝露前約1分～約20分である。好ましい時間範囲は、約2分～約19分、約3分～約18分、約4分～約17分、約5分～約16分、約6分～約15分、約7分～約14分、約8分～約13分、又は約9分～約12分である。従って、インキュベーション時間は、約1分間、約2分間、約3分間、約4分間、約5分間、約6分間、約7分間、約8分間、約9分間、約10分間、約11分間、約12分間、約13分間、約14分間、約15分間、約16分間、約17分間、約18分間、約19分間、又は約20分間である。より好ましくは、インキュベーションは、UV曝露前10分間行われる。

20

【0121】

その後ソラレン処理したウイルスを、UV光に曝露する。UVは、任意の波長であってよいが、好ましくは長波長側UV光であり、例えば、約365nmである。UVへの曝露は、約0.1分～約20分の時間実行される。好ましくは、この時間範囲は、約0.2分～約19分、約0.3分～約18分、約0.4分～約17分、約0.5分～約16分、約0.6分～約15分、約0.7分～約14分、約0.8分～約13分、約0.9分～約12分、約1分～約11分、約2分～約10分、約2.5分～約9分、約3分～約8分、約4分～約7分、又は約4.5分～約6分である。従ってインキュベーション時間は、約0.1分間、約0.5分間、約1分間、約2分間、約3分間、約4分間、約5分間、約6分間、約7分間、約8分間、約9分間、約10分間、約11分間、約12分間、約13分間、約14分間、約15分間、約16分間、約17分間、約18分間、約19分間、又は約20分間である。より好ましくは、ウイルスベクターは、約5分間UV光に曝露される。

30

【0122】

免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの2種のライブラリーから真核細胞において免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を集成及び発現する能力は、細菌システムにおいて単鎖抗体を産生する方法に勝る顕著な改善を示し、ここで2段階選択プロセスは、様々な特異性を有する免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の選択を基本としている。

40

【0123】

更に例証されるが、本態様を限定するものではない具体的態様の例は、下記実施例において提供される。先に詳細に説明したように、特異的免疫グロブリンサブユニットポリペプチド、例えば免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の選択は、2相において実現される。最初に、ナイーブドナー又は免疫感作ドナーのいずれかの免疫グロブリン産生細胞由来の多様な重鎖のライブラリーは、例えば、ボックスウイルスベクターのような真核ウイルスベクターにおいて構築され、及び免疫グロブリン軽鎖の同様の多様なライブラリーが、組換え遺伝子の発現は、ウイルスプロモーターにより調節されるプラスミドベクター、又は例えばソ

50

ラレン及びUV処理により失活された真核ウイルスベクターのいずれかから構築される。免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現することが可能な宿主細胞は、重鎖ライブラリーをコードしているウイルスベクターに感染多重度約1 ($MOI = 1$) で感染されている。「感染多重度」は、各宿主細胞の感染に利用可能なウイルス粒子の平均数を意味する。例えば、 MOI が1、すなわち、平均で各細胞が1個のウイルス粒子により感染されることが望ましいならば、感染に使用されるべき感染性ウイルス粒子の数は、感染される細胞数と等しいように調節される。

【0124】

この戦略に従い、軽鎖ポリペプチドをコードしている平均で10又はそれ以上の個別のポリヌクレオチドを各細胞に取込ませかつ発現させることができる条件下で、宿主細胞は、
10 軽鎖プラスミドライブラリーによりトランスフェクションされるか、もしくは失活された軽鎖ウイルスライブラリーにより感染されるかのいずれかである。これらの条件下で、単独の宿主細胞は、各宿主細胞における特徴的 H_2L_2 構造で同じ重鎖に結合された異なる軽鎖を伴う、複数の免疫グロブリン分子、又はそれらの断片を発現することができる。

【0125】

当業者には、細胞に取込まれるプラスミド数の制御は、トランスフェクションの成功は均一でなくかつ可変量のDNAの取込みにつながる細胞のコンピテントな状態の誘導に左右されるので、困難であることは理解されると思われる。従って、各感染された宿主細胞に
20 導入される第二のライブラリーからのポリヌクレオチドの数の慎重な制御が望ましいこれらの態様において、失活されたウイルスベクターの使用が好ましく、その理由は、ウイルスの感染多重度を、より容易に制御することができるからである。

【0126】

単一の重鎖に結合された、単一の宿主細胞中の複数の軽鎖の発現は、特異的抗原免疫グロブリンの結合活性を低下する作用を有するが、比較的高親和性の結合部位の選択にとっては有益であろう。本明細書において使用される用語「親和性」は、個々のエピトープの免疫グロブリン分子のCDRへの結合強度の測定を意味する。例えば、Harlow、27-28ページを参照のこと。本明細書において使用される用語「結合活性」は、免疫グロブリン集団と抗原の間の複合体の全般的安定性、すなわち、免疫グロブリン混合物の抗原との機能的結合強度を意味する。例えば、Harlowら、29-34ページ参照のこと。
30 結合活性は、特異的エピトープと集団中の個々の免疫グロブリン分子の親和性、及び更には免疫グロブリンと抗原の結合価 ($valency$) の両方に関する。例えば、二価のモノクローナル抗体とポリマーのような高い反復エピトープ構造を伴う抗原の相互作用は、高結合活性の一つであると考えられる。当業者に理解されるように、宿主細胞がその表面に免疫グロブリン分子を発現し、各々が所定の重鎖を含むが、その表面の異なる免疫グロブリン分子が、異なる軽鎖を含むならば、所定の抗原に関するその宿主細胞の「結合活性」は低下されう。しかし、これらが共通の重鎖を含むが、異なる軽鎖を介して、親和性のスペクトルを伴う特定の抗原と反応する点に関連している免疫グロブリン分子の群を回収する可能性は、増大される。従って、所定の宿主細胞においてある数の重鎖又はそれらの断片と結合させられるような異なる軽鎖、又はそれらの断片の数を調節することにより、本発明は、変動する親和性レベルを伴う、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異
40 的断片を選択しかつ濃縮する方法を提供する。

【0127】

前述のような免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の選択法の第一段階の戦略を利用することにおいて、第一のライブラリーは、好ましくは真核ウイルスベクターにおいて構築され、かつこの宿主細胞は、第一のライブラリーにより MOI 範囲約1～約10で、好ましくは約1で感染されるが、第二のライブラリーは、各感染された宿主細胞により取込まれる該第二のライブラリーの最大20個のポリヌクレオチドを可能にする条件下で導入される。例えば、第二のライブラリーが失活されたウイルスベクターにおいて構築されるならば、宿主細胞は、第二のライブラリーにより、 MOI 範囲約1～約20において感染されるが、使用されるウイルスベクター及び望ましい免疫グロブリン分子の性質に
50

よって、この範囲よりもより高い又はより低いMOIも望ましいことがある。第二のライブラリーがプラスミドベクターにおいて構築される場合は、トランスフェクション条件は、0個のプラスミドから約20個のプラスミドが各宿主細胞に侵入することがどこでも可能になるように調節される。抗原に対するより低い又はより高い親和性反応の選択は、感染した各細胞への侵入が可能になる第二のライブラリーのポリヌクレオチドの平均数の増加又は減少により制御される。

【0128】

より好ましくは、第一のライブラリーがウイルスベクターにおいて構築される場合は、宿主細胞は、第一のライブラリーにより、MOI範囲約1~9、約1~8、約1~7、約1~6、約1~5、約1~4、又は約1~2の範囲で感染される。別の表現をすると、宿主細胞は、第一のライブラリーにより、MOI約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、約2、又は約1で感染される。最も好ましくは、宿主細胞は、第一のライブラリーにより、MOI約1で感染される。 10

【0129】

第二のライブラリーがプラスミドベクターにおいて構築される場合、プラスミドベクターは、より好ましくは、各感染した宿主細胞による第二のライブラリーの最大約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、約2、又は約1個のポリヌクレオチド（複数）の取込みが可能になる条件下で、宿主細胞へ導入される。最も好ましくは、第二のライブラリーがプラスミドベクターにおいて構築される場合、このプラスミドベクターは、各感染した宿主細胞による第二のライブラリーの最大約10個のポリヌクレオチドの取込みが可能になる条件下で、宿主細胞へ導入される。 20

【0130】

同様に、第二のライブラリーが、失活されたウイルスベクターにおいて構築される場合、第二のライブラリーが宿主細胞へ、MOI範囲約1~19、約2~18、約3~17、約4~16、約5~15、約6~14、約7~13、約8~12、又は約9~11で導入されることがより好ましい。別の表現をすると、宿主細胞は、第二のライブラリーにより、MOI約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約11、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、約2、又は約1で感染される。最も好ましい局面において、宿主細胞は、MOI約10で第二のライブラリーにより感染される。当業者に理解されるように、失活されたウイルスの力価、従って「MOI」は、直接測定することはできないが、しかしこの力価は、引き続き失活される開始の感染性ウイルスストックの力価から推測することができる。 30

【0131】

最も好ましい局面において、第一のライブラリーは、ウイルスベクターにおいて構築され、かつ第二のライブラリーは、失活されたウイルスベクターにおいて構築され、宿主細胞は、該第一のライブラリーによりMOI約1で感染され、かつこの宿主細胞は、第二のライブラリーによりMOI約10で感染されている。

【0132】

本発明において、好ましいウイルスベクターは、ポックスウイルス、例えば、ワクシニアウイルスに由来している。第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている第一のライブラリーが、ポックスウイルスベクターにおいて構築され、かつプラスミドベクター又は失活されたウイルスベクターにおいて構築された第二のライブラリーにおいてコードされた第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの発現が、ポックスウイルスプロモーターにより調節されるならば、高レベルの第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドが、核組込みを必要とせずに、ポックスウイルス感染細胞の細胞質において発現される。 40

【0133】

先に説明したような免疫グロブリン選択の第二段階において、この第二のライブラリーは、好ましくは、感染性真核ウイルスベクターにおいて構築され、かつ宿主細胞は、第二の 50

ライブラリーによりMOI範囲が約1～約10で感染される。より好ましくは、第二のライブラリーが、ウイルスベクターにおいて構築される場合、宿主細胞は、第二のライブラリーにより、MOI範囲約1～9、約1～8、約1～7、約1～6、約1～5、約1～4、又は約1～2において感染される。別の言い方をすると、宿主細胞は、第二のライブラリーにより、MOI約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、約2、又は約1で感染される。最も好ましくは、宿主細胞は、第二のライブラリーによりMOI約1で感染される。

【0134】

免疫グロブリン選択の第二段階において、第一のライブラリー由来のポリヌクレオチドは単離されている。ある態様において、単独の第一のライブラリーポリヌクレオチド、すなわちクローンが、第二のライブラリーからのポリヌクレオチドを単離するために使用される宿主細胞に導入される。この状況において、第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドは、宿主細胞1個につき少なくとも約1個のポリヌクレオチドを可能にする条件下で、宿主細胞へ導入される。しかし、第一のライブラリーから導入される全てのポリヌクレオチドは同じ、すなわちクローン化されたポリヌクレオチドのコピーであるので、いずれか所定の宿主細胞へ導入されたポリヌクレオチドの数は、余り重要ではない。例えば、第一のライブラリーから単離されたクローン化されたポリヌクレオチドが失活されたウイルスベクターに含まれる場合、このベクターは、MOI約1で導入されるが、1より大きいMOIも許容されうる。同様に、第一のライブラリーから単離されたクローン化されたポリヌクレオチドが、プラスミドベクターへ導入される場合、いずれか所定の宿主細胞へ導入されるプラスミドの数は、余り重要ではなく、むしろ、少なくとも1個のポリヌクレオチドが、各宿主細胞へ導入されることを確実にするように、トランスフェクション条件が調節されなければならない。例えばいくつかの異なるポリヌクレオチドが第一のライブラリーから単離される場合には、別の態様を利用することができる。この態様において、第一のライブラリーから単離された2種以上の異なるポリヌクレオチドのプールは、ポリヌクレオチドの第二のライブラリーで感染された宿主細胞を恐らく有利に導入するであろう。この状況において、第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドが、失活されたウイルスベクターに含まれるならば、約1よりも大きい、例えば約2、約3、約4、約5、又はそれ以上のMOIの失活されたウイルス粒子が好ましく、第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドがプラスミドベクターに含まれるならば、少なくとも約2、3、4、5又はそれ以上のポリヌクレオチドを各細胞へ侵入させることが可能な条件が好ましい。

【0135】

ボックスウイルスベクター 前述のように、本発明における使用にとって好ましいウイルスベクターは、ボックスウイルスベクターである。「ボックスウイルス」は、ボックスウイルス科のメンバーを含み、これは亜科チョルドボックスウイルス（脊椎動物ボックスウイルス）及びエントモボックスウイルス（昆虫ボックスウイルス）を含む。例えば、B. Mossの「ウイルス学（Virology）」第2版、B. N. Fields、D. M. Knipeら編集、Raven Press社、2080（1990）参照。チョルドボックスウイルスは、特に、下記の属を含む：オルトボックスウイルス（例えば、ワクシニア、バリオラウイルス、アライグマボックスウイルス）；アピボックスウイルス（例えば、鶏痘ウイルス）；カプリボックスウイルス（例えば、羊痘）、レポリボックスウイルス（例えば、ウサギ（Shope）線維腫、及び粘液腫）；及び、スイボックスウイルス（例えば、ブタ痘）。エントモボックスウイルスは、3つの属A、B及びCを含む。本発明において、オルトボックスウイルスが好ましい。ワクシニアウイルスは、プロトタイプのオルトボックスウイルスであり、かつ異種タンパク質発現のためのベクターとして開発されており、よく特徴付けられている。本発明において、ワクシニアウイルスベクター、特に三分子組換えを行うために開発されたものが、好ましい。しかし、他のオルトボックスウイルス、特にアライグマボックスウイルスが、ベクターとして開発されており、かつ一部の用途において、優れた品質を有している。

10

20

30

40

50

【0136】

ポックスウイルスは、それらの大きいサイズ及び複雑性により識別され、かつ同様に大きくかつ複雑なゲノムを含む。とりわけ、ポックスウイルス複製は、宿主細胞の細胞質内全体で生じる。ポックスウイルスゲノムの中心部分は類似しているが、そのウイルスゲノムの末端部分は、比較的大きい可変性により特徴付けられる。従って、ポックスウイルスゲノムの中心部分は、複製のような、全てのポックスウイルスに共通の本質的機能に寄与する遺伝子を保持すると思われる。対照的に、ポックスウイルスゲノムの末端部分は、異なるポックスウイルス間で変動し、恐らく組織培養物中でのウイルス複製にとって余り本質的ではなく、病原性及び宿主範囲のような特徴に寄与するように思われる。ポックスウイルスゲノムがDNA断片の再構成又は除去により、もしくは外因性DNA断片の導入により修飾される場合、外因性DNAの導入により再構成、除去又は破壊される天然のDNAの一部は、好ましくは、ウイルスの複製及び組織培養物中の感染性ビリオンの産生にとって必須ではないように思われる比較的遠位領域に存在することになる。

【0137】

天然のワクシニアウイルスゲノムは、約186,000塩基対(bp)の、架橋された二本鎖の直鎖状DNA分子であり、これは逆方向末端反復配列により特徴付けられている。ワクシニアウイルスのゲノムは、完全に配列決定されているが、ほとんどの遺伝子産物の機能は依然不明である。Goebel, S. J. ら、Virology、179:247-266, 517-563 (1990); Johnson, G. P. ら、Virology、196:381-401。様々な必須でない領域が、ワクシニアウイルスゲノムにおいて同定されている。例えば、Perkus, M. E. ら、Virology、152:285-97 (1986); 並びに、Kotwal, G. J. 及びMoss B.、Virology、167:524-37参照。

【0138】

これらのポックスウイルスベクター、特にワクシニアウイルスベクターが免疫サブユニットポリペプチドの発現に使用されるような態様において、いずれか適当なポックスウイルスベクターを使用することができる。免疫グロブリンサブユニットポリペプチドのライブラリーが、ベクターの増殖及び複製に必須でないベクターの領域に保持され、その結果感染性ウイルスが産生されることが好ましい。ワクシニアウイルスゲノムの様々な非必須領域が特徴付けられているが、外来遺伝子の挿入のために最も広範に使用される座位は、ゲノムのHindIII断片に位置したチミジンキナーゼ位である。ある好ましいワクシニアウイルスベクターにおいて、tk位は1個又は2個の独自の制限酵素部位を含むように操作されており、ライブラリー作成の三分子組換え法での使用に都合が良くなっている。下記及びZaudererのPCT公開国際公開公報第00/028016号も参照のこと。

【0139】

免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのライブラリーは、ポックスウイルス感染細胞の細胞質において機能する転写調節領域との操作可能な結合下で、ポックスウイルスベクター、特にワクシニアウイルスベクターに挿入されている。

【0140】

ポックスウイルス転写調節領域は、プロモーター及び転写終結シグナルを含む。ポックスウイルスにおける遺伝子発現は、一時的に調節され、かつ初期、中期及び後期遺伝子のプロモーターは、変動する構造を有する。あるポックスウイルス遺伝子は、構成的に発現されており、かつこれらの「初期-後期」遺伝子のためのプロモーターは、ハイブリッド構造を生じる。合成的初期-後期プロモーターも、開発されている。Hammond J. M. ら、J. Virol. Methods、66:135-8 (1997); Chakrabarti S. ら、Biotechniques、23:1094-7 (1997)。本発明において、あらゆるポックスウイルスプロモーターを使用することができるが、初期、後期又は構成的プロモーターの使用が、選択された宿主細胞及び/又は選択計画

を基に望ましい。典型的には、構成的プロモーターの使用が好ましい。

【0141】

初期プロモーターの例は、7.5-kDプロモーター（同じく後期プロモーター）、DN A p o lプロモーター、t kプロモーター、RNA p o lプロモーター、19-kDプロモーター、22-kDプロモーター、42-kDプロモーター、37-kDプロモーター、87-kDプロモーター、H3'プロモーター、H6プロモーター、D1プロモーター、D4プロモーター、D5プロモーター、D9プロモーター、D12プロモーター、I3プロモーター、M1プロモーター、及びN2プロモーターを含む。例えば、M o s s , B.、「ボックスウイルス及びそれらの複製 (P o x v i r i d a e a n d t h e i r R e p l i c a t i o n)」 「ウイルス学」、第2版、B. N. F i e l d s、D. M. K n i p eら編集、R a v e n P r e s s社、2088頁（1990）参照のこと。ワクシニアウイルス及び他のボックスウイルスにおいて転写された初期遺伝子は、転写終結シグナルTTTTNTを認識し、ここでNは、いずれかのヌクレオチドであることができる。転写は通常、このシグナルのおよそ50bp上流で終結する。従って、異種遺伝子がボックスウイルス初期プロモーターから発現されるならば、これらの遺伝子のコード領域内のこのシグナルの出現を排除するように注意しなければならない。例えば、E a r l , P. L.ら、J. V i r o l.、64:2448-51（1990）参照。

【0142】

後期プロモーターの例は、7.5-kDプロモーター、M I Lプロモーター、37-kDプロモーター、11-kDプロモーター、11Lプロモーター、12Lプロモーター、13Lプロモーター、15Lプロモーター、17Lプロモーター、28-kDプロモーター、H1Lプロモーター、H3Lプロモーター、H5Lプロモーター、H6Lプロモーター、H8Lプロモーター、D11Lプロモーター、D12Lプロモーター、D13Lプロモーター、A1Lプロモーター、A2Lプロモーター、A3Lプロモーター、及びP4bプロモーターを含む。例えば、M o s s , B.、「ボックスウイルス及びそれらの複製」 「ウイルス学」、第2版、B. N. F i e l d s、D. M. K n i p eら編集、R a v e n P r e s s社、2090頁（1990）参照のこと。後期プロモーターは明らかに、初期プロモーターにより認識された転写終結シグナルを認識しない。

【0143】

本発明における使用にとって好ましい構成的プロモーターは、H a m m o n d及びC h a k r a b a r t iにより説明された合成的初期-後期プロモーター、MH-5初期-後期プロモーター、及び7.5-kD又は「p7.5」プロモーターである。これらのプロモーター利用の例は本明細書に明らかにされている。

【0144】

より詳細に以下に論ずるように、宿主細胞死を基にした選択及びスクリーニングの方法は、細胞死につながる機構が、ウイルス感染により引き起される細胞変性効果 (C P E) の前に生じることを必要としている。ウイルス感染細胞におけるC P Eの始まりの速度論は、使用されるウイルス、感染多重度、及び宿主細胞の種類によって決まる。例えば、M O I約1でワクシニアウイルスにより感染した多くの組織培養株において、C P Eは、感染の48~72時間後までは重要ではない。これは、2~3日の時間枠での免疫グロブリン分子の高レベルの発現、及びベクターにより引き起されるC P Eとは無関係の抗原-ベースの選択を可能にする。しかし、この時間枠は、ある選択法にとっては、特に比較的高いM O Iが使用される場合、及び更にはC P E開始前の時間が望ましい細胞株において短縮される場合には、十分ではない。従って、必要な場合に、選択の時間枠を延長することができるように、弱毒化された細胞変性効果を伴うウイルスベクター、特にワクシニアウイルスのようなボックスウイルスベクターの必要性がある。

【0145】

例えば、ある弱毒化は、遺伝的変異により実現される。これらは、完全に欠失変異体であり、すなわち感染性ウイルス粒子の作成はヘルパーウイルスを必要とするか、もしくは、これらは条件付け変異体、例えば、温度感受性変異体であることができる。条件付け変異

体が、宿主遺伝子発現が必要な期間にわたり、ウイルス感染した宿主細胞を、非許容 (permissive) 環境、例えば、非許容温度において維持することができ、その後許容環境、例えば許容温度へシフトされ、ウイルス粒子の作成が可能になる点で、特に好ましい。あるいは完全に感染性のウイルスは、感染サイクルの所定の時点でウイルス複製を可逆的にブロックする化学的インヒビターにより「弱毒化」される。化学的インヒビターは、ヒドロキシ尿素及び5-フルオロデオキシウリジンを含むが、これらに限定されるものではない。ウイルス感染した宿主細胞は、宿主遺伝子発現が必要な期間化学的インヒビターにより維持され、その後化学的インヒビターが除去され、ウイルス粒子が作成される。

【0146】

多くの弱毒化されたポックスウイルス、特にワクシニアウイルスが開発されている。例えば、修飾されたワクシニアアンカラ (MVA) は、初代ニワトリ胚繊維芽細胞における570を超える継代の間に得られたワクシニアウイルスの高度に弱毒化された株である (Mayr, A. ら、Infection, 3: 6-14 (1975))。回収されたウイルスは、そのウイルスの宿主範囲制限に大いに影響している野生型ワクシニアDNAのおよそ15%を欠損している。MVAは、ほとんどの哺乳類細胞株において、複製することができないか、又は極めて非能率に複製する。宿主範囲制限の独自の特徴は、非許容細胞におけるブロックが複製サイクルのかなり後期に発生することである。ウイルスの後期遺伝子の発現は、余り損なわれていないが、ビリオンの形態形成は妨害されている (Suter, G. 及び Moss, B., Proc Natl Acad Sci USA, 89: 10847-51 (1992); Carroll, M. W. 及び Moss, B., Virology, 238: 198-211 (1997))。たとえ非許容宿主細胞内であっても高レベルのウイルスのタンパク質合成は、MVAを特に安全かつ効率的な発現ベクターとする。しかしMVAは、ほとんどの哺乳類細胞において感染サイクルを完成することができないので、選択の複数サイクルについて感染性ウイルスを回収するためには、それ自身欠失しておりかつ引き続きのMVA許容宿主細胞における低MOIでの示差的拡張により感染性MVA組換え体から分離することができるようヘルパーウイルスによる同時感染又は重感染により、MVA欠失を補完することが必要であると考えられる。

【0147】

ポックスウイルス感染は、宿主細胞のタンパク質及びRNA合成に劇的阻害作用を有することができる。これらの宿主遺伝子発現に対する作用は、いくつかの条件下で、宿主細胞に対し限定された生理的作用を有する特異的ポックスウイルス組換え体の選択を妨げると考えられる。必須の初期遺伝子を欠失しているワクシニアウイルス株の一部は、宿主細胞タンパク質合成に対して大きく低下された阻害作用を有することが示されている。限定された必須の初期遺伝子を欠いている弱毒化されたポックスウイルスも、説明されている。例えばFalcknerらの米国特許第5,766,882号、及び第5,770,212号を参照のこと。欠損性となることができる必須の初期遺伝子の例は、ワクシニアウイルス17L、F18R、D13L、D6R、A8L、J1R、E7L、F11L、E4L、I1L、J3R、J4R、H7R及びA6R遺伝子を含むが、これらに限定されるものではない。欠損性となる好ましい必須の初期遺伝子は、D4R遺伝子であり、これはウラシルDNAグリコシラーゼ酵素をコードしている。限定された必須の遺伝子を欠損しているワクシニアウイルスは、必須の遺伝子産物を提供する細胞株の補完において容易に繁殖される。

【0148】

本明細書において使用される「補完」という用語は、宿主細胞、トランスジェニック動物又はヘルパーウイルスのような、別の供給源によりトランスで (in trans) 喪失された機能を回復することを意味する。この機能喪失は、その機能に寄与する遺伝子産物の欠損ウイルスによる喪失により引き起される。従って、欠損ポックスウイルスは、親ポックスウイルスの生存不能型であり、かつ補完の存在下で生存可能となることができる型である。宿主細胞、トランスジェニック動物又はヘルパーウイルスは、喪失遺伝子産物

10

20

30

40

50

をコードしている配列、又は「補完エレメント」を含む。この補完エレメントは、宿主細胞、トランスジェニック動物又はヘルパーウイルスにおいて発現可能でありかつ安定して組入れられなければならない、かつ好ましくは、欠損ポックスウイルスのゲノムによる組換えリスクがほとんど又は全くないように施される。

【0149】

細胞株を補完することで産生されるウイルスは、非補完細胞の感染が可能であり、更に初期遺伝子産物の高レベル発現が可能である。しかし、必須の遺伝子産物の非存在下で、感染性ウイルス粒子の宿主シャットオフ (h o s t s h u t - o f f)、DNA複製、パッケージング、及び産生は生じない。

【0150】

本明細書において説明された特に好ましい態様において、ワクシニアウイルスにおいて構築された複合ライブラリーにおいて発現された望ましい標的遺伝子産物の選択は、補完エレメントの発現の誘導を所望の標的遺伝子産物の発現と組み合わせることにより実現される。この補完エレメントは望ましい遺伝子産物を発現しているそれらの宿主細胞において発現されるのみであるので、これらの宿主細胞のみが、容易に回収される感染性ウイルスを産生する。

【0151】

ワクシニアウイルスに関連している好ましい態様は、いずれかのポックスウイルスベクターの使用に関して、当業者には明らかな方法により修飾することができる。直接の選択法において、ポックスウイルス又はワクシニアウイルス以外のベクターが使用され得る。

【0152】

三分子組換え法 伝統的に、ワクシニアウイルスのようなポックスウイルスベクターは、構築及びスクリーニングライブラリーの高効率、高力価一作出法は、ワクシニアに関して存在しないので、複雑なライブラリーから関心のあるこれまで未知の遺伝子を同定するためには使用されていない。ワクシニアウイルスにおける異種タンパク質発現の標準法は、インビボにおける相同的組換え及びインビトロにおける直接ライゲーションに関連している。相同的組換えを使用すると、組換えウイルス作出の効率は、およそ0.1%又はそれ未満の範囲である。直接ライゲーションを使用する組換えウイルス産生の効率は、比較的高く、得られる力価は、比較的低い。従って、ワクシニアウイルスベクターの使用は、タンパク質発現及びワクチン開発を目的として先に単離されたDNAのクローニングに限定される。

【0153】

Z a u d e r e r の P C T 公開国際公開公報第00/028016号に開示された三分子組換えは、ワクシニアウイルスのクローニングのための新規の高効率、高力価作出法である。三分子組換え法を使用し、本発明者らは、組換えウイルスの作成を達成し、これは直接ライゲーションにより得られるものの効率が少なくとも90%、及び力価は少なくとも2桁大きい。

【0154】

従って好ましい態様において、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの発現が可能なポリヌクレオチドのライブラリーは、ポックスウイルスベクターにおいて、好ましくはワクシニアウイルスベクターにおいて、三分子組換えにより構築される。

【0155】

「三分子組換え」又は「三分子組換え法」は、ウイルスゲノム、好ましくはポックスウイルスゲノムの作出法を意味し、更により好ましくはレシピエント細胞へのウイルスゲノム及び導入ベクター、又は挿入断片DNAを含む伝達DNAの2個の非相同断片の導入による、異種挿入断片DNAを含むワクシニアウイルスゲノムの作出法を意味し、これにより3種のDNA分子のインビボ組換えが可能になる。この組換えの結果、2個のゲノム断片及び挿入断片DNAの各々を含む生存可能なウイルスゲノム分子が作出される。従って本発明に使用される三分子組換え法は、下記の段階を含む：(a) 単離されたウイルスゲノムの、好ましくはDNAウイルスゲノムの、より好ましくは直鎖状DNAウイルスゲノム

10

20

30

40

50

の、及び更により好ましくはボックスウイルス又はワクシニアウイルスゲノムの切断による、第一のウイルス断片及び第二のウイルス断片の作成であり、ここで第一のウイルス断片は、第二のウイルス断片と非相同である段階；(b) 5'側フランキング領域及び3'側フランキング領域にフランキングされた転写調節領域との操作可能な結合を介して、免疫グロブリンサブユニットポリペプチド、例えば免疫グロブリン軽鎖、免疫グロブリン重鎖、又はいずれかの抗原特異的断片をコードしているポリヌクレオチドを含む伝達性プラスミドの集団を提供する段階であり、ここでこの5'フランキング領域が(a)に説明された該ウイルスの断片と相同であり、かつ3'フランキング領域が(a)に説明された該第二のウイルスの断片と相同であり；ここで伝達性プラスミドは、第一及び第二のウイルスの断片による相同的組換えが可能であり、その結果、生存可能なウイルスゲノムが形成される段階；(c) (b)に説明された伝達性プラスミド並びに(a)に説明された第一及び第二のウイルスの断片を、宿主細胞へ、伝達性プラスミド及び2種のウイルスの断片がインビボにおいて相同的組換えを受ける、すなわち三分子組換えを受ける条件下で導入する段階であり、これにより、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む生存可能な修飾されたウイルスゲノムが作出される段階；並びに、(d)この技術により作出された修飾されたウイルスゲノムを回収する段階。好ましくは、回収された修飾されたウイルスゲノムは、感染性ウイルスの粒子内にパッケージングされる。

【0156】

「組換え効率」又は「組換えウイルス作出の効率」は、本発明のウイルスライブラリーを作成する間に作出された組換えウイルスの総ウイルスに対する比を意味する。実施例5に示されたように、この効率は、組換えウイルスの力価を、総ウイルスの力価で除算し、かつ100%に積算することにより算出することができる。例えば、この力価は、選択を伴う(例えば、組換えウイルスについて)又は選択を伴わない(例えば、組換えウイルス＋野生型ウイルスについて)のいずれかの適当な細胞に対する粗ウイルスストックのプラークアッセイにより決定される。選択法は、特に異種ポリヌクレオチドがウイルスのチミジンキナーゼ(tk)位に挿入される場合に、当技術分野において周知であり、かつtk遺伝子の破壊によるプロモドオキシウリジン(BDUR)又は他のヌクレオチドアナログに対する耐性を含む。選択法の例は、本明細書に説明されている。

【0157】

「高効率の組換え」は、組換え効率が少なくとも1%、及びより好ましくは組換え効率が少なくとも約2%、2.5%、3%、3.5%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%を意味する。

【0158】

多くの選択システムを使用することができ、これは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wiglerら、Cell、11:223(1977))遺伝子、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、48:2026(1962))遺伝子、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、Cell、22:817(1980))遺伝子のような、各々、tk⁻、hgprt⁻又はaprt⁻細胞を使用することができる、チミジンキナーゼを含むが、これらに限定されるものではない。更に、代謝拮抗耐性を、下記の遺伝子の選択の基本として使用することができる：dhfr、これはメトトレキサート耐性を付与する(Wiglerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:3567(1980))；O'Hareら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、78:1527(1981))；gpt、これはミコフェノール酸耐性を付与する(Mulligan及びBerg、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、78:2072(1981))；neo、これはアミノグリコシドG-418耐性を付与する(Colberre-Garaipinら、J. Mol. Biol.、150:1(1981))；及び、hygro、

ヒグロマイシン耐性を付与する (S a n t e r r e ら、G e n e、30:147 (1984))。

【0159】

第一及び第二のウイルス断片又はウイルスゲノムの「アーム」は、前述のように、一緒に、ウイルスの複製及び感染性ウイルスの粒子の作出に必要な全ての遺伝子を含むことが好ましい。ワクシニアウイルスベクターを使用するそれらの作出に関する適当なアーム及び方法の例は、本明細書に明らかにされている。更にワクシニア複製の必須領域に関する指針については F a l k n e r らの米国特許第 5, 770, 212 号を参照のこと。

【0160】

しかし、ワクシニアウイルスゲノムのような裸のボックスウイルスゲノム DNA は、ウイルスがコードしたタンパク質を伴わない感染性子孫、生じるウイルスの粒子に結合されたタンパク質 (複数) / 機能 (複数) を作出しない。必要なウイルスがコードした機能は、トランスフェクションされたワクシニア DNA を鋳型として認識する RNA ポリメラーゼを含み、トランスフェクションされた DNA の転写及び最終的には複製を含む。D o r n e r らの米国特許第 5, 445, 953 号を参照のこと。

【0161】

従って、ワクシニアウイルスのようなボックスウイルスを使用する三分子組換えにより感染性子孫ウイルスを作出するために、レシピエント細胞は、パッケージング機能を含むことが好ましい。このパッケージング機能は、ヘルパーウイルス、すなわちトランスフェクションされた裸のゲノム DNA と共に、子孫ウイルスの複製及び集成に必要な適当なタンパク質及び因子を提供するウイルスにより提供され得る。

【0162】

このヘルパーウイルスは、同じ又は異なる属の密接に関連したウイルス、例えばワクシニアと同じボックスウイルス亜科のボックスウイルスである。このような場合、トランスフェクションされた DNA を鋳型として認識し、これによりトランスフェクションされた DNA の転写、及び最終的には複製を開始する RNA ポリメラーゼを提供するヘルパーウイルスを選択することは利点である。密接に関連したウイルスがヘルパーウイルスとして使用される場合、感染性ウイルスの形成が損なわれるように弱毒化されることは利点である。例えば、温度感受性ヘルパーウイルスを、非許容温度で使用することができる。好ましくは、異種ヘルパーウイルスが使用される。例としては、鶏痘ウイルスのようなアビボックスウイルス、又はエクトロメリアウイルス (マウスボックス) ウイルスを含むが、これらに限定されるものではない。特に、アビボックスウイルスが好ましく、これらは必要なヘルパー機能は提供するが、哺乳類細胞において複製せず、又は感染性ビリオンを生じない (S c h e i f l i n g e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、89:9977-9981 (1992))。異種ウイルスの使用は、密に関連したウイルスの相同配列がひとつの細胞に存在する場合に生じるようなヘルパーウイルスゲノムとトランスフェクションされたゲノムの間の組換え事象を最小化する。F e n n e r 及び C o m b e n、V i r o l o g y、5:530 (1958) ; F e n n e r、V i r o l o g y、8:499 (1959) 参照。

【0163】

あるいは、レシピエント細胞において必要なヘルパー機能は、ヘルパーウイルス以外の遺伝的エレメントにより供給される。例えば、宿主細胞を形質転換し、構成的にヘルパー機能作出するか、又は宿主細胞を、ヘルパー機能を発現しているプラスミドで一過性にトランスフェクションするか、ヘルパー機能を発現しているレトロウイルスで感染するか、もしくは獲得されたヘルパーウイルス機能を発現するのに適したいずれか他の発現ベクターと共に提供するかすることができる。D o r n e r ら、米国特許第 5, 445, 953 号を参照のこと。

【0164】

三分子組換え法に従い、第一及び第二のウイルスのゲノム断片を、互いにライゲーシオン又は組換えることはできず、すなわち、これらは適合可能な付着末端又は相同領域を含み

ないか、あるいは付着末端は脱リン酸化酵素により処理されている。好ましい態様において、ウイルスゲノムは、第一の制限エンドヌクレアーゼのための第一の認識部位及び第二の制限エンドヌクレアーゼのための第二の認識部位を含み、かつ第一及び第二のウイルス断片は、ウイルスゲノムの適当な制限エンドヌクレアーゼによる消化により作成され、ウイルスの「アーム」を作出し、かつ第一及び第二のウイルス断片が標準法により単離される。理想的には、第一及び第二の制限エンドヌクレアーゼ認識部位は、このウイルスのゲノムにおいて特有であり、あるいは2種の制限エンドヌクレアーゼによる切断は、全ての必須機能に関する遺伝子を含むウイルスの「アーム」を生じ、すなわち、第一及び第二の認識部位は、第一及び第二のウイルス断片の間の伸びる領域がウイルス感染性には必須でないようにウイルスのゲノム内において物理的に配列されている。

10

【0165】

三分子組換え法においてワクシニアウイルスベクターが使用されるような好ましい態様において、*t k* 遺伝子内に2個の独自の制限部位を伴うウイルスゲノムを含むワクシニアウイルスベクターが使用される。ある好ましいワクシニアウイルスゲノムにおいて、第一の制限酵素は *N o t I* であり、これは *t k* 遺伝子内に認識部位 *G C G G C C G C* を有し、かつ第二の制限酵素は *A p a I* であり、これは *t k* 遺伝子内に認識部位 *G G G C C C* を有する。更により好ましいのは、*v 7 . 5 / t k* ウイルスゲノム又は *v E L / t k* ウイルスゲノムを含むワクシニアウイルスベクターである。

【0166】

この態様に従い、チミジンキナーゼ遺伝子を含むワクシニアウイルスゲノムの領域との相
同的組換えが可能なフランキング領域を伴う伝達性プラスミドが使用される。*H i n d I*
I I - J 断片を含むワクシニアウイルスゲノムの断片は、*t k* 遺伝子を含むが、これは都
合良く使用される。

20

【0167】

ウイルスベクターがボックスウイルスである場合、挿入断片ポリヌクレオチドは、好まし
くはボックスウイルス発現調節配列に操作可能に結合され、より好ましくは *p 7 . 5* 又は
合成初期／後期プロモーターのような強力な構成的ボックスウイルスプロモーターである
。

【0168】

従って、本発明の伝達性プラスミドは、ワクシニアウイルス *p 7 . 5* プロモーター、又は
合成初期／後期プロモーターとの操作可能な結合を介して、免疫グロブリンサブユニット
ポリペプチド、例えば重鎖、及び免疫グロブリン軽鎖、又は重鎖もしくは軽鎖の抗原特異
的断片をコードしているポリヌクレオチドを含む。

30

【0169】

ワクシニアウイルス *p 7 . 5* プロモーターとの操作可能な結合を介して免疫グロブリン重
鎖ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む本発明の好ましい伝達性プラス
ミドは、*p V H E* であり、これは下記配列を含み：

GGCCAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGCGCGCCGCAAACCATGGGATGGAGCTG
TATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGG**CGCGCATATGGTCACCGTCTCCTCAGGGAG**
TGATCCGCCCCAACCTTTTCCCCCTCGTCTCCTGTGAGAAATCCCCCGTCGGATACGAGCAG
CGTGCCGTTGGCTGCCTCGCACAGGACTTCTTCCCCGACTCCATCACTTTCTCTCGAAATA
CAAGAACAACCTCTGACATCAGCAGCACCCGGGGCTTCCCATCAGTCCTGAGAGGGGGCAAGTA
CGCAGCCACCTCACAGGTGCTGCTGCCTTCCAAGGACGTATGCAGGGCACAGACGAACACGT
GGTGTGCAAAGTCCAGCACCCCAACGGCAACAAAGAAAAGAACGTGCCTCTTCCAGTGATTGC
TGAGCTGCCTCCCAAAGTGAGCGTCTTCGTCCACCCCGCGACGGCTTCTTCGGCAACCCCG
CAGCAAGTCCAAGCTCATCTGCCAGGCCACGGGTTTCAGTCCCCGGCAGATTTCAGGTGCTCTG
GCTGCGCGAGGGGAAGCAGGTGGGGTCTGGCGTCACCACGGACCAGGTGCAGGCTGAGGCCAA
AGAGTCTGGGGCCACGACCTACAAGGTGACTAGCACACTGACCATCAAAGAGAGCGACTGGCT
CAGCCAGAGCATGTTACCTGCCGCGTGGATCACAGGGGCCTGACCTTCCAGCAGAATGCGTC
CTCCATGTGTGTCCCGATCAAGACACAGCCATCCGGGTCTTCGCCATCCCCCATCCTTTGC
CAGCATCTTCTTACCAAGTCCACCAAGTTGACCTGCCTGGTCACAGACCTGACCACCTATGA
CAGCGTGACCATCTCCTGGACCCGCCAGAATGGCGAAGCTGTGAAAACCCACACCAACATCTC
CGAGAGCCACCCCAATGCCACTTTCAGCGCCGTGGGTGAGGCCAGCATCTGCGAGGATGACTG
GAATTCGGGGAGAGGTTACGTGCACCGTGACCCACACAGACCTGCCCTCGCCACTGAAGCA
GACCATCTCCCGCCCAAGGGGTGGCCCTGCACAGGCCGATGTCTACTTGCTGCCACCAGC
CCGGGAGCAGCTGAACCTGCGGGAGTCGGCCACCATCACGTGCCTGGTGACGGGCTTCTCTCC
CGCGACGTCTTCGTGCAGTGGATGCAGAGGGGGCAGCCCTTGTCCCGGAGAAGTATGTGAC
CAGCGCCCCAATGCCTGAGCCCCAGGCCCGGCTACTTCGCCACAGCATCCTGACCGT
GTCCGAAGAGGAATGGAACACGGGGGAGACCTACACCTGCGTGGTGCCCCATGAGGCCCTGCC
CAACAGGGTCACTGAGAGGACCGTGGACAAGTCCACCGAGGGGGAGGTGAGCGCCGACGAGGA
GGGCTTTGAGAACCTGTGGGCCACCGCTCCACCTTCATCGTCTCTTCTCTCTGAGCCTCTT
CTACAGTACCACCGTCACCTTGTTCAAGGTGAAATGAGTCGAC

10

20

これは本明細書において配列番号：14と称される。PCR-増幅された重鎖可変領域は、前記配列において太字で示されている独自のB s s H I I部位（配列番号：15のヌクレオチド96～100）及びB s t E I I部位（配列番号：16のヌクレオチド106～112）へインフレームで挿入することができる。

30

【0170】

更にp V H Eは、前述のような第二のライブラリーのポリヌクレオチドの引き続きの選択のために、第一のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドを、プラスミドベクターへ伝達することが望ましいような態様において使用することができる。

【0171】

別のワクシニアウイルスp 7. 5プロモーターとの操作可能な結合を介して、免疫グロブリンκ軽鎖ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む本発明の好ましい伝達性プラスミドは、p V K Eであり、これは下記配列を含み：

GGCCAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGCGCGCCGCCCATGGGATGGAGCTGTAT
CATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGG**CGTGCACTTGACTCGAGATCAAACGAACTGTGG**
CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTG
TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACG
CCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG
AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGG
TCGAC

40

本明細書において配列番号：17と称される。PCR-増幅されたκ軽鎖可変領域は、前記配列において太字で示されている独自のA p a L I部位（配列番号：18のヌクレオチド95～100）及びX h o I部位（配列番号：19のヌクレオチド105～110）へインフレームで挿入することができる。

50

【0172】

更に p V K E は、前述のような第一のライブラリーのポリヌクレオチドの選択時に、プラスミドベクター内に第二のライブラリーのポリヌクレオチドを有することが望ましいような態様において使用することができる。

【0173】

別のワクシニアウイルス p 7. 5 プロモーターとの操作可能な結合を介して、免疫グロブリン入軽鎖ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む本発明の好ましい伝達性プラスミドは、p V L E であり、これは下記配列を含み：

```
GGCCAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGACGCGCGCCCATGGGATGGAGCTGTAT
CATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGCGTGCACCTTGACTCGAGAAGCTTACCGTCTAC
GAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGG
TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT
ACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGTTAGGTCGAC
```

10

これは本明細書において配列番号：20と称される。PCR-増幅されたλ軽鎖可変領域は、前記配列において太字で示されている独自のA p a L I 部位（配列番号：21のヌクレオチド95～100）及びH i n d I I I 部位（配列番号：22のヌクレオチド111～116）へインフレームで挿入することができる。

20

【0174】

更に、p V L E は、前述のような第一のライブラリーのポリヌクレオチドの選択時に、プラスミドベクター内の第二のライブラリーのポリヌクレオチドを有することが望ましいような態様において使用することができる。

【0175】

「挿入断片DNA」は、組換えウイルスベクター内で発現される1種又は複数の異種DNAセグメントを意味する。本発明に従い、「挿入断片DNA」は、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドである。DNAセグメントは、天然、非天然、合成、又はそれらの組合せであることができる。本発明の挿入断片DNAの作成法は、本明細書に明らかにされている。

30

【0176】

「伝達性プラスミド」は、前述のような5'側フランキング領域及び3'側フランキング領域の間に位置した挿入断片DNAを含むプラスミドベクターを意味する。この5'側フランキング領域は、第一のウイルス断片と相同性を共有し、かつ3'側フランキング領域は、第二のウイルス断片と相同性を共有している。好ましくは、伝達性プラスミドは、挿入断片DNAの上流に、適当なプロモーター、例えばウイルスベクターがボックスウイルスである場合には、強力な構成的ワクシニアプロモーターを含む。用語「ベクター」は、異種ポリヌクレオチドセグメントを含むポリヌクレオチド構築物を意味し、これはそのポリヌクレオチドセグメントの適当な宿主細胞への伝達に作用することが可能である。好ましくはこのベクターに含まれたポリヌクレオチドは、適当な宿主におけるポリヌクレオチドの発現に作用することが可能な適当な調節配列に操作可能に結合される。このような調節配列は、転写に作用するためのプロモーター、このような転写を制御するための任意のオペレーター配列、適当なmRNAリボソーム結合部位をコードしている配列、及び転写及び翻訳の終結を制御する配列を含む。本明細書において使用されるベクターは、プラスミド、ファージ粒子、ウイルス、mRNA、又は単純に可能性のあるゲノム挿入断片であることができる。一旦適当な宿主へ形質転換されたならば、このベクターは、宿主ゲノムとは独立して複製及び機能することができるか、もしくは場合によっては、それ自身のゲノムへ組込まれ得る。哺乳類細胞培養発現に関する典型的プラスミド発現ベクターは、例えば、p R K 5（欧州特許第307, 247号）、p S V 1 6 B（国際公開公報第91/08291号）及びp V L 1 3 9 2（Pharmingen社）を基にしている。

40

50

【0177】

しかし、本明細書において使用される「伝達性プラスミド」は、特定のプラスミド又はベクターに限定されるものではない。環状もしくは線状又は他の適当な形状のいずれかのDNAセグメントは、三分子組換え法における、第一及び第二のウイルスの「アーム」と一緒に、DNA挿入断片の宿主細胞への伝達のための運搬体として作用することができる。他の適当なベクターは、本明細書において説明されたもの又は当技術分野において公知の他のもののような、λファージ、mRNA、DNA断片等を含む。複数のプラスミドは、λについて本明細書において説明されたもののような、「初代ライブラリー」であることができる。

【0178】

三分子組換えの修飾 三分子組換えを使用し、約 10^7 pfuの桁の力価を伴うワクシニアウイルスにおいて、cDNAライブラリーを構築することができる。これらのcDNAライブラリー又は他のライブラリーの複雑性を制限するいくつかの要因がある。これらは以下を含む：プラスミドベクターにおいて構築され、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのライブラリーのような初代cDNAライブラリー又は他のライブラリーのサイズ、並びにウイルス「アーム」、好ましくはワクシニアウイルス「アーム」又は他のボックスウイルス「アーム」の大量精製（数百μg）の煩雑さ。バクテリオファージλもしくはそれら由来のDNA又はファージミドにおいて構築された免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのような、初代cDNAライブラリー又は他のライブラリーによる、ワクシニア又は他のウイルスDNA組換えが可能な三分子組換えの修飾、又はこれは修飾されたウイルスベクターによる感染後にインビボにおいて作成されるべき個別のウイルスDNAアームを可能にする三分子組換えの修飾は、これらの方法を用いて構築される真核ウイルスcDNAライブラリー又は他のライブラリーの品質及び力価を大きく向上すると考えられる。

【0179】

バクテリオファージλライブラリーからワクシニアウイルスへのcDNA挿入断片の伝達
λファージベクターは、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのような、cDNAライブラリー又は他のライブラリーの構築に関して、プラスミドベクターに勝るいくつかの利点を有している。プラスミドcDNA（又は他のDNA挿入断片）ライブラリー又は直鎖状DNAライブラリーは、細菌細胞へ、化学的／熱ショック形質転換によるか、又は電気穿孔により導入される。細菌細胞は、より小さいプラスミドにより優先的に形質転換され、ライブラリー中の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのような、比較的長いcDNA又は他の挿入断片DNAの提示を喪失する可能性をもたらす。加えて、形質転換は、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのような、cDNAライブラリー又は他のライブラリーを構築するために、高価な市販の調製されたコンピテント細菌の使用を必要とする、外来DNA又は他のDNAの細胞への導入に関してかなり非効率的なプロセスである。対照的に、λファージベクターは、いかなるサイズバイアスも伴わない12 kb又はそれ以上のcDNA挿入断片に忍容性があり得る。λベクターは、高効率の市販のパッケージング抽出物を用いて、インビトロにおいて、ビリオンへパッケージングされ、その結果この組換えλゲノムを、感染により、細菌の細胞へ導入することができる。これは、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのような、大きいcDNA又は他の挿入断片DNAの、プラスミドライブラリーで通常得られるものよりも高い力価及びより良い提示を伴う初代ライブラリーを生じる。

【0180】

免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのような、cDNA挿入断片又は他の挿入断片DNAの、λベクターにおいて構築されたライブラリーからワクシニアウイルスのような真核ウイルスベクターへの伝達を可能にするために、このλベクターは、ワクシニアウイルスDNAとの相同的組換えを可能にするワクシニアウイルスDNA配列を含むように修飾されなければならない。下記実施例は、ワクシニア

10

20

30

40

50

ウイルス相同配列を使用するが、他のウイルスも同様に使用することができる。例えば、プラスミド p7. 5 / A T G 0 / t k に含まれたワクシニアウイルス H i n d I I I J 断片（ワクシニア t k 遺伝子を含む）（下記実施例 5 に説明される）は、H i n d I I I 及び S n a B I を用いて切出し（ワクシニア D N A 配列 3 k b）、p T 7 B l u e 3（N o v a g e n カタログ番号 7 0 0 2 5 - 3）の H i n d I I I / S n a B I 部位へサブクロニングされ、p T 7 B 3. V t k を作出する。ワクシニア t k 遺伝子は、このベクターから、S a c I 及び S n a B I で切出され、かつ λ Z a p 発現（S t r a t a g e n e 社）の S a c I / S m a I 部位へ挿入され、λ. V t k を作出する。λ. V t k ベクターは、ワクシニア 7. 5 k プロモーターの下流への c D N A 挿入のための独自の N o t I、B a m H I、S m a I、及び S a l I 部位を含むと考えられる。この c D N A ライブラリーは、当技術分野において周知の方法を用い、λ. V t k において構築され得る。

【0181】

λ. V t k、又は相同的組換えを促進するフランキングワクシニア D N A 配列を伴う c D N A 挿入断片又は他の挿入 D N A を含むいずれか類似のバクテリオファージにおいて構築された、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのような、c D N A ライブラリー又は他のライブラリー由来の D N A は、c D N A 又は他の挿入 D N A 組換えワクシニアウイルスを作出するために使用することができる。ヘルパーファージによる同時感染によりプラスミドを λ ゲノムから切出す方法は、当技術分野において周知である（E x A s s i s t ファージ、S t r a t a g e n e 社カタログ番号 2 1 1 2 0 3）。λ ベースのライブラリーからの大量切出しは、同等の c D N A ライブラリー又はプラスミドベクター中の他のライブラリーを作成する。例えば λ. V t k c D N A ライブラリーから切出されたプラスミドは、c D N A 挿入断片又は他の挿入 D N A、例えば免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドにフランキングしているワクシニア t k 配列を含むと考えられる。次にこのプラスミド D N A は、三分子組換えによりワクシニア組換え体を構築するために使用することができる。別の本方法の態様は、λ D N A を最初の λ. V t k ライブラリーから直接精製し、かつ三分子組換えのためにこの組換えウイルスの（λ）D N A 又はそれらの断片を、2 個の大きいワクシニアウイルス D N A 断片によりトランスフェクションすることである。

【0182】

インビボにおけるワクシニアアームの作成 ワクシニア D N A 又は他のウイルス D N A 「アーム」もしくは断片の精製及びトランスフェクションは、三分子組換えによるポリヌクレオチドライブラリー構築の制限要因である。インビボにおけるウイルスアーム、特にワクシニアウイルスアームの必要な作成を可能にするためにこの方法を修飾することは、より効率的な真核ウイルスにおけるライブラリーの構築をもたらすと考えられる。

【0183】

宿主細胞は、ウイルスベクターゲノムに導入された独自の部位を認識する制限エンドヌクレアーゼを発現するように修飾することができる。例えば、ワクシニアウイルスがこれらの宿主細胞へ感染する場合、制限エンドヌクレアーゼは、ワクシニア D N A を消化し、三分子組換えにより修復のみ、すなわち再接合される「アーム」を作成する。制限エンドヌクレアーゼの例は、細菌酵素 N o t I 及び A p a I、酵母エンドヌクレアーゼ V D E（R. H i r a t a、Y. O h s u m i、A. N a k a n o、H. K a w a s a k i、K. S u z u k i、Y. A n r a k u、J. B i o l o g i c a l C h e m i s t r y、2 6 5：6 7 2 6 - 6 7 3 3（1 9 9 0））、クラミドモナス・ユーガメトス（C h l a m y d o m o n a s e u g a m e t o s）エンドヌクレアーゼ I - C e u I 及び他の当技術分野において周知のものを含む。例えば、t k 遺伝子内に独自の N o t I 及び A p a I 部位を含むワクシニア株が、既に構築されており、かつ t k 遺伝子内に独自の V D E 及び／又は I - C e u I 部位を含む株は、当技術分野において公知の方法により容易に構築することができる。

【0184】

制限エンドヌクレアーゼの構成的発現は、その酵素による染色体 D N A の断片化に起因し

ているので、細胞にとっては致死的であると考えられる。この厄介な問題を避けるために、ひとつの態様において、宿主細胞は、誘導可能なプロモーターの制御下で、制限エンドヌクレアーゼ（複数）の遺伝子（複数）を発現するように修飾される。

【0185】

誘導可能な発現に関する好ましい方法は、Tet-On遺伝子発現システム（Clontech社）を使用する。このシステムにおいて、エンドヌクレアーゼをコードしている遺伝子の発現は、インデューサー（テトラサイクリン）の非存在下では、サイレントである。これは、毒性遺伝子、すなわちエンドヌクレアーゼを発現するために誘導され得る安定してトランスフェクションされた細胞株の単離を可能にする（Gossen, M. ら、*Science*、268:1766-1769（1995））。テトラサイクリン誘導体デオキシサイクリンの添加は、エンドヌクレアーゼの発現を誘導する。好ましい態様において、BSC1宿主細胞は、NotI遺伝子の発現を制御するTet-Onベクターにより安定してトランスフェクションされると考えられる。これらの細胞の集密な単層は、ドキソサイクリンにより誘導され、その後v7.5/tk（tk遺伝子内の独自のNotI部位）で感染され、かつcDNA又は挿入DNA組換え伝達性プラスミド又は伝達DNA又は入ファージ又はファージミドDNAによりトランスフェクションされると考えられる。例えば、宿主細胞においてコードされたNotIエンドヌクレアーゼによるtk遺伝子又は他の配列内での独自のNotI部位での曝露されたワクシニアDNAの消化は、伝達性プラスミド又はファージDNAによる三分子組換えを受けることによってのみ、完全長ウイルスのDNAを生じることができる2種の大きいワクシニアDNA断片を作出する。宿主細胞染色体DNAのNotIによる消化は、宿主細胞はウイルス複製及びビリオン集成時には増殖を必要としないので、修飾された感染性ウイルスの産生を妨害することは予想されない。

【0186】

インビボにおいてワクシニアアームのようなウイルスアームを作成するこの方法の別の態様において、修飾されたワクシニア株は、tk遺伝子又は他の必須でない遺伝子内に独自のエンドヌクレアーゼ部位を含み、更にはワクシニアゲノムの別の必須でない部位にT7バクテリオファージプロモーターの制御下でエンドヌクレアーゼをコードしている異種ポリヌクレオチドを含むように構築される。T7 RNAポリメラーゼを発現している細胞の感染は、エンドヌクレアーゼの発現を生じ、次にワクシニアDNAのこの酵素による消化を生じる。好ましい態様において、ワクシニアのv7.5/tk株は、T7プロモーターにより制御される発現により、NotIをコードしているcDNAを含むカセットのHindIII C又はF領域への挿入により修飾され（Coupar, E. H. B. ら、*Gene*、68:1-10（1988）；Flexner, C. ら、*Nature*、330:259-262（1987））、v7.5/tk/T7NotIを作成する。細胞株は、説明されたように哺乳類プロモーターの制御下で、T7 RNAポリメラーゼをコードしているcDNAにより安定してトランスフェクションされる（O. Elroy-Stein, B. Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、87:6743-6747（1990））。このパッケージング細胞株のv7.5/tk/T7NotIによる感染は、NotIのT7 RNAポリメラーゼ依存型発現を生じ、その後ワクシニアDNAのアームへの消化を生じる。感染性の完全長ウイルスDNAは、伝達性プラスミド又はファージDNAにより三分子組換えの後、消化されたワクシニアDNAアームから再構築及びパッケージングのみすることができる。この方法の更に別の態様において、T7 RNAポリメラーゼは、鶏痘ウイルスのような、T7 RNAポリメラーゼ組換えヘルパーウイルスによる同時感染により提供され得る（P. Britton, P. Green, S. Kottier, K. L. Mawditt, Z. Penzes, D. Cavanagh, M. A. Skinner, J. General Virology、77:963-967（1996））。

【0187】

インビボにおいて大きいウイルスDNA断片、好ましくはワクシニアDNA断片を作成す

るためにこれらの様々な戦略を使用する三分子組換え特有の特徴は、ワクシニアDNAの消化は、組換えに先行することができるが、必ずしも必要ではないことである。これは、単に組換えウイルスが消化による破壊から逃れることで事足りる。これはワクシニアDNA断片は、組換え前に作成される必要がある、インビトロにおいて消化されたワクシニアDNAのトランスフェクションを使用する三分子組換えとは対照的である。消化前の二分子組換えの機会、消化後の三分子組換えにより得られるものよりも、より大きい頻度で組換えを生じることは可能である。

【0188】

ウイルスベクター、特にポックスウイルスを使用する、組換え免疫グロブリン分子の単離のための選択及びスクリーニング戦略 ある本発明の態様において、三分子組換え法は、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドを発現するポリヌクレオチドのライブラリーの作成において使用される。この態様において、完全長免疫グロブリンサブユニットポリペプチド、又はそれらの断片を含むライブラリーは、免疫グロブリン定常領域及びシグナルペプチドをコードしているカセットの、ワクシニアウイルスに相同な5'及び3'領域を含む伝達性プラスミドへの最初の挿入により調製される。再構成された免疫グロブリン可変領域は、免疫感作した動物由来のB細胞又は形質細胞からの、免疫感作されていない動物由来のプレーB細胞からのPCRにより単離される。これらのPCR断片は、免疫グロブリンシグナルペプチド及び定常領域の間、及びこれらとインフレイムでクローニングされ、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドのコード領域を作成する。これらの伝達性プラスミドは、ポックスウイルス「アーム」を伴う宿主細胞へ導入され、かつ三分子組換え法を用いて、ライブラリーが作成される。

【0189】

本発明は、望ましい特異性を伴う免疫グロブリン分子を同定する、すなわち選択又はスクリーニングする様々な方法を提供し、ここで免疫グロブリン分子は真核細胞においてインビトロで作成される。これらは、抗原誘導型細胞死及び抗原誘導型シグナル伝達のような宿主細胞作用の選択、抗原特異的結合に関する宿主細胞プールのスクリーニング、並びに望ましい抗原特異性又は望ましい機能特性を伴う可溶性免疫グロブリン分子の存在に関する宿主細胞プールが増殖される培地のスクリーニングを含む。

【0190】

本明細書に詳細に開示されたように、抗原誘導型細胞死、抗原誘導型シグナル伝達、抗原特異的結合、又は他の抗原特異的機能のいずれかを基にした、真核細胞において発現された免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を同定する方法が、提供される。本発明の選択及びスクリーニング技術は、齧歯類における抗体の選択によりもたらされるバイアス又は細菌における合成及び集成の制限を排除する。

【0191】

本明細書に説明された多くの同定法は、宿主細胞遺伝子の発現又は宿主細胞転写調節領域によって左右され、これは、直接的又は間接的に細胞死を誘導するか、もしくは宿主細胞表面上に発現された免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片へ結合している抗原に反応して検出可能なシグナルを発生する。本発明の最も好ましい態様は、宿主細胞が、真核ウイルスベクター、好ましくはポックスウイルスベクター、及び更により好ましくはワクシニアウイルスベクターにより感染されることを必要とすることに注意することは重要である。一部の細胞株において、更にウイルスの遺伝子発現の非存在下においても、一部の宿主細胞タンパク質合成が、ポックスウイルス感染時に迅速にシャットダウンされることは、当業者には良く理解されることである。これは、抗原誘導型細胞死又は細胞シグナル伝達を誘導するために、宿主細胞遺伝子又は宿主細胞転写調節領域のアップレギュレーションが必要ならば、問題となる。しかしこの問題点は、ある細胞株において、宿主タンパク質合成の阻害は、ウイルスDNA複製以降までは不完全であり続けるので、解決困難ではない。Moss, B., 「ポックスウイルス及びそれらの複製」「ウイルス学」、第2版、B. N. Fields, D. M. Knipeら編集、Raven Press社、2096頁(1990)参照のこと。しかし、真核ウイルスベクター、好ましくはポ

ックスウイルスベクター、及び更により好ましくはワクシニアウイルスベクターによる感染の際に、表面－発現された免疫グロブリン分子の架橋時にアップレギュレーションされる遺伝子産物を発現する能力に関して、様々な宿主細胞を迅速にスクリーニングすること；並びに、様々な変異体及び弱毒化されたウイルスによるウイルス感染時の細胞遺伝子の示差的発現について望ましい宿主細胞をスクリーニングすることは必要である。

【0192】

従って、順序付けられたcDNAライブラリーのマイクロアレイにおける特定の宿主細胞の発現プロファイリングを介して、ウイルスベクターによる感染時に、宿主細胞遺伝子の発現及び／又は抗原誘導型細胞死もしくは細胞シグナル伝達に作用する宿主細胞転写調節領域の操作性について様々な宿主細胞をスクリーニングする方法が提供される。マイクロアレイにおける発現プロファイリングは、Duggan, D. J. らの論文(Nature Genet.、21(1 Suppl):10-14(1999))に記されており、これはその全体が本明細書に参照として組入れられている。

【0193】

この方法に従い、発現プロファイリングを使用し、未感染宿主細胞と真核ウイルス発現ベクター、好ましくはポックスウイルスベクター、更により好ましくはワクシニアウイルスベクターにより感染した宿主細胞における宿主細胞遺伝子発現パターンを比較するが、ここで具体的真核ウイルスベクターは、本発明のポリヌクレオチドの該第一及び該第二のライブラリーを構築するために使用されるベクターである。この方法において、それらの表面上に免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現することが可能な適当な宿主細胞、及び更に所定のウイルスによる感染時に必要な誘導性タンパク質の発現を受け続ける宿主細胞を、同定することができる。

【0194】

同じく発現プロファイリングを使用し、所定の宿主細胞における宿主細胞遺伝子発現パターンが比較され、例えば、宿主細胞が完全な感染性ウイルスベクターにより感染される場合、及び宿主細胞が対応する弱毒化されたウイルスベクターにより感染される場合の発現パターンが比較される。マイクロアレイにおける発現プロファイリングは、様々な弱毒化されたウイルスにより感染した宿主細胞における大規模スクリーニングを可能にし、ここで弱毒化は、様々な異なる方法で達成される。例えばある弱毒化は、遺伝的変異により達成される。多くのワクシニアウイルス変異体が特徴付けられている。これらは、完全な欠損変異体であり、すなわち感染性ウイルス粒子の産生にはヘルパーウイルスを必要とするか、もしくはこれらは条件変異体、例えば温度感受性変異体である。ウイルス感染した宿主細胞は、宿主遺伝子発現が必要な期間にわたり、非許容環境、例えば非許容温度において維持され、その後許容環境、例えば、許容温度にシフトされ、ウイルス粒子の産生を可能にし得る点で、条件変異体が特に好ましい。あるいは、完全な感染性ウイルスは、感染サイクルの所定の時点で、ウイルス複製を可逆的にブロックする化学的インヒビターにより「弱毒化」される。化学的インヒビターは、ヒドロキシ尿素及び5-フルオロデオキシウリジンを含むが、これらに限定されるものではない。ウイルス感染した宿主細胞は、宿主遺伝子発現が必要となる期間、化学的インヒビター中で維持され、その後化学的インヒビターが除去され、ウイルス粒子が産生される。

【0195】

この方法を用い、マイクロアレイにおける発現プロファイリングを使用し、本明細書に説明された選択法のいずれかにおいて適当な宿主細胞、適当な転写調節領域、及び／又は適当な弱毒化されたウイルスを同定することができる。

【0196】

ある態様において、直接抗原誘導型アポトーシスを基に、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片をコードしているポリヌクレオチドを選択する選択法が提供される。この方法に従い、初期B細胞性リンパ腫である、感染及び／又は転写のための宿主細胞が選択される。適当な初期B細胞性リンパ腫細胞株は、CH33細胞、CH31細胞(Pennell, C.A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82:3

10

20

30

40

50

799-3803 (1985))、又はWEHI-231細胞(Boyd, A. W. 及びSchradler, J. W.、J. Immunol.、126:2466-2469 (1981))を含むが、これらに限定されるものではない。初期B細胞性リンパ腫細胞株は、自然発生的増殖阻害の誘導及びアポトーシス性細胞死により、抗原特異的免疫グロブリンの架橋に反応する(Pennell, C. A. 及びScott, D. W.、Eur. J. Immunol.、16:1577-1581 (1986); Tisch, R. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:69114-69118 (1988); Ales-Martinez, J. E. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:69119-6923 (1988); Warner, G. L. 及びScott, D. W.、Cell. Immunol.、115:195-203 (1988))。前述の第一及び第二のポリヌクレオチドライブラリーによる感染及び／又はトランスフェクション後、抗体分子の合成及び集成を、約5時間～約48時間、好ましくは約6時間、約10時間、約12時間、約16時間、約20時間、約24時間、約30時間、約36時間、約40時間、又は約48時間、更により好ましくは約12時間又は約24時間の時間範囲で進行することができ；この時点で、宿主細胞は、特異的免疫グロブリン受容体（すなわち、膜結合した免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片）と架橋し、かつ増殖阻害及びアポトーシス性細胞死の誘導により抗原特異的免疫グロブリンの架橋に直接反応するこれらの免疫グロブリンを発現している宿主細胞においてアポトーシスを誘導するために、特異的抗原と接触される。そこに含まれる免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む、アポトーシスを受けている宿主細胞又はそれらの成分は回収され、これにより、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部として関心のある抗原に特異的に結合する、第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている第一のライブラリーのポリヌクレオチドが濃縮される。

【0197】

第一のライブラリーのポリヌクレオチドを更に選択及び濃縮する段階、並びにこれらのポリヌクレオチドを単離する段階時に、同様のプロセスが実施され、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部として、所望の特異的抗原に結合する第二のライブラリーのポリヌクレオチドが回収される。

【0198】

この方法の実施例は、図1に示している。ナイーブドナー又は免疫感作ドナーのいずれかの抗体産生細胞由来の多様な重鎖をコードしているポリヌクレオチドの「第一のライブラリー」は、ボックスウイルスベクター、好ましくはワクシニアウイルスベクターにおいて構築され、並びに免疫グロブリン軽鎖をコードしているポリヌクレオチドの同様に多様な「第二のライブラリー」は、このポリヌクレオチドの発現が、ワクシニアプロモーター、好ましくは合成初期／後期プロモーター、例えばp11プロモーター又はp7.5プロモーターにより調節されるようなプラスミドベクターにおいて構築される。好ましくはこの態様に関して、ボックスウイルス構築物によりコードされた免疫グロブリン重鎖定常領域は、表面膜上に免疫グロブリン受容体の発現を生じる膜貫通領域を保持するようにデザインされる。真核細胞、好ましくは初期B細胞性リンパ腫細胞は、ボックスウイルス重鎖ライブラリーにより感染多重度約1(MOI=1)で感染される。2時間後、感染した細胞は、軽鎖プラスミドライブラリーにより、各細胞において平均10種又はそれ以上の個別の軽鎖組換えプラスミドが生じかつ発現されることを可能にする条件下でトランスフェクションされる。このプラスミドにおける組換え遺伝子の発現は、ワクシニアウイルスプロモーターにより調節されるので、高レベルの組換え遺伝子産物は、核組込みを必要とせず、ワクシニアウイルス感染細胞の細胞質において発現される。加えて、ワクシニアウイルス感染細胞の細胞質における環状DNAの増幅のための配列とは無関係の機構は、更により高濃度のトランスフェクションされた軽鎖組換えプラスミドさえ生じる(Merchinsky, M. 及びMoss, B.、Cancer Cells、6:87-93 (1988))。これらふたつの要因は、過剰な軽鎖合成を生じる高レベルの発現に寄与

している。

【0199】

別の好ましい態様では、ボックスウイルスベクター、好ましくはワクシニアウイルスベクターにおいて構築される、ナイーブドナー又は免疫感作ドナーのいずれかの抗体産生細胞由来の多様な重鎖をコードしているポリヌクレオチドの「第一のライブラリー」をコードしているポリヌクレオチドの発現を調節するために、T7 RNAポリメラーゼが発現された細胞において活性があるT7ファージプロモーターを利用し、並びに免疫グロブリン軽鎖をコードしているポリヌクレオチド同様に多様な「第二のライブラリー」は、プラスミドベクターにおいて構築される (Eckert D. 及び Merchlinsky M.、J. Gen. Virol.、80 (Pt 6) : 1463-9 (1999) ; Elroy-Stein O.、Fuerst T. R. 及び Moss B.、Proc Natl Acad Sci USA、86 (16) : 6126-30 (1989) ; Fuerst T. R.、Earl P. L. 及び Moss B.、Mol Cell Biol.、7 (7) : 2538-44 (1987) ; Elroy-Stein O. 及び Moss B.、Proc Natl Acad Sci USA、87 (17) : 6743-7 (1990) ; Cottet S. 及び Cortes B.、Eur. J. Biochem.、246 (1) : 23-31)。

【0200】

当業者には容易に理解されるように、使用されるウイルスベクター、具体的宿主細胞、及び感染多重度に応じて、ボックスウイルス由来の発現ベクターは、約1～10日、より一般的には約2～8日、2～6日、又は2～4日の時間枠においてそれ自身細胞変性性であるので、速度論の考察は、本実験のデザインにおいて非常に重要である。好ましい態様において、表面免疫グロブリン架橋に対するアポトーシス反応が、その細胞におけるボックスウイルス感染の自然の細胞変性効果 (CPE) と比べ迅速であるB細胞性リンパ腫が選択される。従って、CPEの誘導に先立つように、宿主細胞表面上の免疫グロブリン分子の抗原誘導型架橋に反応するアポトーシスが、宿主細胞の抗原との接触後約1時間～約4日の期間内に生じることが好ましい。より好ましくは、アポトーシスは、宿主細胞の抗原との接触後、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約14時間、約16時間、約18時間、約20時間、約22時間、約24時間、約28時間、約32時間、約36時間、約40時間、約44時間、又は約48時間以内に生じる。更により好ましくは、アポトーシスは、宿主細胞の抗原との接触の約12時間以内に生じる。あるいは、細胞変性効果の誘導の非常に遅い速度論を持つ弱毒化されたボックスウイルスベクターが利用される。弱毒化されたボックスウイルスベクターは、本明細書において明らかにされている。

【0201】

本方法に従い、抗原特異的免疫グロブリンをその表面に発現している宿主細胞が、アポトーシスを受ける際に選択される。例えば、宿主細胞が固形基質に付着されている場合、アポトーシスを受けているこれらの細胞は、基質から放出され、かつ宿主細胞が培養されている液体培地の収集により回収される。あるいは、宿主細胞は、固形基質に付着され、かつこれらのアポトーシスを受けている細胞は、溶解事象 (lytic event) を受け、これによりそれらの細胞質内容物を宿主細胞が培養されている液体培地に放出する。これらの細胞から放出されたウイルス粒子は、その後液体培地において収集される。

【0202】

免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、溶解、接着不能、生存力喪失、膜完全性喪失、構造安定性喪失、細胞骨格要素の破壊、膜電位維持の不能、細胞周期停止、エネルギー産生不能などを含む、いずれかの機序により「非接着性」又は「生存不可能」となる。従って、標的ポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、吸引、洗浄、濾過、遠心分離、細胞選別、蛍光標示式細胞分取器 (FACS) などの物理的手段により、回収、すなわち、残余の細胞から分離することができる。

【0203】

例えば、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、溶解し、これにより組換えウイルス粒子、好ましくはポックスウイルス粒子、更により好ましくはワクシニアウイルス粒子を、培養培地へと放出することができるか、もしくは非接着性となり、その結果固形支持体から取除くことができる。従って好ましい態様において、放出された組換えウイルス及び／又は非接着性細胞は、吸引又は洗浄により、接着細胞から分離される。

【0204】

宿主細胞が初期B細胞性リンパ腫細胞株である場合、これらの細胞は、基質に結合されているB細胞特異的抗体との相互作用を介して、固形基質に接着され得る。適当なB細胞特異的抗体は、抗CD19抗体及び抗CD20抗体を含むが、これらに限定されるものではない。

10

【0205】

別の好ましい態様において、抗原誘導型細胞死は、その発現が間接的に細胞死を生じる外来ポリヌクレオチドが表面免疫グロブリン分子の架橋時に誘導される転写調節領域に操作可能に結合されているような構築物によりトランスフェクションされた宿主細胞を使用することにより、直接的又は間接的に影響を受ける。

【0206】

「表面免疫グロブリン分子の架橋時に誘導される転写調節領域」とは、表面に発現された免疫グロブリン分子の架橋時に宿主細胞においてアップレギュレーションされるような遺伝子を通常調節する領域、例えば宿主細胞プロモーターを意味する。このような転写調節領域の好ましい例は、BAXプロモーターであり、これは初期B細胞性リンパ腫細胞において、表面免疫グロブリン分子の架橋時にアップレギュレーションされる。

20

【0207】

ある態様において、図2A及び図2Bに示されたように、細胞傷害性T細胞(CTL)エピトープをコードしている外来ポリヌクレオチドの発現時に細胞死を誘導する方法が提供される。CTLエピトープをコードしている外来ポリヌクレオチドは、表面免疫グロブリン分子の架橋時に誘導される転写調節領域と操作可能に結合するように配置される。宿主細胞の表面の免疫グロブリン分子の抗原誘導型架橋時に、CTLエピトープは、指定されたMHC分子に関連し宿主細胞表面に発現され、更に宿主細胞表面にも発現される。これらの細胞は、指定されたMHC分子に関連しCTLエピトープを認識するエピトープ特異的CTLと接触され、かつCTLエピトープを発現している細胞は、迅速に溶解事象を受ける。特異的CTLエピトープを発現している宿主細胞の選択及び回収の方法は、更に、ZaudererのPCT公開国際公開公報第00/028016号に開示されている。

30

【0208】

宿主細胞の選択は、細胞死に屈服する及び／又は溶解事象を受けるこれらの細胞又はそれらの内容物の回収により実現される。例えば、固相支持体へ付着された増殖する宿主細胞が選択される場合、これらの宿主細胞で細胞死に屈服する及び／又は溶解事象を受けたものは、支持体から放出され、かつ細胞上清において回収することができる。あるいは、細胞死に屈服する及び／又は溶解事象を受けた宿主細胞から放出されたウイルス粒子は、細胞上清から回収することができる。

40

【0209】

この態様に従い、宿主細胞の表面に発現されたMHC分子は、クラスI MHC分子又はクラスII MHC分子のいずれかである。特に好ましい態様において、宿主細胞上に発現されたMHC分子は、H-2K^d分子であり、及び抗原誘導型架橋時に発現されるCTLエピトープは、ペプチドGYKAGMIHIであり、本明細書において配列番号：23と称される。

【0210】

この方法の利用において、その表面に免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を発現することが可能であるいずれかの宿主細胞を使用することができる。適当な宿主細胞は、免疫グロブリン陰性形質細胞腫細胞株である。このような細胞株の例は、NS1細

50

胞株、S p 2 / 0 細胞株、及び P 3 細胞株を含むが、これらに限定されるものではない。他の適当な細胞株は、当業者に明らかであると思われる。

【0211】

別の好ましい態様において、同じく図 2 A 及び図 2 B において図示されたように、「自殺」遺伝子を含む異種ポリヌクレオチドが表面免疫グロブリン分子の架橋時に誘導される転写調節領域と操作可能に結合されている構築物でトランスフェクションされた宿主細胞を使用することにより、細胞死が間接的に誘導される方法が提供される。「自殺遺伝子」は、発現された場合に細胞死を引き起す核酸分子を意味する。自殺遺伝子として有用なポリヌクレオチドは、当技術分野において公知の多くの細胞死一誘導配列を含む。好ましい自殺遺伝子は、シュードモナス外毒素 A 鎖、ジフテリア A 鎖、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、モデシン A 鎖、及び α -サルシンのような毒物をコードしているものである。好ましい自殺遺伝子は、ジフテリア A 毒素サブユニットをコードしている。宿主細胞の表面の免疫グロブリン分子の抗原が誘導した架橋時に、アポトーシス誘導遺伝子のプロモーターが誘導され、これにより自殺遺伝子の発現が可能になり、かつこれにより細胞死が促進される。

10

【0212】

この方法を利用し、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の発現が可能であり、及び転写調節領域が表面免疫グロブリン分子の架橋時に誘導される発現プロファイリングにより同定されるようなあらゆる宿主細胞を使用することができる。適当な宿主細胞は、初期 B 細胞性リンパ腫細胞株及び免疫グロブリン一陰性形質細胞腫細胞株を含む。このような細胞株の例は、CH 3 3 細胞株、CH 3 1 細胞株、WEHI-231 細胞株、NS 1 細胞株、S p 2 / 0 細胞株、及び P 3 細胞株を含むが、これらに限定されるものではない。他の適当な細胞株は、当業者には明らかであると思われる。

20

【0213】

宿主細胞が Ig-陰性形質細胞腫細胞株である場合、これらの細胞は、固形基質へ、基質に結合されている形質細胞腫一特異的抗体との相互作用を介して付着することができる。適当な形質細胞腫一特異的抗体は、抗 CD 3 8 抗体 (Y i, Q. ら、Blood、90 : 1960-1967 (1997))、抗 CD 3 1 抗体 (Medina, F. ら、Cytometry、39 : 231-234 (2000))、抗 CD 2 0 抗体 (Haghighi, B. ら、Am. J. Hematol.、59 : 302-308 (1998))、及び抗 CD 1 0 抗体 (Dunphy, C. H.、Acta. Cytol.、40 : 358-362 (1996)) を含むが、これらに限定されるものではない。

30

【0214】

本明細書に記されたような直接及び間接の抗原誘導型細胞死の方法も組合せることができる。例えば、宿主細胞が初期 B 細胞性リンパ腫であり並びに抗原架橋が直接アポトーシスを誘導するようなこれらの態様において、抗原誘導型細胞死は、初期 B 細胞性リンパ腫宿主細胞の、外来細胞傷害性 T 細胞エピトープをコードしているポリヌクレオチドが表面免疫グロブリン分子の架橋時に誘導される転写調節領域に操作可能に結合されている構築物によるトランスフェクションにより加速され得る。説明したような抗原架橋した細胞の特異的細胞傷害性 T 細胞との接触時に、細胞死が加速される。同様に、宿主細胞が初期 B 細胞性リンパ腫であり並びに抗原架橋が先に説明したように直接アポトーシスに影響を及ぼすような態様において、抗原誘導型細胞死は、初期 B 細胞性リンパ腫宿主細胞の、自殺遺伝子が表面免疫グロブリン分子の架橋時に誘導される転写調節領域と操作可能に結合されている構築物によるトランスフェクションにより加速され得る。

40

【0215】

免疫グロブリン重鎖は、特異的抗原が、受容体の特異的抗原により架橋されている細胞において容易に検出可能なシグナルを誘導するように修飾することができる。好ましい態様は、抗原特異的受容体の発現の結果としての細胞殺傷について選択するための、アポトーシス誘導システムの使用である。アポトーシス誘導システムの例には、ヒト FAS (CD 9 5、APO-1) 受容体が関与しており、これは、タンパク質分解性カスパーゼのカスケードを活性化する細胞死一誘導シグナル伝達複合体のリクルート及び集成を介して、ア

50

ポトーシスを調節することにおけるその役割について認められている腫瘍壊死因子－神経成長因子受容体スーパーファミリーの一員である。FAS－ベースの誘導可能な細胞死システムを説明するいくつかの報告があり、アポトーシスは、様々な細胞モジュレーターを介してのアポトーシスの誘導を可能にするために、様々な受容体に結合されたFASの細胞質「デスドメイン」を含むキメラタンパク質により誘導される。Ishiwatari-Hayasakaらは、マウスのCD44細胞外ドメインをヒトFASと共に使用し、多価抗CD44抗体との架橋時にアポトーシスを誘導することに成功している（Ishiwatari-Hayasaka H. ら、J. Immunol.、163:1258-64（1999））。加えてTakahashiらは、キメラヒトG-CSFR/FAS（細胞外／細胞質）タンパク質が、抗G-CSFR抗体との架橋時にアポトーシスを誘導することが可能であることを明らかにしている（Takahashi T. ら、J. Biol. Chem.、271:17555-60（1996））。これらの執筆者らは、このキメラタンパク質が、二量体としては、アポトーシス誘導が不可能であることも明らかにしている。これらの複合体は、少なくとも三量体型でなければならない。

【0216】

好ましい態様において、FASの膜貫通ドメイン及び細胞質デスドメインが、ヒトIgM重鎖のCH1ドメインのカルボキシル末端に融合されているキメラ遺伝子が構築される（CH1-Fas、図13（a））。多様なVH遺伝子が、本明細書に説明されたようなこの構築物に挿入され、VH-CH1-Fas組換えワクシニアウイルスのライブラリーを作成している。VH-CH1-Fasを伴う膜受容体は、VH-CH1-Fas構築物で感染され並びに多様な免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAによりトランスフェクションされた又はソラレン処理された多様な免疫グロブリン軽鎖をコードしている組換えワクシニアウイルスで感染された宿主細胞において集成されている。所望の特異性を持つ重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の組合せを発現しているこれらの細胞は、関心のある特異的に固定された抗原の存在下で架橋されたそれらの膜受容体のいくつかを有すると考えられる。VHCH1/FASオリゴマーの操作可能な複合体形成の結果、アポトーシスが誘導されるであろう。三量体形成は、多価抗原との架橋を介して、又は組織培養プレートもしくはビーズへの1種より多い抗原の固定を介して、引き起こすことができる。

【0217】

別の態様において、VHライブラリーは、FASの膜貫通ドメイン及び細胞質デスドメインを含むポリペプチドが、IgM重鎖CH4ドメインのカルボキシル末端に融合されている融合タンパク質において発現される（図13（b））。更に別の態様においては、FASの細胞質デスドメインは、CH4ドメインの後のIgM重鎖膜貫通ドメインのカルボキシル末端に融合されている（図13（c））。

【0218】

後のふたつの態様（図13（b及びc））は、アポトーシスシグナルの誘導に必要な三量体複合体の形成を促進し、これにより選択された抗原特異的受容体の数を増大するような既に二量体であるFasデスドメインの合成を生じる。しかし単量体構築物（図13（a））の使用は、より少ないがより高親和性の抗原受容体の選択をもたらし、更に抗原非特異的細胞死のバックグラウンドを低下する。二量体Fasドメインを伴うこれら2種の受容体は、この融合タンパク質においてコードされた膜貫通領域がFas由来か又はIgM由来であるかという点が異なる。IgM由来の膜貫通領域は、Bリンパ球系細胞の膜受容体発現により効率的に機能することができる。しかしこの態様の利点は、B細胞に限定されるものではない。特に、単量体Fas構築物は、上皮細胞株、HeLa細胞及びBSC-1細胞を含む、ワクシニアウイルスの高力価を生じることができる広範な細胞型において膜受容体として合成されかつ発現される。

【0219】

別の態様において、抗原誘導型細胞シグナル伝達を基にした、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片をコードしているポリヌクレオチドの回収をスクリーニングする方法が提供される。この方法に従い、宿主細胞は、表面免疫グロブリン架橋の結果としてア

ップレギュレーションされる転写調節領域に操作可能に結合された、例えばルシフェラーゼのような、容易に検出されるレポーターの構築物によりトランスフェクションされる。それらの表面に免疫グロブリン又はそれらの断片を発現している宿主細胞のプールは、抗原と接触され、かつ架橋時に、そのシグナルはそのプール内で検出される。前述の免疫グロブリン同定法の第一の段階を参照し、そのシグナル伝達法を以下のように行うことができる。免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの第一のライブラリーは、複数のプール、例えば約2、5、10、25、15、75、100又はそれ以上のプールに分割され、各プールは約10、100、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、又は 10^9 個の異なる可変領域を伴う免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている異なるポリヌクレオチドを含む。好ましいプールは、最初に、各々約 10^3 個のポリヌクレオチドを含んでいる。各プールは拡張され、かつ複製アリコートが後の回収のために取り分けられる。ポリヌクレオチドのプールがウイルスベクター、好ましくはポックスウイルスベクター、更により好ましくはワクシニアウイルスベクターにおいて構築された場合、これらのプールは、例えばウイルスライブラリーの高力価ストックの希釈により、及び低MOI、例えば $MOI < 0.1$ での組織培養細胞のマイクロ培養物の感染のためのその一部の使用により調製される。典型的には、ウイルスの力価の1,000倍より大きい拡張が、感染の48時間後に得られる。複数の個々のプールにおけるウイルスの力価の拡張は、組換え体のサブセットが、競合するサブセットの比較的迅速な増殖により喪失されるリスクを軽減する。

10

20

【0220】

その後これらのウイルスプールを使用し、調製されたウイルスプールと同数の宿主細胞プールを感染する。これらの宿主細胞は、表面免疫グロブリン架橋の結果として、レポーター分子を発現するように操作される。各プールにより感染された宿主細胞の数は、そのプールに含まれるポリヌクレオチドの数、及び望ましいMOIによって決まる。ポリヌクレオチドの第二のライブラリーも、宿主細胞プールに導入され、かつ宿主細胞表面上の免疫グロブリン分子又はそれらの断片の発現が許容される。

【0221】

その後、その表面に抗原特異的免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞が、該免疫グロブリン分子の架橋時に検出可能なレポーター分子を発現する条件下で、宿主細胞プールは所望の抗原と接触され、かつ様々な宿主細胞プールが、レポーター分子の発現についてスクリーニングされる。レポーター発現が検出されるこれらの宿主細胞プールは収集され、かつそこに含まれる第一のライブラリーのポリヌクレオチドが、ポリヌクレオチドのそのプールの最初の拡張後、先に蓄えられたアリコートから回収される。

30

【0222】

抗原特異的免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている第一のライブラリーのポリヌクレオチドを更に濃縮するために、先に回収されたポリヌクレオチドが、複数のサブプールへ分割される。これらのサブプールは、先に使用されたプールよりも少ない異なるメンバーを含むように設定される。例えば、第一のプールの各々が 10^3 個のポリヌクレオチドを含む場合、サブプールは、平均約10又は100個の異なるポリヌクレオチドを各々含むように設定される。これらのサブプールは、前述のように第二のライブラリーと共に宿主細胞に導入され、かつ宿主細胞の膜表面上での免疫グロブリン分子又はそれらの断片の発現が許容される。その後宿主細胞は、前述のように抗原と接触され、かつレポーター分子の発現が検出される宿主細胞のサブプールが同定され、かつそこに含まれる第一のライブラリーのポリヌクレオチドが、前述のような先に取り分けられた複製プールから回収される。当業者には、このプロセスは、抗原特異的免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを適切に濃縮するために、1回又は複数回追加して繰り返すことができることは理解されると思われる。

40

【0223】

第一のライブラリーのポリヌクレオチド更なる選択及び濃縮の段階、並びにそれらのポリヌクレオチドの単離時に、同様のプロセスが、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異

50

的断片の一部として所望の特異的抗原に結合する第二のライブラリーのポリヌクレオチドの回収するために実行される。

【0224】

任意の適当なレポーター分子をこの方法において使用することができ、その選択は、使用される宿主細胞、利用可能な検出装置、及び望ましい検出の容易さによって決まる。適当なレポーター分子は、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、及びβ-ガラクトシダーゼを含むが、これらに限定されるものではない。

【0225】

その表面上に免疫グロブリン分子を発現することが可能な任意の宿主細胞を、この方法において使用することができる。好ましい宿主細胞は、免疫グロブリン-陰性形質細胞腫細胞、例えばNS1細胞、Sp2/0細胞、又はP3細胞、及び初期B細胞性リンパ腫細胞を含む。

【0226】

前述の細胞死の方法と同様に、速度論の考察は、レポーター構築物の発現は、CPE誘導の前に生じることを指示している。それにもかかわらず、宿主細胞表面上の免疫グロブリン分子の抗原誘導型架橋に反応する検出可能なレポーター分子の発現は、CPEの誘導に先行するように、宿主細胞を抗原と接触した後約1時間～約4日の期間内に生じることが好ましい。より好ましくは、レポーター分子の発現は、宿主細胞が抗原と接触された後約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約14時間、約16時間、約18時間、約20時間、約22時間、約24時間、約28時間、約32時間、約36時間、約40時間、約44時間、又は約48時間以内に生じる。更により好ましくはレポーター分子発現は、宿主細胞の抗原との接触の約12時間以内に生じる。

【0227】

「表面免疫グロブリン分子の架橋時に誘導される転写調節領域」とは、表面に発現された免疫グロブリン分子の架橋時に宿主細胞においてアップレギュレーションされる遺伝子を通常調節する領域、例えば宿主細胞プロモーターを意味する。このような転写調節領域の好ましい例は、BAXプロモーターであり、これは初期B細胞性リンパ腫細胞において表面免疫グロブリン分子の架橋時にアップレギュレーションされる。

【0228】

更に別の態様において、抗原特異的結合を基に、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片をコードしているポリヌクレオチドを選択する、選択又はスクリーニング法が提供される。この態様は、図5に図示されている。この方法に従い、それらの表面上に抗原特異的免疫グロブリン分子又はそれらの断片を発現する宿主細胞は、抗原結合の検出のみを基に回収される。抗原結合は選択法として利用され、すなわち、抗原特異的免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞は、前述の細胞死を基にした選択について説明されたものと同様の方法により、抗原結合によって直接選択される。例えば、抗原が固形基質に結合されているならば、抗原に結合している懸濁液中の宿主細胞は、抗原を介した固形基質への結合により回収され得る。あるいは、抗原結合は、スクリーニングプロセスとして使用することができ、すなわち、宿主細胞のプールは、抗原誘導型細胞シグナル伝達について先に説明した方法により検出可能な抗原結合についてスクリーニングされている。例えば、それらの表面に免疫グロブリン又はそれらの断片を発現している宿主細胞のプールは、抗原と接触され、かつ所定のプール内の抗原結合が、免疫アッセイにより、例えば抗原に結合する酵素-抗体複合体の検出により、検出される。

【0229】

先に説明した免疫グロブリン同定法の第一段階を参照し、抗原特異的結合法による選択を、下記のように行うことができる。宿主細胞は、その表面に免疫グロブリン分子の高レベルの発現が可能である感染及び／又はトランスフェクションについて選択される。宿主細胞は懸濁液中で増殖することが好ましい。前述のような第一及び第二のポリヌクレオチドライブラリーによる感染後、抗体分子の合成及び集成が進行される。その後宿主細胞が、

それらの表面に結合した抗原を有するマイクロタイターウェルに移される。抗原に結合している宿主細胞は、これによりウェル表面に付着され、かつ未結合のこれらの細胞は、ゆるやかな洗浄により除去される。あるいは、抗原に結合している宿主細胞は、例えば、蛍光標示式細胞分取器（FACS）により回収され得る。FACSは、フローサイトメトリーとも称されるが、これは蛍光を含む、光学特性を基にした個々の細胞の選別に使用される。これは、比較的短時間での細胞の大きい集団のスクリーニングに有用である。最終的に抗原に結合した宿主細胞が回収され、これにより免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部として、関心のある抗原に特異的に結合する第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている第一のライブラリーのポリヌクレオチドを濃縮する。

10

【0230】

更なる第一のライブラリーのポリヌクレオチドの選択及び濃縮の段階、並びにこれらのポリヌクレオチドの単離時に、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部として、望ましい特異的抗原に結合する第二のライブラリーのポリヌクレオチドの回収が実行される。

【0231】

その表面に免疫グロブリン分子を発現することが可能な任意の宿主細胞を、この選択方法において使用することができる。好ましい宿主細胞は、免疫グロブリン陰性形質細胞腫細胞、例えばNS1細胞、Sp2/O細胞、P3細胞、及び初期B細胞性リンパ腫細胞を含む。細胞が懸濁液中で増殖可能であることが好ましい。

20

【0232】

前述の免疫グロブリン同定法の第一の段階を参照し、抗原特異的結合を介したスクリーニング法を以下のように実行することができる。免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているウイルスベクターにおいて構築されるポリヌクレオチドの第一のライブラリーは、前述の方法により複数のプールへ分割される。その後ウイルスプールを用いて、調製されたウイルスプールと同数の宿主細胞のプールが感染される。このスクリーニング法において、宿主細胞は固形基質に接着されることが好ましい。ポリヌクレオチドの第二のライブラリーも、宿主細胞プールへ導入され、かつ宿主細胞の表面上での免疫グロブリン分子又はそれらの断片の発現が許容される。

【0233】

その後、宿主細胞プールを所望の抗原と接触させる。抗原とのインキュベーション後、過剰な未結合の抗原が洗浄除去される。最後に、細胞プールが、抗原結合に関してスクリーニングされる。抗原結合は、様々な方法により検出することができる。例えば、抗原は、酵素へ複合することができる。未結合の抗原の除去後、基質が添加され、かつ酵素反応生成物が検出される。この方法は、第二の抗体複合体、又はストレプトアビジン／ビオチンシステムの使用により増強することができる。このようなスクリーニング法は、当業者に周知であり、標準の販売業者からキットの形で容易に入手可能である。更に、抗原が顕微鏡的粒子、例えば金ビーズに結合されている場合は、抗原の宿主細胞への結合は、顕微鏡により検出することができる。前述の細胞シグナル伝達法同様、そこでの抗原結合が検出される宿主細胞のこれらのプールは収集され、かつそれに含まれた第一のライブラリーのポリヌクレオチドが回収される。あるいは、そこでの抗原結合が検出される宿主細胞のプールが同定され、かつそこに含まれる第一のライブラリーのポリヌクレオチドは、ライブラリーの最初の拡張後に取り分けたポリヌクレオチドのプールの複製アリコートから回収される。

30

40

【0234】

抗原特異的免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている第一のライブラリーのポリヌクレオチドを更に濃縮するために、先に回収されたポリヌクレオチドが、複数のサブプールに分割される。これらのサブプールは、第一のラウンドにおいて使用されたプールよりもより少ない異なるメンバーを含むように設定される。例えば、第一のプールの各々が、 10^3 個の異なるポリヌクレオチドを含む場合、このサブプールは、平均約1

50

0又は100個の異なるポリヌクレオチドを各々含むように設定される。これらのサブプールは、前記第二のライブラリーと共に宿主細胞へ導入され、かつ宿主細胞の膜表面上の免疫グロブリン分子又はそれらの断片の発現が許容される。その後宿主細胞が、前述のように抗原と接触され、かつそこで抗原結合が検出される宿主細胞のこれらのサブプールが収集されるか、もしくは簡単に同定され、及びそこに、又は複製アリコート中に含まれる第一のライブラリーのポリヌクレオチドが回収される。当業者には、このプロセスは、抗原特異的免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを適切に濃縮するために、1回又は複数回追加して繰り返されることは理解されると思われる。

【0235】

第一のライブラリーのポリヌクレオチドの更なる選択及び濃縮の段階、並びにそれらのポリヌクレオチドの単離時に、同様のプロセスが実行され、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の一部として、所望の特異的抗原に結合している第二のライブラリーのポリヌクレオチドが回収される。

【0236】

その表面に免疫グロブリン分子の発現が可能な任意の宿主細胞を、この方法で使用する事ができる。好ましい宿主細胞は、免疫グロブリン-陰性形質細胞腫細胞、例えばNS1細胞、Sp2/0細胞、又はP3細胞、及び初期B細胞性リンパ腫細胞を含む。

【0237】

関心のある抗原は、本明細書に説明したような直接及び間接の抗原誘導型細胞死の方法を実践する場合に、いずれか通常の方法により宿主細胞と接触させることができる。例えばある態様において、抗原、例えばペプチド又はポリペプチドが、固形基質に付着される。本明細書において使用される「固形支持体」又は「固形基質」は、当技術分野において公知であるような様々な形のいずれかであることができる、細胞又は抗原を結合することが可能な支持体である。周知の支持体は、組織培養用のプラスチック、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び改質セルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩、及び磁鉄鉱を含む。本発明の目的のためのこれらの担体の性質は、ある程度可溶性であるか又は不溶性であることができる。これらの支持体材料は、結合した分子が細胞に結合することが可能である限りは、事実上可能性のある構造的形状をとることができる。従ってこの支持体の形状は、ビーズのように球形であるか、又は試験管の内面もしくは棒の外周のように円柱状であることができる。あるいは表面は、シート、試験片などのように、平坦であることができる。好ましい支持体は、ポリスチレンビーズを含む。この支持体の形状は、チューブ、ビーズ、マイクロビーズ、ウェル、プレート、組織培養プレート、ペトリ皿、マイクロプレート、マイクロタイタープレート、フラスコ、スティック、ストリップ、バイアル、パドルなどを含むことができる。固形支持体は、磁性又は非磁性であることができる。当業者は、細胞又は抗原を結合するための多くの他の適当な担体を知っており、これらを容易に確認することができると思われる。

【0238】

あるいは、抗原が、抗原発現性の提示細胞の表面に発現されている。本明細書において使用される「抗原発現性の提示細胞」とは、抗原が、本発明の宿主細胞の表面に付着した免疫グロブリン分子と相互作用することができるような方法で、その表面に関心のある抗原を発現している細胞を意味する。好ましい抗原発現性の提示細胞は、組換えタンパク質として関心のある抗原を発現するように操作されるが、この抗原は、その細胞の固有の抗原であることができる。組換え抗原発現性の提示細胞は、当業者に周知である分子生物学及びタンパク質発現技術を用いるいずれか適当な方法により構築することができる。典型的には、関心のある抗原をコードしているプラスミドベクターが、適当な細胞へトランスフェクションされ、かつこの細胞は、望ましいポリペプチド抗原の発現についてスクリーニングされる。好ましい組換え抗原発現性の提示細胞は、関心のある抗原を安定して発現する。関心のある抗原を発現するように操作されていないこと以外は抗原発現性の提示細胞

10

20

30

40

50

と同型の細胞は、本明細書において「抗原フリー提示細胞 (antigen-free presenting cell)」と称する。適当な細胞株は、抗原発現性の提示細胞の調製に使用することができる。細胞株の例は、以下を含むが、これらに限定されるものではない：SV40で形質転換されたサル腎CVI株(COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胚性腎株(293、Grahamら、J. Gen Virol.、36：59(1977))；ベビーハムスター腎細胞(BHK、ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞-DHFR(CHO、Urlaub及びChasin、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)、77：4216(1980))；マウスセルトリ細胞(TM4、Mather、Biol. Reprod.、23：243-251(1980))；サル腎細胞(CVI、ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞(HELA、ATCC CCL 2)；イヌ腎細胞(MDCK、ATCC CCL 34)；パファローラット肝細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞(hep G2、HB 8065)；マウス乳癌(MMT 060562、ATCC CCL 51)；TRI細胞(Matherら、Annals N. Y. Acad. Sci.、383：44-68(1982))；NIH/3T3細胞(ATCC CRL-1658)；及び、マウスL細胞(ATCC CCL-1)を含む。さらに別の細胞株は、当業者には明らかであると思われる。多種多様な細胞株が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209)から入手可能である。

10

20

【0239】

当業者に理解されるように、抗原発現性の提示細胞は、関心のある抗原に加え、多くの天然の抗原決定基をその表面に含むと考えられる。それらの表面上に異なる免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片の広いスペクトルを発現している本発明のある種の宿主細胞は、これらの追加の抗原決定基に結合することが予想される。従って、抗原発現性の提示細胞が本発明の宿主細胞と関心のある抗原が接触するために使用される場合、これらの追加の抗原決定基に反応性である免疫グロブリンを発現しているこれらの宿主細胞の宿主細胞集団を最初に枯渇することが必要である。本発明は、抗原フリー提示細胞の天然の表面抗原に対し特異的である免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞の宿主細胞集団を枯渇する方法を提供する。これは図5に図示されている。本質的に、これらの方法は、宿主細胞集団を抗原発現性の提示細胞と接触する前に、宿主細胞集団を抗原フリー提示細胞と接触することを含む。

30

【0240】

ある態様において、この方法は、宿主細胞の集団を、固形基質に結合された抗原フリー提示細胞に吸着することを含む。未結合の細胞及び／又はそこに含まれるポリヌクレオチドは、回収され、かつ回収された宿主細胞又は回収されたポリヌクレオチドが導入されている新規宿主細胞は、次に、抗原発現性の提示細胞と接触される。宿主細胞のプールが抗原と接触させられるこれらの選択法において、宿主細胞のプールは、固形基質に結合された抗原フリー提示細胞に吸着される。未結合のプール中の細胞及び／又はそれに含まれたポリヌクレオチドは回収され、回収された宿主細胞又は回収されたポリヌクレオチドが導入されている宿主細胞は、その後抗原発現性の提示細胞と接触された。

40

【0241】

別の態様において、この方法は、抗原フリー提示細胞上の抗原決定基の表面抗原と反応する表面免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞が、宿主細胞の表面上の免疫グロブリン分子の架橋時の全て先に説明されたような、プログラムされた細胞死、例えばアポトーシス、直接的又は間接的細胞死、又は細胞シグナル伝達、レポーター分子の発現のいずれかを受けるような条件下で、宿主細胞集団を抗原フリー提示細胞と、接触することを含む。これらの宿主細胞、及びより詳細には細胞死を蓄積しないか又はレポーター分子を発現しない宿主細胞からの、第一のライブラリー又は第二のライブラリーのいずれか由来のポ

50

リヌクレオチドが、次に回収される。例えば、免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞集団は、固形基質に付着するように維持され、かつ細胞死を受けているこれらの細胞は、この基質から放出され、培養液の内容物が除去及び廃棄され、かつ付着し続ける細胞、及びそこに含まれたポリヌクレオチドが回収される。

【0242】

当業者に理解されるように、抗原フリー提示細胞上に保持された決定基と反応性である免疫グロブリンを発現するこれらの宿主細胞の宿主細胞集団の枯渇には、1ラウンドよりも多い枯渇を必要とすると考えられる。更に枯渇の連続ラウンドが、抗原発現性の提示細胞上に発現された関心のある抗原に特異的に結合する免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞の濃縮の連続ラウンドにより変更され得ることが企図されている。

10

【0243】

更に別の態様において、免疫グロブリン分子の望ましい抗原特異的機能を基に、免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的機能的断片をコードしているポリヌクレオチドを回収するためのスクリーニング法が提供される。この方法に従い、完全に可溶性の免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞のプールが調製される。発現は許容され、かつ得られた細胞培地は、ある種の望ましい抗原特異性を必要とする様々な機能アッセイについて試験される。この方法に従い、試験される「機能」は、例えば、ウイルス中和、オプソニン効果、ADCC、アンタゴニスト／アゴニスト活性、ヒスタミン放出、赤血球凝集、又は赤血球凝集阻害のような、免疫グロブリン分子により保持される標準エフェクター機能であることができる。あるいは、「機能」は、単純に抗原への結合を意味することができる。

20

【0244】

関連した態様において、公知の抗原特異性であるが、変更されたエフェクター機能を伴う免疫グロブリン分子を選択するためのスクリーニング法が提供される。これらの態様に従い、公知の抗原特異性を伴うが、所定のエフェクター機能に関連していることがわかっている定常ドメイン領域に変更を有する免疫グロブリンサブユニットポリペプチドのライブラリーが構築される。この方法に従い、完全に可溶性の免疫グロブリン分子を発現している宿主細胞のプールが調製される。発現が許容され、かつ得られる細胞培地が、改善された又は抑制された活性に関する様々な機能アッセイについて試験される。この方法に従い、試験される「機能」は、例えば、ウイルス中和、オプソニン効果、補体結合、ADCC、アンタゴニスト／アゴニスト活性、ヒスタミン放出、赤血球凝集、又は赤血球凝集阻害のような、免疫グロブリン分子により保持される標準エフェクター機能であることができる。

30

【0245】

前述の免疫グロブリン同定法の第一段階を参照し、エフェクター機能のスクリーニングは下記のように行うことができる。完全に分泌された免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの第一のライブラリーは、前述のように複数のプールへ分割され、各プールは、異なる可変領域を伴う完全に分泌された免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている、約 10 、 100 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 又は 10^9 個の異なるポリヌクレオチドを含む。好ましいプールは最初に、約 10^3 個のポリヌクレオチドを各々含む。各プールは拡張され、かつ複製アリコートが後の回収のために取り分けられる。ポリヌクレオチドのプールがウイルスベクター、好ましくはポックスウイルスベクター、更により好ましくはワクシニアウイルスベクターにおいて構築される場合は、例えばウイルスライブラリーの高一力価ストックを希釈し、かつ組織培養細胞のマイクロ培養物を低MOI、例えば $MOI < 0.1$ で感染するためにその一部を使用することにより、これらのプールが調製される。典型的にはウイルス力価の $1,000$ 倍よりも大きい拡張が、感染の 48 時間後に得られる。個々のプールを倍加するウイルス力価の拡張は、組換え体サブセットが、競合サブセットの比較的迅速な増殖ために喪失されるリスクを軽減する。

40

【0246】

その後ウイルスプールを使用し、調製されたウイルスプールと同数の宿主細胞のプールが

50

感染される。各プールにより感染された宿主細胞の数は、そのプールに含まれたポリヌクレオチドの数、及び望ましいMOIによって決まる。実際的には使用したウイルスベクターによる感染を許容し、かつ完全に分泌された免疫グロブリン分子の発現を可能にするいずれかの宿主細胞を、この方法において使用することができる。好ましい宿主細胞は、免疫グロブリン陰性形質細胞腫細胞、例えばNS1細胞、Sp2/O細胞、又はP3細胞、及び初期B細胞性リンパ腫細胞を含む。これらの細胞は、懸濁液中で培養するか又は固形表面に付着することができる。ポリヌクレオチドの第二のライブラリーも、宿主細胞プールに導入することができかつ完全に分泌された免疫グロブリン分子又はそれらの断片の発現が許容される。

【0247】

10

その後、宿主細胞プールが培養された馴化培地は回収され、かつ特異的標的抗原に反応したエフェクター機能について標準化された機能アッセイにおいて試験される。

【0248】

いずれか適当な機能アッセイを、この方法において使用することができる。例えば、収集された細胞上清を、例えばHIVのような標的ウイルスを中和する能力を伴う免疫グロブリン分子を検出するために、ウイルス中和アッセイにおいて試験することができる。あるいは、収集された細胞上清を、例えばアポトーシスのような、標的細胞機能をブロック又は促進する、すなわちアンタゴニスト又はアゴニストとして作用する能力について試験することができる。適当な機能アッセイの例は、下記実施例に説明されている。本明細書において使用されたように、「機能アッセイ」は、例えば、当業者に周知の標準ELISAアッセイによるような、抗原結合の単純な検出も含む。

20

【0249】

所定の宿主細胞プールが増殖される馴化培地が所望の機能を発揮する場合、そのプールの宿主細胞に含まれた第一のライブラリーのポリヌクレオチドが、そのポリヌクレオチドプールの最初の拡張後に、先に取り分けられたアリコートから回収される。

【0250】

更に抗原特異的免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている第一のライブラリーのポリペプチドを濃縮するために、先に回収されたポリヌクレオチドが、複数のサブプールへ分割される。これらのサブプールは、先に利用したプールよりも少ない異なるメンバーを含むように設定される。例えば、第一のプールが各 10^3 個の異なるポリヌクレオチドを含む場合、このサブプールは、平均で約10又は100個の異なるポリヌクレオチドを各々含むように設定される。これらのサブプールは、前述のように第二のライブラリーと共に宿主細胞へ導入され、かつ完全に分泌された免疫グロブリン分子又はそれらの断片の発現が許容される。宿主細胞プールが培養される馴化培地は回収され、かつ前述のような特異的標的抗原に反応するエフェクター機能について標準的機能アッセイについて試験され、所望の機能特性を有する馴化培地の試料が同定され、かつサブプールの宿主細胞に含まれた第一のライブラリーのポリヌクレオチドが、前述のように先に取り分けられたアリコートから回収される。当業者により、抗原特異的免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを適切に濃縮するために、この過程は、更に1回又は複数回繰り返されることは理解されると思われる。

30

40

【0251】

更なる第一のライブラリーのポリヌクレオチドの選択及び濃縮の段階、並びにこれらのポリヌクレオチドの単離時に、完全に分泌された免疫グロブリン分子又はそれらの断片の一部として、所望の抗原特異的機能を発揮する第二のライブラリーのポリヌクレオチドを回収するために同様のプロセスが実行される。

【0252】

キット 本発明は更に、真核宿主細胞において発現された抗原特異的組換え免疫グロブリンの選択のためのキットを提供する。このキットは、本明細書において説明された方法を実行するのに必要な1種又は複数の成分により満たされた1個又は複数個の容器を備えている。ある態様において、キットは以下を含む：(a) 転写調節領域との操作可能な結合

50

を介して、複数の第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの第一のライブラリーであり、ここで各第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは、(i) 重鎖定常領域及び軽鎖定常領域からなる群より選択される第一の免疫グロブリン定常領域、(ii) 該第一の定常領域に対応する免疫グロブリン可変領域、及び(iii) 該第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの細胞表面発現又は分泌を指示することが可能なシグナルペプチドを含み、ここで該第一のライブラリーは、真核ウイルスベクターにおいて構築されているもの；(b) 転写調節領域との操作可能な結合を介して、複数の第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの第二のライブラリーであり、ここで各々は、(i) 重鎖定常領域及び軽鎖定常領域からなる群より選択される第二の免疫グロブリン定常領域であり、ここで該第二の免疫グロブリン定常領域は、第一の免疫グロブリン定常領域とは同じではなく、(ii) 該第二の定常領域に対応する免疫グロブリン可変領域、及び(iii) 該第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの細胞表面発現又は分泌を指示することが可能なシグナルペプチドを含み、ここで第二の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは、第一の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドと組み合わせ、宿主細胞の膜に付着した表面免疫グロブリン分子又はそれらの抗原特異的断片を形成することが可能であり、かつここで第二のライブラリーは、真核ウイルスベクターにおいて構築されているもの；並びに、(c) 該免疫グロブリン分子の発現が可能な宿主細胞の集団。このキットにおいて、第一及び第二のライブラリーは、感染性ウイルス粒子及び失活されたウイルス粒子の両方として提供され、ここで失活されたウイルス粒子は、宿主細胞を感染し、そこに含まれたポリヌクレオチドを発現することが可能であるが、この失活されたウイルスは、ウイルス複製を受けない。加えて、このキットにより提供される宿主細胞は、抗原との相互作用により選択され得る抗原特異的免疫グロブリン分子を発現することが可能である。キットの使用は、本明細書に説明した方法に従う。ある態様において、このキットは、関心のある特定の抗原の選択のバリデーションを標準化するための対照抗原及び試薬を含むと考えられる。

【0253】

単離された免疫グロブリン 本発明は更に、本明細書に記されたいずれかの方法により産生された、単離された抗原特異的免疫グロブリン又はそれらの断片を提供する。このような単離された免疫グロブリンは、診断用又は治療用薬品として有用であると考えられる。更に本発明の単離された免疫グロブリン、及び薬学的に許容できる担体を含有する組成物が提供される。

【0254】

本発明の実践は、特に記さない限りは、当技術分野内の、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、及び免疫学の通常の技術を使用する。このような技術は、参考文献に十分に説明されている。例えば、「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning A Laboratory Manual)」第2版、Sambrookら編集、Cold Spring Harbor Laboratory Press社：(1989)；「分子クローニング：実験マニュアル」Sambrookら編集、Cold Springs Harbor Laboratory、NY(1992)、「DNAクローニング(DNA Cloning)」第I及びII巻(D. N. Glover編集、1985)；「オリゴヌクレオチド合成(Oligonucleotide Synthesis)」(M. J. Gait編集、1984)；Mullisら、米国特許第4,683,195号；「核酸ハイブリダイゼーション(Nucleic Acids Hybridization)」(B. D. Hames及びS. J. Higgins編集、1984)；「転写及び翻訳(Transcription And Translation)」(B. D. Hames及びS. J. Higgins編集、1984)；「動物細胞の培養(Culture Of Animal Cells)」(R. I. Freshney、Alan R. Liss社、1987)；「細胞及び酵素固定(Immobilized Cells And

Enzymes)」(IRL Press社、1986)；B. Perbal、「分子クローニングの実践ガイド(A Practical Guide To Molecular Cloning)」(1984)；全書(treatise)「酵素学的方法(Methods In Enzymology)」(Academic Press社、N. Y.)；「哺乳類細胞の遺伝子導入ベクター(Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells)」(J. H. Miller及びM. P. Calos編集、1987、Cold Spring Harbor Laboratory)；「酵素学的方法」第154及び155巻(Wuら編集)；「細胞及び分子生物学における免疫化学的方法(Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology)」(Mayer及びWalker編集、Academic Press社、ロンドン、1987)；「実験免疫学ハンドブック(Handbook Of Experimental Immunology)」第I-IV巻(D. M. Weir及びC. C. Blackwell編集、1986)；「マウス胚の操作(Manipulating the Mouse Embryo)」(Cold Spring Harbor Laboratory Press、コールドスプリングハーバー、N. Y.、1986)；並びに、Ausubelら「分子生物学最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」John Wiley and Sons社、ボルチモア、MD(1989)を参照のこと。

【0255】

抗体操作の一般的原理は、「抗体操作(Antibody Engineering)」第2版、C. A. K. Borrebaeck編集、Oxford Univ. Press社(1995)に記されている。タンパク質操作の一般的原理は、「タンパク質操作：実践法(Protein Engineering, A Practical Approach)」Rickwood, D.ら編集、IRL Press、Oxford Univ. Press社、オックスフォード、英国(1995)に記されている。抗体及び抗体-ハプテン結合の一般的原理は、下記に記されている：Nisonoff, A.、「分子免疫学(Molecular Immunology)」第2版、Sinauer Associates社、サンダーランド、MA(1984)；及び、Steward, M. W.、「抗体、それらの構造及び機能(Antibodies, Their Structure and Function)」Chapman and Hall社、ニューヨーク、NY(1984)。加えて、当技術分野において公知であるが特に説明されていない免疫学の標準法は、一般に「免疫学最新プロトコール(Current Protocols in Immunology)」John Wiley & Sons社、ニューヨーク；Stitesら編集、「基礎及び臨床-免疫学(Basic and Clinical Immunology)」(第8版)、Appleton & Lange社、ノーウォーク、CT(1994)、並びにMishell及びShiigi編集、「細胞免疫学における選択法(Selected Methods in Cellular Immunology)」W. H. Freeman社、ニューヨーク(1980)に従っている。

【0256】

免疫学の一般的原理を説明する標準の参考研究は、「免疫学最新プロトコール」John Wiley & Sons社、ニューヨーク；Klein, J.、「免疫学：自己-非自己の識別の科学(Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination)」John Wiley & Sons社、ニューヨーク(1982)；Kennett, R.ら編集、「モノクローナル抗体、ハイブリドーマ：生物学的分析の最新法(Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses)」Plenum Press社、ニューヨーク(1980)；Campbell, A.「モノクローナル抗体技術(Monoclonal Antibodies Technology)」Burden, R.ら編集、「生化学・分子生物学実験技術

(Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology)」、第13巻、Elsevier、アムステルダム(1984)に説明されている。

【0257】

実施例

実施例 1

多様な特異性のヒト免疫グロブリンライブラリーの構築

多様な免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドのライブラリーを、下記のように作成した。ヒトのVH(重鎖可変領域)、VK(κ軽鎖可変領域)及びVL(λ軽鎖可変領域)の遺伝子を、PCR増幅した。3種の可変遺伝子ファミリーの各々について、組換えプラスミドライブラリー及びワクシニアウイルスライブラリーの両方を構築した。これらの可変領域遺伝子を、免疫グロブリンリーダー配列と対応する重鎖又は軽鎖の定常領域配列の間のp7.5/tk-ベースの転移/発現プラスミドへ挿入した。このプラスミドを用い、対応するワクシニアウイルス組換え体を、三分子組換えにより作成し、かつワクシニアウイルス感染した細胞へのトランスフェクション後、更に免疫グロブリン鎖の高レベル発現のために直接使用した。リンパ腫細胞を、最初にワクシニア重鎖ライブラリーで感染し、その後プラスミド軽鎖ライブラリーで一過性にトランスフェクションした。IgM及び軽鎖の同時発現は、抗体分子の集成及び表面発現を生じた。

10

【0258】

1. 1 pVHE ヒトμ膜免疫グロブリン定常領域を含む発現ベクターで、本明細書においてpVHEと称するものを、下記のように構築した。この戦略を図3に示した。膜結合したヒトIgM重鎖をコードしているcDNAを、Clontech社(パロアルト、CA)から入手可能なSMART(登録商標)RACE cDNA増幅キットを用い、骨髓RNAから単離した。PCRを、5'プライマー(huCμ5B)

20

5'-ATTAGGATCC

GGTCACCGTCTCCTCAGGG-3'(配列番号:24),

、及び3'プライマー(huCμ3S)

5'-ATTAGTCGACTCATTTCACCTTGAACAAGGTGAC-3'(配列番号:25).

30

を用いて行った。その後PCR産物を、位置指定突然変異誘発のために、pBluescript II/KSに、BamHI部位及びSalI部位で挿入し、CH2及びCH4ドメイン内に位置した2個のBstEII部位を除去した。これらの部位でコードされたアミノ酸を変更しないヌクレオチド置換が選択された。

【0259】

プラスミドp7.5/tkを、ZaudererのPCT公開国際公開公報第00/028016号に開示されたように作成し、かつ下記実施例5において、pVHEへ転換した。p7.5/tkのマルチクロニング部位(MCS)を、NotI-NcoI-BssHII-BstEII-SalIの制限部位を含むカセットと交換し、p7.5/tk2

40

5'-GCGGCCGCAA

ACCATGGAAA GCGCGCATATGGTCACCAAA AGTCGAC-3',

を有し、本明細書においては配列番号:26と称した。IgM重鎖のアミノ酸-19から-3に相当するシグナルペプチド配列をコードしているカセットを、p7.5/tk2のNcoI部位とBssHII部位の間にクロニングし、p7.5/tk2Lを作出した。先に説明したように産生されたBstEII-突然変異誘発したIgM重鎖を、その後p7.5/tk2LのBstEII部位とSalI部位の間にクロニングし、pVHEを作出した。下記のPCRにより作出したアミノ酸-4から110をコードしているヌク

50

レオチドを含む重鎖可変領域（VH）カセットを、その後 pVHE の B s s H I I 部位と B s t E I I 部位の間にクローニングし、膜結合した重鎖をコードしているポリヌクレオチドのライブラリーを作成した。μ重鎖配列と選択された制限酵素部位の間の重複のために、これは、正確な翻訳リーディングフレーム内にコンティグな膜結合した重鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの発現を生じた。

【0260】

1. 2 pVHEs ヒト μ 分泌免疫グロブリン定常領域を含む発現ベクターであり、本明細書においては pVHEs と称されるものは、以下のように構築される。この戦略は、図 8 に図示されている。分泌ヒト I g M 重鎖をコードしている cDNA は、S M A R T（登録商標）R A C E cDNA 増幅キットを使用し、骨髓 RNA から単離される。上流プライマー h u C μ 5 B は、5' 末端に付属した（a p p e n d e d）B a m H I 部位及び B s t E I I 部位、それに続く VH のアミノ酸 111～113 及び C μ H 1 の第一のアミノ酸を含む。下流プライマー s h u C μ 3 S は、分泌された C μ の最後の 6 個のアミノ酸、それに続く停止コドン及び S a l I 部位を含む。これらのプライマーは下記の配列を有する：

h u C μ 5 B :

5'-ATTAGGATCC GGTACCGTC TCCTCAGGG -3' (配列

番号 :27);

及び

s h u C μ 3 S :

5'-ATTAGTCGAC TCAGTAGCAG GTGCCAGCTG T -3'

(配列番号 :28).

【0261】

その後この P C R 産物を、部位特異的変異誘発のために、p B l u e s c r i p t I I / K S へ B a m H I 部位及び S a l I 部位で挿入し、C H 2 及び C H 4 ドメイン内に位置した 2 個の B s t E I I 部位を除去した。これらの部位によりコードされたアミノ酸を変更しないヌクレオチド置換を選択した。

【0262】

1. 1 項において作成されたプラスミド p 7. 5 / t k 2 L を、下記の方法により、p V H E s へ転換した。前述のように作成した B s t E I I - 突然変異誘発した分泌 I g M 重鎖を、次に p 7. 5 / t k 2 L の B s t E I I 部位と S a l I 部位の間にクローニングし、p V H E s を作成した。後述のような P C R により産生されたアミノ酸 - 4 から 110 をコードしているヌクレオチドを含む重鎖可変領域（VH）カセットを、p V H E s の B s s H I I 部位と B s t E I I 部位の間にクローニングし、分泌された重鎖をコードしているポリヌクレオチドのライブラリーを作成した。μ重鎖配列及び選択された制限酵素部位の間の重複のために、これは、正確な翻訳リーディングフレームの中にコンティグな分泌重鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの発現を生じた。

【0263】

1. 3 pVKE 及び pVLE ヒト κ 及び λ 免疫グロブリン軽鎖定常領域を含む発現ベクターを、本明細書においては pVKE 及び pVLE と称し、これらを下記のように構築した。戦略を図 4 に示す。

(a) プラスミド p 7. 5 / t k を、下記の方法により pVKE に転換した。p 7. 5 / t k の 2 個の X h o I 部位及び 2 個の H i n d I I I 部位を、フィルイン（f i l l - i n）ライゲーションにより除去し、3 個の A p a L I 部位（1 個は骨格、1 個は C o l E l o r i、及び残りは A m p）を、常法により除去し、かつ p 7. 5 / t k のマルチクローニング部位（M C S）を、N o t I - N c o I - A p a L I - X h o I - H i n d I I I - S a l I の制限部位を含むカセットで置き換え、p 7. 5 / t k 3 を作出した。このカセットは、以下の配列

10

20

30

40

50

5'-GCGGCCGCCC ATGGATACGT GCACTTGACT
CGAGAAGCTT AGTAGTCGAC-3',

を有し、本明細書においては配列番号：29と称した。κ軽鎖のアミノ酸-19から-2に相当するシグナルペプチド配列をコードしているカセットを、p7.5/tk3のNcoI部位とApaLI部位の間にクローニングし、p7.5/tk3Lを作成した。Cκ領域をコードしているcDNAを、SMART（登録商標）RACE cDNA増幅キットを用い、前述のように、アミノ酸104~107+Ckをコードしている領域の5'末端にXhoI部位、停止コドン、及びその3'末端にSalI部位を含むためのプライマーにより、骨髓RNAから単離した。これらのプライマーは下記の配列を有する：huCκ5： 10

5'-CAGGACTCGA

GATCAAACGA ACTGTGGCTG -3' (配列番号 :30);

huCκ3：

5'-

AATATGTCGA CCTAACACTC TCCCCTGTTG AAGCTCTTT-3' (配列番号 :31);

20

及び、huCκ3：

5'-AATATGTCGA CCTAACACTC TCCCCTGTTG
AAGCTCTT-3' (配列番号 :32).

次にCκカセットを、p7.5/tk3LのXhoI部位とSalI部位の間にクローニングし、pVKEを作出した。アミノ酸-3から105をコードしているヌクレオチドを含むκ軽鎖可変領域カセット（VK）を、後述のようにPCRにより作成し、その後pVKEのApaLI部位とXhoI部位の間にクローニングした。κ軽鎖配列と選択された制限酵素部位の間の重複のために、これは、正確な翻訳リーディングフレームの中にコンティグなκ軽鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの発現を生じた。 30

【0264】

(b) プラスミドp7.5/tk3Lは、下記の方法によりpVLEに転換した。Cκ領域をコードしているcDNAを、前述のように、SMART（登録商標）RACE cDNA増幅キットを用い、5'末端にHindIII部位及びV_λのアミノ酸105から107をコードしている領域、及びその3'末端に停止コドン及びSalI部位を含むプライマーにより、骨髓RNAから単離した。これらのプライマーは下記の配列を有する：huCλ5：

5'-ATTTAAGCTT ACCGTCCTAC

GAAGTGTGGC TGCACCATCT -3' (配列番号 :33);

40

及び、huCλ3（配列番号：31）。次にこれらのCκカセットを、p7.5/tk3LのHindIII部位とSalI部位の間にクローニングし、pVLEを作出した。アミノ酸-3から104をコードしているヌクレオチドを含むλ軽鎖可変領域カセット（VL）を、後述のようにPCRにより作成し、その後pVLEのApaLI部位とHindIII部位の間にクローニングした。λ軽鎖配列と選択された制限酵素部位の間の重複のために、これは、正確な翻訳のリーディングフレームの中にコンティグなλ軽鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの発現を生じた。

【0265】

1. 4 可変領域 重鎖、κ軽鎖、及びλ軽鎖可変領域を、下記の方法により、前述のように作成した発現ベクターにおけるクローニングのために、PCRにより単離した。複数 50

のドナーからプールした正常なヒト骨髄（C l o n t e c h 社から入手可）から単離した RNA を、c D N A 合成に使用した。c D N A 調製物のアリコートをし、下記プライマーセットから選択したプライマー対と共に P C R 増幅に使用した：V H / J H、V K / J K 又は V L / J L。可変領域の増幅に使用したプライマーは、表 1 及び 2 に列記した。

【0266】

（a）重鎖可変領域 プラスミド発現ベクターが消化される方法により、V H プライマー、すなわち重鎖 V 領域の増幅に使用した対のフォワードプライマーは、下記の一般的配置を有し、B s s H I I 制限部位を太字で示した：

V H プライマー：

GCGCGCACTCC-VH FR1 プライマーの開始

10

これらのプライマーを、アミノ酸－4 及び－3 をコードしている B s s H I I 部位を伴う、リーダーの最後の 4 個のアミノ酸をコードしているコドン、それに続く V H ファミリー特異的 F R 1 配列を含むようにデザインした。表 1 及び 2 は、異なるファミリー特異的 V H プライマーの配列を列記している。重鎖可変領域の最後の 5 個のアミノ酸、すなわちアミノ酸 109～113 は、6 個のヒト重鎖 J 領域の間と同じであり、プラスミド p V H E に埋め込まれ、J H プライマー、すなわち重鎖可変領域の増幅に使用したリバープライマーは、アミノ酸 109 及び 110（太字で示す）をコードしている B s t E I I 部位を含むように下記の配置を示した：

J H プライマー：V H アミノ酸 103～108 のヌクレオチド配列（G で終結）－G T C A C C 20

これらのプライマーセットを使用し、V H P C R 産物は、アミノ酸－4 から 110 をコードしているコドンで始まり、アミノ酸－4 及び－3 である B s s H I I、及びアミノ酸 109 及び 110 のコドンの B s t E I I 部位の末端を含む。適当な制限酵素による切断時に、これらの P C R 産物は、B s s H I I 及び B s t E I I で消化された p V H E ヘクローニングされる。

【0267】

最も可能性のある再構成された重鎖可変領域の増幅を達成するために、表 1 及び 2 に示したような、V H 及び J H プライマーのファミリーを使用した。V H 1、3 及び 4 ファミリーは、ヒトゲノムに存在する 51 種の V 領域中の 44 種に相当している。発現ベクター中のアミノ酸 109～113 をコードしているコドンの埋め込みは、単独の共通 J H プライマーの使用を除外した。しかし表 1 及び 2 に示した 5 種 J H プライマーは、必要な P C R 反応の数を減少するために使用される各 V H プライマーについてプールすることができる 30

【0268】

（b）κ 軽鎖可変領域 V K プライマー、すなわち κ 軽鎖可変領域の増幅に使用した対のフォワードプライマーは、下記の一般的配置を有し、A p a L I 制限部位を太字で示した：

V K プライマー：

GTGCACTCC-VK FR1 プライマーの開始

40

この V K プライマーは、アミノ酸－3 及び－2 をコードしている A p a L I 部位を伴う、κ 軽鎖リーダーの最後の 3 個のアミノ酸をコードしているコドン、それに続く V K ファミリー特異的 F R 1 配列を含む。κ 鎖可変領域の最後の 4 個のアミノ酸（アミノ酸 104～107）をコードしているコドンが発現ベクター p V K E に埋め込まれるので、J K プライマー、すなわち κ 軽鎖可変領域の増幅に使用される対のリバープライマーは、下記の配置を示す：

J K プライマー：－V K のアミノ酸 98～103 をコードしているヌクレオチド配列－C T C G A G

X h o I 部位（太字で示す）は、κ 軽鎖可変領域のアミノ酸 104～105 をコードしているコドンを含む。κ 軽鎖可変領域をコードしている P C R 産物は、アミノ酸－3 のコド 50

ンで開始し、かつアミノ酸105のコドンで終結し、アミノ酸-3及び-2のコドンを含むA p a L I 部位並びにアミノ酸104及び105のコドンを含むX h o I 部位を伴う。V K 1 / 4 及びV K 3 / 6 プライマーは各々、2個の縮重ヌクレオチド位置を有する。これらのJ K プライマー（表1及び2参照）を使用すると、J K 1、3及び4は、アミノ酸104にV a l からL e u への変異を有し、並びにJ K 3はアミノ酸105にA s p からG l u への変異を有すると考えられる。

【0269】

(c) λ 軽鎖可変領域 V L プライマー、すなわちλ 軽鎖可変領域の増幅に使用される対のフォワードプライマーは、下記の一般的配置を有し、A p a L I 制限部位は太字で示した：

V L プライマー：

GTGCACTCC-VL の開始

A p a L I 部位は、アミノ酸-3及び-2のコドン、それに続くV L ファミリー特異的F R 1 配列を含む。V L の最後の5個のアミノ酸（アミノ酸103～107）をコードしているコドンは、発現ベクターp V L E に埋め込まれるので、J L プライマーは、アミノ酸103～104をコードしているコドンを含むH i n d I I I 部位（太字で示す）を含むように下記の配置を示す：

J L プライマー：-V L アミノ酸97～102のヌクレオチド配列-A A G C T T

λ 軽鎖可変領域をコードしているP C R 産物は、アミノ酸-3のコドンで開始し、並びにアミノ酸104のコドンで終結し、アミノ酸-3及び-2のコドンを含むA p a L I 部位、及びアミノ酸103及び104のコドンを含むH i n d I I I 部位を伴う。

【0270】

【表1】 ヒト免疫グロブリン可変領域のPCR増幅のためのオリゴオリゴヌクレオチドプライマー。クローニングに使用した制限酵素の認識部位は太字で示した。プライマー配列は5' から3' へである。

VH1 (配列番号 :34)	TTT TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
VH2 (配列番号 :144)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT GG
VH3 (配列番号 :35)	TTT TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
VH4 (配列番号 :36)	TTT TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG
VH5 (配列番号 :145)	AATA TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT G

JH1 (配列番号 :37)	GAC GGT GAC CAG GGT GCC CTG GCC CCA
JH2 (配列番号 :38)	GAC GGT GAC CAG GGT GCC ACG GCC CCA
JH3 (配列番号 :39)	GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC CCA
JH4/5 (配列番号 :40)	GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA
JH6 (配列番号 :41)	GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA
VK1 (配列番号 :42)	TTT GTG CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
VK2 (配列番号 :43)	TTT GTG CAC TCC GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC
VK3 (配列番号 :44)	TTT GTG CAC TCC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC
VK4 (配列番号 :45)	TTT GTG CAC TCC GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC
VK5 (配列番号 :46)	TTT GTG CAC TCC GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC
VK6 (配列番号 :47)	TTT GTG CAC TCC GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC
JK1 (配列番号 :48)	GAT CTC GAG CTT GGT CCC TTG GCC GAA
JK2 (配列番号 :49)	GAT CTC GAG CTT GGT CCC CTG GCC AAA
JK3 (配列番号 :50)	GAT CTC GAG TTT GGT CCC AGG GCC GAA

10

20

30

40

JK4 (配列番号 :51)	GAT CTC GAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA
JK5 (配列番号 :52)	AAT CTC GAG TCG TGT CCC TTG GCC GAA
VL1 (配列番号 :53)	TTT GTG CAC TCC CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC
VL2 (配列番号 :54)	TTT GTG CAC TCC CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GC
VL3A (配列番号 :55)	TTT GTG CAC TCC TCC TAT GTG CTG ACT CAG CCA CC
VL3B (配列番号 :56)	TTT GTG CAC TCC TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC
VL4 (配列番号 :57)	TTT GTG CAC TCC CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC
VL5 (配列番号 :58)	TTT GTG CAC TCC CAG GCT GTG CTC ACT CAG CCG TC
VL6 (配列番号 :59)	TTT GTG CAC TCC AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA
VL7 (配列番号 :60)	TTT GTG CAC TCC CAG GCT GTG GTG ACT CAG GAG CC
JL1 (配列番号 :61)	GGT AAG CTT GGT CCC AGT TCC GAA GAC
JL2/3 (配列番号 :62)	GGT AAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA T

10

20

30

40

【 0 2 7 1 】

【表2】 ヒト免疫グロブリン可変領域のPCR増幅のためのオリゴオリゴヌクレオチドプライマー。クローニングに使用した制限酵素の認識部位は太字で示した。プライマー配列は5' から3' へである。

VH1a (配列番号 :63)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
VH2a (配列番号 :64)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT GG
VH3a (配列番号 :65)	AATA TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
VH4a (配列番号 :66)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG
VH5a (配列番号 :67)	AATA TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT G
JH1a (配列番号 :68)	GA GAC GGT GAC CAG GGT GCC CTG GCC CCA
JH2a (配列番号 :69)	GA GAC GGT GAC CAG GGT GCC ACG GCC CCA
JH3a (配列番号 :70)	GA GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC CCA
JH4/5a (配列番号 :71)	GA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA
JH6a (配列番号 :72)	GA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA
VK1a (配列番号 :73)	CAGGA GTG CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
VK2a (配列番号 :74)	CAGGA GTG CAC TCC GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC

10

20

30

VK3a (配列番号 :75)	CAGGA GTG CAC TCC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC
VK4a (配列番号 :76)	CAGGA GTG CAC TCC GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC
VK5a (配列番号 :77)	CAGGA GTG CAC TCC GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC
VK6a (配列番号 :78)	CAGGA GTG CAC TCC GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC
JK1a (配列番号 :79)	TT GAT CTC GAG CTT GGT CCC TTG GCC GAA
JK2a (配列番号 :80)	TT GAT CTC GAG CTT GGT CCC CTG GCC AAA
JK3a (配列番号 :81)	TT GAT CTC GAG TTT GGT CCC AGG GCC GAA
JK4a (配列番号 :82)	TT GAT CTC GAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA
JK5a (配列番号 :83)	TT AAT CTC GAG TCG TGT CCC TTG GCC GAA
VL1a (配列番号 :84)	CAGAT GTG CAC TCC CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC
VL2a (配列番号 :85)	CAGAT GTG CAC TCC CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GC
VL3Aa (配列番号 :86)	CAGAT GTG CAC TCC TCC TAT GTG CTG ACT CAG CCA CC
VL3Ba (配列番号 :87)	CAGAT GTG CAC TCC TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC
VL4a (配列番号 :88)	CAGAT GTG CAC TCC CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC

10

20

30

40

VL5a (配列番号 :89)	CAGAT GTG CAC TCC CAG GCT GTG CTC ACT CAG CCG TC
VL6a (配列番号 :90)	CAGAT GTG CAC TCC AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA
VL7a (配列番号 :91)	CAGAT GTG CAC TCC CAG GCT GTG GTG ACT CAG GAG CC
JL1a (配列番号 :92)	AC GGT AAG CTT GGT CCC AGT TCC GAA GAC
JL2/3a (配列番号 :93)	AC GGT AAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA TAC

10

【0272】

実施例 2

特異的抗原に結合するヒト免疫グロブリンの選択戦略

20

いくつかの未同定の軽鎖と共に、定義された抗原に対する特異性を付与する、組換え重鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含むワクシニアウイルス発現ベクターを、下記のように選択し、かつ図1に示した。特異的免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の選択は、2相で達成される。第一に、ナイーブドナー又は免疫感作ドナーのいずれかに由来した抗体産生細胞由来の多様な重鎖のライブラリーを、三分子組換え（実施例5参照）により、実施例1に説明されたように構築された伝達性プラスミドpVHEを用い、ボックスウイルスベースのベクターにおいて構築し、かつ、免疫グロブリン軽鎖の同様に多様なライブラリーを、組換え遺伝子の発現がp7.5ワクシニアプロモーターにより調節されている、実施例1に説明されたように構築されたpVKE及びpVLEのようなプラスミドベクターにおいて構築する。ボックスウイルス構築物中の免疫グロブリン重鎖定常領域は、表面膜に免疫グロブリン受容体の発現を生じる膜貫通領域を維持するようにデザインする。宿主細胞、例えば初期B細胞性リンパ腫細胞を、ボックスウイルス重鎖ライブラリーにより、感染多重度1（MOI=1）で感染した。2時間後、感染した細胞を、軽鎖プラスミドライブラリーで、平均10個又はそれ以上の個別の軽鎖プラスミドが各細胞において取込まれかつ発現されることを可能にする条件下で、トランスフェクションされる。このプラスミド中の組換え遺伝子の発現は、ワクシニアウイルスプロモーターにより調節されるので、高レベルの組換え遺伝子産物が、ワクシニアウイルス感染細胞の細胞質において、核組込みを必要とせずに発現される。これらの条件下で、単独の細胞が、各感染細胞において特徴的H₂L₂構造の同じ重鎖に結合された異なる軽鎖を伴う複数の抗体を発現することができる。

30

40

【0273】

2.1 直接的抗原誘導型アポトーシス 初期B細胞性リンパ腫宿主細胞を、説明されたように、組換え重鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている組換えワクシニアウイルスで感染し、かつ組換え軽鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているプラスミドでトランスフェクションした。これらの宿主細胞は、自然発生的増殖阻害及びアポトーシス細胞死の誘導により、抗原特異的免疫グロブリン受容体の架橋に反応する。図1に概説したように、抗体分子の合成及び集成は、12時間又はそれ以上にわたって進行することが可能であり、この時点で、特異的免疫グロブリン受容体と架橋し、かつインジケータ細胞を発現している選択された抗体のアポトーシスを誘導するために、合成粒子又はポリマー上に、もしくは抗原を発現している細胞の表面上に、特異

50

的抗原が提示される。アポトーシスが誘導されている細胞から抽出された組換えワクシニアウイルスのゲノムは、望ましい特異性を付与する免疫グロブリン重鎖遺伝子をコードしているポリヌクレオチドについて濃縮される。

【0274】

2. 2 間接的抗原誘導型細胞死 図2A（下側）及び図2B（上側）に示したように、初期B細胞性リンパ腫宿主細胞を、アポトーシス誘導した遺伝子のプロモーター、ここではBA Xプロモーターが、外来細胞傷害性T細胞エピトープの発現を起動する構築物でトランスフェクションする。この宿主細胞は、抗原特異的免疫グロブリン受容体の架橋に反応して、CTLエピトープを発現し、かつこれらの架橋した細胞は、特異的CTLの追加時に溶解事象を受けると考えられる。次に説明された安定してトランスフェクションされた宿主細胞を、組換え重鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている組換えワクシニアウイルスで感染し、かつ組換え軽鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているプラスミドでトランスフェクションする。図1に概説したように、抗体分子の合成及び集成は、12時間又はそれ以上にわたって進行することができ、この時点で、特異的免疫グロブリン受容体と架橋するために、合成粒子又はポリマー上に、もしくは抗原を発現している細胞の表面上に、特異的抗原が提示される。エピトープ-特異的CTLの追加は、表面免疫グロブリン分子が架橋されているこれらの細胞に溶解事象をもたらし、その結果間接的に細胞死を誘導した。

【0275】

2. 3 直接的抗原誘導型細胞死 図2A（上側）及び図2B（下側）に示したように、初期B細胞性リンパ腫宿主細胞を、アポトーシス誘導した遺伝子のプロモーター、ここではBA Xプロモーターが、ジフテリア毒素の細胞毒性Aサブユニットの発現を起動する構築物でトランスフェクションする。この宿主細胞は、抗原特異的免疫グロブリン受容体の架橋に反応して、毒素サブユニットを発現し、かつこれらの架橋した細胞は、細胞死に屈服すると考えられる。次に説明されたように、安定してトランスフェクションされた宿主細胞を、組換え重鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしている組換えワクシニアウイルスで感染し、かつ組換え軽鎖免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしているプラスミドでトランスフェクションする。図1に概説したように、抗体分子の合成及び集成は、12時間又はそれ以上にわたって進行することができ、この時点で、特異的免疫グロブリン受容体と架橋するために、合成粒子又はポリマー上に、もしくは抗原を発現している細胞の表面上に、特異的抗原が提示される。表面免疫グロブリン分子が架橋されているこれらの細胞は、迅速かつ直接的に細胞死に屈服する。

【0276】

2. 4 考察 これらの組換え遺伝子の発現が、表面Ig受容体の架橋によってアップレギュレーションされる理由は、これら2種の各構築物の発現が、Ig架橋後にその発現が初期B細胞性リンパ腫細胞において天然にアップレギュレーションされるプロモーターにより、調節されるからである。これは、BA Xプロモーターの使用により例証される。プロアポトーシス性遺伝子の例であるBA Xは、初期B細胞性リンパ腫細胞において通常、これらの条件下でアップレギュレーションされる。他の遺伝子の調節領域（「プロモーター」）は、同様に良く又はより良く利用することができる。このような遺伝子は、例えば膜Igの架橋前又は後にマイクロアレイ上の初期B細胞性リンパ腫細胞の遺伝子発現プロファイルを比較することにより同定される。

【0277】

細胞は、ジフテリアA鎖（dipA）の発現につながる構築物によりトランスフェクションされ、Ig架橋のみにより誘導されるものよりもより迅速なアポトーシスを受けた。更により迅速な細胞死が、その細胞において発現された未変性のMHC分子に結合し、かつその発現がBA X又はBA X-様プロモーターにより調節されるミニ遺伝子によりコードされているようないくつかの標的ペプチドに特異的な細胞傷害性T細胞の追加により誘導された。加えて、初期B細胞性リンパ腫細胞以外の宿主細胞を、同様に操作し、初期B細胞性リンパ腫細胞株において抗原架橋時に生じるプログラムされたアポトーシスとは無関

係に、表面免疫グロブリン分子の抗原架橋時の細胞死を直接的又は間接的のいずれかで誘導する遺伝子を発現する。

【0278】

前記選択プロセスにおいて、様々な基質を使用し、抗原を提示し、かつ特異的膜免疫グロブリン受容体を架橋する。これらは、磁気ビーズ、タンパク質被覆した組織培養プレート、及び標的抗原をコードしている遺伝子でトランスフェクションされた細胞を含むが、これらに限定されるものではない。標的抗原の効率的発現のためにトランスフェクションすることができる細胞の例は、L細胞及びNIH 3T3細胞を含むが、これらに限定されるものではない。しかしトランスフェクションされた細胞を使用し、組換え抗原を発現及び提示する場合、トランスフェクションされない細胞の膜抗原に反応性の抗体を発現する
10
いずれかの宿主細胞の免疫グロブリン発現している宿主細胞集団を最初に枯渇することが必要である。このような枯渇は、固形基質に結合したトランスフェクションされない細胞への吸収の1回又は複数回のラウンドで実現されうる。その後、特異的組換え抗体を発現している細胞の陽性選択のためにトランスフェクタントを発現している抗原を使用することが可能であると考えられる。好ましい態様において、陰性及び陽性選択の交互のサイクルは、望ましい濃縮を達成するのに必要なほど頻繁に繰り返される。

【0279】

陽性選択段階の一例において、抗体を発現しているBリンパ腫細胞の、B細胞特異的抗CD19及び／又は抗CD20抗体が結合した固形基質への接着が可能になる。溶解事象を受ける接着インジケータ細胞は、ウイルスの免疫グロブリン重鎖組換え体を含むそれらの細胞質内容物の、培養液への放出を誘導する。培養液において回収された細胞及び細胞断片から収集された組換えウイルスは、未同定の軽鎖のように一部が結合された場合に、抗原の選択のための特異性を付与する免疫グロブリン重鎖をコードしているそれらの組換えウイルスについて濃縮される。この組換えウイルスの濃縮された集団により新たに感染され、及び引き続き多様な軽鎖をコードしている未選択プラスミドの同じ最初の集団によりトランスフェクションされた細胞における抗原が起動した選択の追加サイクルは、所望の重鎖の更なる濃縮につながる。この選択プロセスの複数の繰り返しは、いくつかの未同定の軽鎖と結合された限定された抗原に対する最適な特異性を有する少数の重鎖を単離する。
20

【0280】

先に選択された重鎖との結合において所望の特異性を付与する軽鎖を選択するために、前述のような全体の選択プロセスが、ワクシニアベースのベクターにおける宿主細胞の多様な軽鎖組換え体ライブラリーによるMOI=1での感染、それに続く先に選択された重鎖のひとつに対するプラスミド組換え体によるトランスフェクションより繰り返される。その重鎖にとって最適な軽鎖パートナーは、前述のような抗原起動した選択の複数回のサイクルの後に単離される。
30

【0281】

別の好ましい態様において、同様の戦略が、特異的抗体をその表面膜に発現している細胞に付与された結合特性を探索することにより履行される。インジケータ細胞として受容体の架橋に反応してアポトーシスを受ける初期B細胞性リンパ腫を利用する代わりに、図5に図示したように、この戦略は、所望の免疫グロブリン特異性を発現している宿主細胞が、抗原が結合された合成粒子又はポリマーとの、もしくはトランスフェクションされた細胞を発現している特異的抗原の表面への結合により選択されることを可能にする。この場合、インジケータ細胞は、膜免疫グロブリン受容体の架橋に対するアポトーシス反応よりもむしろ、膜免疫グロブリン受容体の高レベル発現能について選択される。好ましい細胞株は、免疫グロブリン陰性形質細胞腫を含む。特異性、バックグラウンド及び選択プロセスの効率に関する他の問題点は、先に説明したように処理される。
40

【0282】

実施例 3

免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の 10^9 個の組合せライブラリーからの定義された特異性を
50

伴う抗体の選択

ライブラリーから選択することができる特異的抗体の親和性は、そのライブラリーのサイズの関数である。一般に、ライブラリーにおいて提示された重鎖及び軽鎖の組合せが大きくなると、高親和性抗体が存在しかつ選択され得る見込みが増大する。ファージディスプレイ法を用いる先行する研究は、多くの抗原について、 10^9 個の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖組合せを含むライブラリーは、比較的高親和性の特異的抗体を選択するのに十分なサイズであることを示唆している。原則として、各々独自の重鎖及び独自の軽鎖、又は重鎖及び軽鎖の可変領域を含む組合せ部位を伴う単鎖構築物を発現している 10^9 個の組換え体を伴うライブラリーを構築することが可能である。しかし最も好ましい方法は、全て可能性のある 10^9 個の組合せにおいて同時発現することができる、 10^5 個の免疫グロブリン重鎖及び 10^4 個の免疫グロブリン軽鎖のふたつのライブラリーの構築により、この数の抗体組合せを作成することである。この例において、より大きい多様性が重鎖プールにおいて提示されるが、その理由は、重鎖は、特異的抗原結合部位に対し結合した軽鎖よりもより大きい寄与をなすとみなされることが多いからである。

【0283】

3. 1 重鎖遺伝子 力価約 10^6 でのワクシニア組換え体のライブラリーは、100名の骨髓ドナーのプールに由来したRNAから先に説明された方法（実施例1）により合成された最低 10^5 個の重鎖cDNA伝達性プラスミド組換え体から構築した。後述のように、このライブラリーは、少なくとも 10^9 個の重鎖組換え体の力価まで更に拡張されなければならない。ライブラリーを拡張する好ましい方法は、およそ 5×10^4 個のBSC 1細胞のマイクロ培養物を、 10^3 個のワクシニア重鎖組換え体の個別のプールで感染することである。典型的には、ウイルス力価の1,000倍より多い拡張が、48時間の感染後に得られる。複数の個別のプールにおけるウイルス力価の拡張は、競合するサブセットの比較的迅速な増殖のために、組換えのサブセットが失われるリスクを軽減する。

【0284】

3. 2 軽鎖遺伝子 力価およそ 10^5 のワクシニア組換え体のライブラリーは、実施例1に説明されたような、骨髓ドナーのプール由来のRNAから合成された 10^4 個の免疫グロブリン軽鎖cDNA伝達性プラスミド組換え体から構築される。後述のような重鎖選択の複数回のサイクルを使用するために、このライブラリーは更に、力価 $10^{10} \sim 10^{11}$ 個の軽鎖組換え体にまで拡張されなければならない。ライブラリーを拡張する好ましい方法は、およそ 5×10^4 個のBSC 1細胞の100種マイクロ培養物を、 10^3 個のワクシニア軽鎖組換え体の個別のプールで感染することである。100種の各感染された培養物から回収されたウイルス組換え体は、個別のプールとして力価 $10^8 \sim 10^9$ 個のウイルス組換え体まで更に拡張される。これらの軽鎖プールをL1からL100と標識することは都合がよい。

【0285】

3. 3 免疫グロブリン重鎖組換え体の選択 非形成性 (non-producing) 骨髓腫、好ましくはSp2/0、又は初期B細胞性リンパ腫、好ましくはCH33の 10^7 個の細胞の100種の培養物を、生存可能なワクシニア重鎖組換え体によりMOI=1で感染し、及び同時にソラレン (4'-アミノメチルトリオキソサレン) で失活されたワクシニア軽鎖組換え体によりMOI=1~10で感染した (下記参照)。ソラレン失活に関しては、細胞非含有ウイルスの $10^8 \sim 10^9$ pfu/mlを、ソラレン $10 \mu\text{g/ml}$ で10分間 25°C で処理し、その後長波長 (365-nm) UV光に2分間曝露した (Tsung, K., J. H. Yim, W. Marti, R. M. L. Buller, 及びJ. A. Norton, J. Virol., 70:165-171 (1996))。ソラレン処理したウイルスは、複製することはできないが、組換え遺伝子を含む初期ウイルス遺伝子の、初期ウイルスプロモーターの制御下、後期ウイルスプロモーターの非制御下での発現は可能である。これらの条件下で、ソラレン処理した組換え体から合成された軽鎖は、平均して各感染細胞において発現される単独の重鎖との結合において、免疫グロブリン分子に集成されうる。

【0286】

MOI = 1 又は MOI = 10 でのソラレンで失活された軽鎖組換え体による感染の選択は、MOI = 1 で高い及び MOI = 10 で低い（複数の軽鎖の希釈のため）であるような特定の H + L 鎖組合せの単独の陽性細胞における相対濃度に影響を及ぼすと考えられる。細胞表面での特異的免疫グロブリンの低濃度及びそれに対応する低下された密度は、関心のあるリガンドについて比較的高い親和性を伴う抗体を選択すると予想される。他方で、高濃度の特異的受容体は、免疫グロブリン受容体を介した結合又はシグナル伝達を促進すると予想される。

【0287】

実施例 2 に説明された結合又はシグナル伝達による抗原特異的選択の第一サイクル後に、濃縮された組換えウイルス集団が、各培養物から、この最初の選択の間、及びウイルスの非特異的結合又は自然発生的放出のバックグラウンドレベルに左右され、インプットしたウイルス力価の 1 % ~ 10 % であるような力価で、回収される。当初の軽鎖組換えプール L1 から L100 からのソラレン処理したウイルスを受け取る第一の選択サイクルにおいて培養物から回収された重鎖組換え体プールを、各々、H1a から H100a まで標識することが都合がよい。

【0288】

第一のサイクルと同じ条件下での第二の選択サイクルの実行のためには、回収した重鎖組換え体の力価を 10 ~ 100 倍拡張することが再度必要である。第二の選択サイクルについて、非形成性骨髄腫又は初期 B 細胞性リンパ腫は、生存可能なウイルスの重鎖組換え体及びソラレン処理した軽鎖組換え体により再度感染され、その結果例えば、 10^7 個の細胞の同じ培養物が、プール H37a において回収された重鎖組換え体及び H37a 選択に使用された当初の L37 プールからのソラレン処理した軽鎖組換え体で感染される。第二の選択サイクルにおいて H37a プールから回収された重鎖組換え体は、H37b などに都合良くラベル付けされる。

【0289】

第二の選択サイクル後、特異的ウイルスの組換え体は、恐らく一般に、最初のウイルス集団に対して 10 倍以上に濃縮されると考えられる。この場合特異的クローンは、たとえ 10 倍低い力価であっても恐らく良く提示されているので、第一及び第二のサイクルと同じ条件下で第三の選択サイクルが行われる必要はない。従って第三の選択サイクルに関して、わずかに 10^6 個の非形成性骨髄腫又は初期 B 細胞性リンパ腫の 100 個の培養物が、再度生存可能なウイルスの重鎖組換え体及びコグネイトプールからのソラレン処理した軽鎖組換え体により感染される。別の感染細胞数の 10 分の 1 の低下は、第五の選択サイクル後に効果がある。

【0290】

3. 4 抗原特異的重鎖組換え体の同定

(a) いずれか所定の選択サイクル後に、当初の L37 プールの軽鎖との結合における抗原特異性を試験するために、重鎖プールから 10 種の個別のウイルス p f u を採取することにより、抗原特異的重鎖が、特定のプール、例えば H37f において、10 % 又はそれ以上のレベル濃縮されたかどうかを決定することが可能である。軽鎖集団は、100 種の個別のプールに分散された 10^4 個の多様な cDNA を含むので、平均的プールは、およそ 10^2 種の異なる軽鎖を有する。例え選択された重鎖が、入手可能な軽鎖プール中の単独型の軽鎖との結合においてのみ、所望の抗原特異性を付与するとしても、選択された重鎖組換え体及びランダム軽鎖プールにより MOI = 1 で感染された細胞の 1 % は、所望の特異性を発現すると考えられる。この頻度は、細胞が軽鎖により MOI = 10 で感染された場合には、平均 10 % に増大することができる。特異性を確認する好ましい方法は、BAX のプロモーター、又は膜受容体架橋の結果として活性化される別の CH33 遺伝子により起動される容易に検出されるレポーター構築物、例えばルシフェラーゼによりトランスフェクションされた CH33 初期 B 細胞性リンパ腫株の、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のプールによる感染である。プラーク精製した重鎖組換え体及び関連した軽鎖プールによ

るこのトランスフェクタントの感染は、そのプールにおいて提示された100個又はそれ以上のいずれかの軽鎖との結合において選択された重鎖が所望の抗原特異性を付与する場合に、容易に検出されるシグナルを生じうる。感染細胞の免疫グロブリン受容体を介した特異的結合又は特異的シグナル伝達により選択されるかどうかの重鎖の分析に、これと同じ方法が適用可能であることに留意されたい。

【0291】

(b) 最も確約できる抗原特異的重鎖を同定する別の方法は、選択された集団において最も高度に提示されたものに関するスクリーニングである。挿入断片は、挿入部位にフランキングしたベクター特異的プライマーを用いるPCR増幅により単離することができ、かつこれらの挿入断片は、配列決定し、観察された配列の頻度を決定することができる。しかしこの場合、依然後述のように関連した軽鎖を同定することが必要である。

【0292】

3. 5 免疫グロブリン軽鎖組換え体の選択 一旦抗原特異的重鎖が単離されたならば、その重鎖との結合において抗原特異性を付与する軽鎖は、3. 4 (a) に説明されたような重鎖の選択に使用されるプールから単離することができる。あるいは、同じ重鎖との結合において更に親和性を増強することができるようなより大きいライブラリーから更に別の軽鎖を選択することが可能であることができる。この目的のために、ワクシニア組換え体のライブラリーは、およそ 10^6 の力価で、先に説明した方法(実施例1)で合成された最小 10^5 免疫グロブリン軽鎖cDNA伝達性プラスミド組換え体から構築される。3. 3に説明した手順は入れ替えられ、その結果ここでは、非形成性骨髄腫又は初期B細胞性リンパ腫は生存可能なウイルス軽鎖組換え体によりMOI=1で、及び単独の選択されたソラレン処理した特異的重鎖組換え体で感染される。より高親和性の免疫グロブリンの選択を促進するために、軽鎖によるMOI=10での感染により、各特異的H+L鎖対の濃度を希釈することが好ましい。

【0293】

3. 6 単一の免疫グロブリン軽鎖の存在下での免疫グロブリン重鎖組換え体の選択 特定の抗体特異性に寄与する免疫グロブリン重鎖の選択は、候補軽鎖が既に同定されている場合には、簡単である。これは、例えばマウスのモノクローナル抗体が先に選択された場合に該当する。マウスの軽鎖可変領域を、ヒト軽鎖定常領域に移植し、ヒト重鎖との対形成を最適化することができ、このプロセスは、ファージディスプレイ法を利用し、「方向付けられた選択(Guided Selection)」(Jespersen, L. S., A. Roberts, S.M. Mahler, G. Winter, H. R. 及びHoo genboom, Bio/Technology, 12: 899-903 (1994); Fignini, M., L. Obici, D. Mezzanzanica, A. Griffiths, M. I. Colnaghi, G. Winters, 及びS. Canevari, Cancer Res., 58: 991-996 (1998))として、これまでに別所に説明されている。この分子マッチ法は、原則として、例え更にヒト可変遺伝子フレームワーク領域がマウスの軽鎖可変領域配列へ移植されたとしても、採用することができる(Rader, C., D. A. Cheresch, 及びC. F. Barbas III, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 8910-8915)。この修飾された抗原特異的重鎖の対形成のために選択されたヒト重鎖を、3. 5に説明されたようにより多様なプールから最適なヒト軽鎖の選択の基礎とすることができる。

【0294】

実施例4

アデノウイルス、ヘルペスウイルス、又はレトロウイルスベクターにおいて構築されたcDNAライブラリーからの特異的ヒト抗体の選択

4. 1 ヘルペスウイルス 組換え体の感染性単純ヘルペスウイルスアンプリコンのストックからヘルパーウイルス非含有ストックを作成する方法が説明されている(T. A. Stavropoulos, C. A. Strathdee, J. Virology, 7

10

20

30

40

50

2 : 7 1 3 7 - 7 1 4 3 (1 9 9 8)) 。 プラスミドアンプリコンベクターにおいて構築された単鎖断片を含む、ヒト免疫グロブリン重鎖及び／又は軽鎖遺伝子又はそれらの断片の c D N A ライブラリーを、本方法を用い感染性アンプリコン粒子のライブラリーにパッケージングすることは可能である。免疫グロブリン重鎖遺伝子を用いて構築されたアンプリコンライブラリー、及び免疫グロブリン軽鎖遺伝子を用いて構築された別のアンプリコンライブラリーは、非形成性骨髓腫細胞株の同時感染に使用することができると考えられる。望ましい特異性を伴う免疫グロブリン遺伝子組合せを発現している骨髓腫細胞は、関心のある抗原との結合の選択により濃縮することができる。ヘルペスアンプリコンは、感染細胞における安定した導入遺伝子発現が可能である。第一のサイクルにおける結合について選択された細胞は、それらの免疫グロブリン遺伝子組合せを保持し続け、かつこの特異性を伴う抗体を安定して発現しうる。これは、望ましい特異性を伴う免疫グロブリン遺伝子が単離されるまで、選択サイクルを繰り返すことを可能にする。結果的に細胞死を生じる選択戦略も試みることができる。これらの死滅した選択された細胞から回収されたアンプリコンベクターは、新鮮な標的細胞の感染に使用することはできず、その理由は、ヘルパーウイルスの非存在下において、アンプリコンは、複製欠損であり、かつ感染型にパッケージングされないからである。アンプリコンベクターは、プラスミド複製起点及び抗生物質耐性遺伝子を含む。これは、選択された細胞から細菌への精製された D N A の形質転換により、選択されたアンプリコンベクターを回復することを可能にする。適当な抗生物質による選択は、アンプリコンベクターで形質転換された細菌細胞の単離を可能にすると考えられる。例えばアンピシリン及びカナマイシンなどの、重鎖及び軽鎖アンプリコンベクターでの異なる抗生物質耐性遺伝子の使用は、選択された細胞からの同一集団からの重鎖及び軽鎖遺伝子の個別の選択を可能にすると考えられる。アンプリコンプラスミド D N A は、この細菌から抽出することができ、かつアンプリコン D N A 及びパッケージング欠損 H S V ゲノム D N A のパッケージング細胞への同時トランスフェクションにより感染性ウイルス粒子へパッケージングすることができる。その後感染性アンプリコン粒子は、収集され、別の選択ラウンドのための標的細胞の新鮮な集団の感染に使用され得る。

【 0 2 9 5 】

4 . 2 アデノウイルス 組換えアデノウイルスの作出法は、説明されている (S . M i y a k e , M . M a k i m u r a , Y . K a n e g a e , S . H a r a d a , Y . S a t o , K . T a k a m o r i , C . T o k u d a , I . S a i t o , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 3 : 1 3 2 0 - 1 3 2 4 (1 9 9 6) ; T . C . H e , S . Z h o u , L . T . D a C o s t a , J . Y u , K . W . K i n z l e r , B . V o l g e l s t e i n , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 5 : 2 5 0 9 - 2 5 1 4 (1 9 9 8)) 。これらの方法のいずれかを用い、c D N A ライブラリーをアデノウイルスベクターにおいて構築することは可能である。c D N A のアデノウイルスの E 3 又は E 4 領域への挿入は、複製コンピテントな組換えウイルスを生じる。このライブラリーは、三分子組換えにより構築されたワクシニア c D N A ライブラリーと同様の用途に使用することができる。例えば、重鎖 c D N A ライブラリーは、アデノウイルスの E 3 又は E 4 領域へ挿入することができる。これは、複製コンピテントな重鎖ライブラリーを生じる。軽鎖 c D N A ライブラリーは、アデノウイルスの E 1 遺伝子へ挿入され、複製欠損ライブラリーを生じることができる。この複製欠損軽鎖ライブラリーは、2 9 3 細胞のような、アデノウイルス E 1 をトランスに提供する細胞の感染により増幅することができる。これらの 2 種のライブラリーを、複製コンピテントなワクシニア重鎖ライブラリー及びソラレン失活したワクシニア軽鎖ライブラリーを使用することが説明された方法と同様の選択戦略に使用することができる。

【 0 2 9 6 】

4 . 3 ワクシニアウイルスの利点 ワクシニアウイルスには、c D N A ライブラリーの構築に関して、ヘルペスウイルス又はアデノウイルスに勝るいくつかの利点がある。第一に、ワクシニアウイルスは、宿主細胞の細胞質において複製するのに対し、H S V 及びアデノウイルスは核において複製する。比較的高頻度の c D N A 組換え伝達性プラスミドは

、H S V又はアデノウイルスにおけるパッケージング／組換えのための核への移行を可能にするよりも、ワクシニアによる細胞質における組換えに利用可能である。第二に、ワクシニアウイルスは、配列に無関係の方法でプラスミドを複製することができるが、アデノウイルス又はヘルペスウイルスはできない (M. Merchlinsky, B. Moss, Cancer Cell, 6: 87-93 (1988))。cDNA組換え体伝達性プラスミドのワクシニア複製は、作成される組換えウイルスを比較的高頻度で生じることができる。本発明者らは、ヘルペス又はアデノウイルスベクターにおけるcDNAライブラリー構築の可能性を説明しているが、これらのウイルスベクターのいずれかにおけるcDNAライブラリーの構築のためのこれらの方法の使用は報告されていないことは強調しておかなければならない。

10

【0297】

4. 4 レトロウイルス 複製欠損レトロウイルスベクターにおけるcDNAライブラリーの構築は、説明されている (T. Kitamura, M. Onishi, S. Kinoshita, A. Shibuya, A. Miyajima, 及び G. P. Nolan, PNAS, 92: 9146-9150 (1995); I. Whitehead, H. Kirk, 及び R. Kay, Molecular and Cellular Biology, 15: 704-710 (1995))。レトロウイルスベクターは、標的細胞の感染時に組込まれ、かつ標的細胞を効率的に形質導入するそれらの能力のため、及び安定した導入遺伝子の発現を誘導する能力のために、広範な用途を持つようになった。免疫グロブリン重鎖遺伝子を用いて構築されたレトロウイルスcDNAライブラリー、及び免疫グロブリン軽鎖遺伝子を用いて構築された別のレトロウイルスライブラリーを使用し、非形成性骨髄腫細胞株を同時感染することができる。望ましい特異性を伴う免疫グロブリン遺伝子組合せを発現している骨髄腫細胞は、関心のある抗原への結合について選択することにより、濃縮することができる。第一のサイクルにおいて結合について選択された細胞は、それらの免疫グロブリン遺伝子組合せを保持し、かつこの特異性を伴う免疫グロブリンを安定して発現すると考えられる。これは、望ましい特異性を伴う免疫グロブリン遺伝子が単離されるまでの、選択サイクルの繰り返しを可能にする。

20

【0298】

実施例 5

三分子組換え

30

5. 1 発現ライブラリーの作成 この実施例は、100%に近い組換えワクシニアウイルスを作成する、修飾されたワクシニアウイルスベクター及び関連した伝達性プラスミドを使用し、かつ初回に、ワクシニアウイルスにおける代表的DNAライブラリーの効率的構築を可能にする三分子組換え法を説明している。三分子組換え法は図6に例示している。

【0299】

5. 2 ベクターの構築 先に説明したワクシニアウイルス伝達性プラスミドpJ/Kは、インフレーションにNotI部位を含むワクシニアウイルスチミジンキナーゼ遺伝子を伴うpUC13由来のプラスミドであり (Merchlinsky, M. ら, Virology, 190: 522-526)、これは強力なワクシニアウイルスプロモーター、それに続くNotI及びApaI制限部位を取込むように更に修飾されている。ふたつの異なるベクターp7.5/tk及びpEL/tkは、各々、7.5Kワクシニアウイルスプロモーター又は強力な合成初期／後期 (E/L) プロモーターを含む (図7)。ApaI部位には、ATGコドンを含む強力な翻訳開始配列が先行している。この修飾は、ワクシニアウイルスチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子内に導入され、その結果これはウイルスのtk遺伝子の調節配列及びコード配列にフランキングしていた。これらの2種の新規プラスミドベクター内のtk遺伝子内の修飾は、フランキングtk配列中の相同的組換えにより、vNotI⁻ベクター由来のワクシニアウイルスWR株のゲノムへ伝達され、新たなウイルスベクターv7.5/tk及びvEL/tkを作成した。重要なことに、これらのウイルスベクターのNotI及びApaI制限エンドヌクレアーゼ消化後に、ふたつの大き

40

50

いウイルスのDNA断片が単離され、各々ワクシニア tk 遺伝子の個別の非同相セグメントを含み、かつ一緒に感染性ウイルス粒子の集成に必要な全ての遺伝子を含んでいる。これらのベクターの構築及び特徴決定並びにワクシニアウイルスにおけるDNA断片の直接ライゲーションに関するそれらの代替使用に関する更なる詳細は、実施例1に説明されている。

【0300】

5.3 ワクシニアウイルス組換え体の作出頻度の増大 ワクシニアウイルスにおける組換え体の作成に関する常法は、組換えワクシニア伝達性プラスミドとウイルスゲノムの間の相同的組換えを活用している。表3は、組換え伝達性プラスミドのワクシニアウイルス感染細胞へのトランスフェクション後の相同的組換えの頻度が、標準条件においてアッセイされる、モデル実験の結果を示している。機能アッセイを促進するために、H-2K^bと結合してオボアルブミンの免疫優性257-264ペプチドエピトープをコードしているミニ遺伝子を、伝達性プラスミド tk 遺伝子のNotI部位へ挿入した。相同的組換えの結果、組換えウイルスにおいて破壊された tk 遺伝子が、野生型ウイルスの tk+ 遺伝子と置換された。tk-ウイルスにより感染された tk-ヒト143B細胞は、野生型 tk+ウイルスにより感染された細胞とは対照的に、BrdUの毒性作用に対し抵抗性であるので、これは、組換えのマーカーとして利用される。組換えウイルスは、125mM BrdUの存在下で培養された143B細胞におけるウイルスのpfuによりスコア化することができる。

【0301】

この様式による組換え頻度は、0.1%の桁である(表3)。

【表3】

表3: 標準相同的組換えによる組換え体ワクシニアウイルスの作成				
ウイルス*	DNA	力価w/o BrdU	力価w/ BrdU	% 組換え体**
ワクシニア	---	4.6 x 10 ⁷	3.0 x 10 ³	0.006
ワクシニア	30 ng pE/Lova	3.7 x 10 ⁷	3.2 x 10 ⁴	0.086
ワクシニア	300 ng pE/Lova	2.7 x 10 ⁷	1.5 x 10 ⁴	0.056

*ワクシニアウイルス株 vNotI

**%組換え体 = (BrdUを伴う力価 / BrdUを伴わない力価) x 100

【0302】

この組換え頻度は、ワクシニアベクターにおけるcDNAライブラリーの効率的構築をもたらすには余りにも低い。引き続きのふたつの手順を用い、頻度が増大したワクシニアウイルス組換え体を作成した。

【0303】

(1) プラスミド導入ベクターのワクシニアウイルス感染細胞へのトランスフェクション後の相同的組換えにより作成されたウイルス組換え体の頻度を制限するひとつの要因は、ウイルス感染が高効率であるのに対して、プラスミドDNAトランスフェクションはかなり非効率であることである。結果として、多くの感染細胞は、組換えプラスミドを取込まず、従って野生型ウイルスのみを産生することが可能である。この組換え体効率の希釈を低下するために、裸のウイルスDNA及び組換えプラスミドDNAの混合物を、鶏痘ウイルス(FPV)感染した哺乳類細胞にトランスフェクションした。先に別所で説明されたように(Scheifflinger, F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9977-9981 (1992))、FPVは、哺乳類細胞において複製しないが、非感染性裸のワクシニアDNAでトランスフェクションされた細胞における成熟ワクシニアウイルス粒子のパッケージングに必要な必須のヘルパー機能を提供す

る。この相同的組換え技術の修飾は、単独で、ウイルス組換えの体頻度をおよそ35倍し、3.5%に増大する(表4)。

【0304】

【表4】 修飾された相同的組換えによる組換えワクシニアウイルスの作成

ウイルス*	DNA	力価 w/o BrdU	力価 w/ BrdU	% 組換え体**
PFV	なし	0	0	0
なし	ワクシニアWR	0	0	0
PFV	ワクシニアWR	8.9×10^6	2.0×10^2	0.002
PFV	ワクシニアWR + pE/Lova (1:1)	5.3×10^6	1.2×10^5	2.264
PFV	ワクシニアWR + pE/Lova (1:10)	8.4×10^5	3.0×10^4	3.571

*%組換え体 = (BrdUを伴う力価 / BrdUを伴わない力価) $\times 100$

【0305】

表4、BSC1細胞の集密な単層 (5×10^5 細胞/ウェル) を、鶏痘ウイルス株HP1のMOI = 1で感染した。2時間後、上清を取除き、細胞を2X Opti-Mem I培地で洗浄し、かつリポフェクタミンを用い、600ng ワクシニア株WRゲノムDNAと単独で、又はモル比1:1もしくは1:10 (ワクシニア: プラスミド) のプラスミドpE/Lovaと共にのいずれかで使用し、トランスフェクションした。このプラスミドは、オボアルブミンcDNAの断片を含み、これは、マウスのクラスI MHC分子K^bに高親和性で結合することがわかっているSILNFELエピトープをコードしている。このミニ遺伝子の発現は、強力な合成初期/後期ワクシニアプロモーターにより制御される。この挿入断片は、ワクシニアtk DNAにフランキングされる。3日後、細胞を収集し、ウイルスをドライアイスイソプロパノール/37℃水浴における凍結/解凍の3サイクルにより抽出した。粗ウイルスストックを、BrdUを伴う又は伴わずにヒトTK-143B細胞についてブランクアッセイにより力価滴定した。

【0306】

(2) ウイルス組換え体頻度の更なる顕著な増加は、FPV感染細胞の、組換えプラスミド、並びにNot I及びApa I制限エンドヌクレアーゼによる消化により作成したワクシニアウイルスv7.5/tk DNAのおよそ80kb及び100kbのふたつの大きい断片との混合物によるトランスフェクションにより得られた。Not I及びApa I部位は、tk遺伝子に導入されており、これらの大きいワクシニアDNAアームは各々、tk遺伝子断片を含んでいる。これらふたつのtk遺伝子断片の間に相同性はないので、これらふたつのワクシニアアームが結合される唯一の方法は、組換え伝達性プラスミド中の挿入断片にフランキングしている相同なtk配列を介した橋かけである。表5の結果は、感染tk-細胞のBrdU耐性により決定されるように、三重にトランスフェクションされた細胞において産生された感染性ワクシニアウイルスの>99%が、DNA挿入断片についての組換え体であることを示している。

【0307】

【表5】 三分子組換えを用いる100%組換えワクシニアウイルスの作成

ウイルス	DNA	力価w/o BrdU	力価 w/ BrdU	% 組換え体*
PFV	未切断のv7.5/tk	2.5×10^6	6.0×10^3	0.24
PFV	NotI/ApaI v7.5/tkアーム	2.0×10^2	0	0
PFV	NotI/ApaI v7.5/tkアーム + pE/Lova (1:1)	6.8×10^4	7.4×10^4	100

*%組換え体 = (BrdUを伴う力価 / BrdUを伴わない力価) $\times 100$

10

【0308】

表5 ワクシニア株V7.5/tk ($1.2 \mu\text{g}$)からのゲノムDNAを、ApaI及びNotI制限エンドヌクレアーゼで消化した。消化したDNAは、半分に分割された。これらのプールのひとつを、1:1 (ワクシニア:プラスミド)のモル比でpE/Lovaと混合した。このプラスミドは、オボアルブミンcDNAの断片を含み、これは、マウスのクラスI MHC分子K^bに高親和性で結合することがわかっているSILNFEKLエペトープをコードしている。このミニ遺伝子の発現は、強力な合成初期/後期ワクシニアプロモーターにより制御される。この挿入断片は、ワクシニアtk DNAにフランキンゲされる。DNAを、リポフェクタミンを用い、先にMOI=1.0のFPVで2時間感染したBSC1細胞の集密な単層 (5×10^5 細胞/ウェル)にトランスフェクションした。ひとつの試料は、600 ngの未処理のゲノムV7.5/tk DNAでトランスフェクションした。3日後、細胞を収集し、ウイルスをドライアイスイソプロパノール/37℃水浴における凍結/解凍の3サイクルにより抽出した。粗ウイルスストックを、BrdU選択を伴う又は伴わずにヒトTK-143B細胞についてブランクアッセイした。

20

【0309】

5.4 ワクシニアウイルスにおける代表的cDNAライブラリーの構築 cDNAライブラリーを、ワクシニアベクターにおいて構築し、公知の細胞mRNA配列の代表的発現を明らかにした。感染細胞における組換え発現効率を増大するために、追加の修飾を、p7.5/tk伝達性プラスミド及びv7.5/tkウイルスベクターに導入した。これらは、3種の異なるリーディングフレーム内の翻訳開始部位並びに翻訳及び転写の両停止シグナルの導入、更にはDNA挿入のための追加の制限部位の導入を含む。

30

【0310】

第一に、p7.5/tkのHindIII断片 (ワクシニアtk遺伝子)を、このプラスミドからpBSファージミド (Stratagene社)のHindIII部位へサブクロニングし、pBS.Vtkを作出した。

【0311】

第二に、pBS.Vtkの当初のマルチクロニング部位の一部を、SmaI及びPstIによるプラスミドの消化により除去し、マングマメヌクレアーゼで処理し、それ自身戻しライゲーションし、pBS.Vtk.MCS-を作出した。この処理は、pBS.Vtkから独自のSmaI、BamHI、SalI、及びPstI部位を除去した。

40

【0312】

第三に、この時点の目的は、pBS.Vtk.MCS-において新規マルチクロニング部位を7.5kプロモーターの下流に導入することであった。新たなマルチクロニング部位は、4種の異なる上流プライマー及び共通の下流プライマーを用い、PCRにより作成した。まとめると、これら4種のPCR産物は、ATG開始コドンを含まないか、又はATG開始コドンを3種の各可能性のあるリーディングフレーム内に含んだ。加えて、各PCR産物は、その3'末端に、3種全てのリーディングフレーム内に翻訳停止コドン、及びワクシニアウイルス転写二重停止シグナルを含んだ。これらの4種のPCR産物は、pBS.Vtk.MCS-のNotI/ApaI部位に個別にライゲーションし、4種のベクター、p7.5/ATG0/tk、p7.5/ATG1/tk、p7.5/ATG2

50

／t k、及び p 7． 5／A T G 3／t k を作出し、図 1 2 にそれらの p 7． 5／t k ベクターに対する配列修飾を示した。各ベクターは、DNA 挿入断片のクローニングのために、独自の B a m H I、S m a I、P s t I、及び S a l I 部位を含み、これはそれら自身の内因性翻訳開始部位（ベクター p 7． 5／A T G 0／t k 内）を使用するか、もしくは 3 種の可能性のあるリーディングフレームのいずれかひとつのベクター翻訳開始部位を使用する（p 7． 5／A T G 1／t k、p 7． 5／A T G 3／t k、及び p 7． 5／A T G 4／t k）かのいずれかである。

【0313】

モデル実験において、本明細書に説明されたもしくは当技術分野において公知の別所に説明されたように、c DNA は、マウス腫瘍細胞株（B C A 3 9）のポリ-A + m R N A から合成され、かつ 4 種の修飾された p 7． 5／t k 伝達性プラスミドの各々へライゲーションされる。本発明に記されるか、さもなければ当技術分野において公知であるように、この伝達性プラスミドは、大腸菌のような真核宿主細胞による継代により増幅される。20 μ g の N o t I 及び A p a I で消化した v／t k ワクシニアウイルス DNA アーム及び 4 種の組換えプラスミド c DNA ライブラリーの等モル混合物を、三分子組換えのために、F P V ヘルパーウイルス感染した B S C - 1 細胞へトランスフェクションした。収集したウイルスは、総力価 6×10^6 p f u を有し、その 90 % より多くが、B r d U 耐性であった。

【0314】

組換えワクシニアライブラリー中の c DNA 挿入断片のサイズ分布を特徴付けるために、個別の単離されたプラークを、滅菌したパスツールピペットを用いて採取し、リン酸緩衝生理食塩水（P B S）100 μ l が入った 1． 5 m l チューブへ移した。ウイルスは、ドライアイス／イソプロパノール及び 37 °C 水浴の凍結／解凍の 3 サイクルにより、細胞から放出された。およそ 1／3 の各ウイルスプラークを使用し、最終容量 250 μ l で t k - ヒト 143 B 細胞を含有する 12 ウェルプレートのひとつのウェルを感染した。2 時間の感染期間の最後に、各ウェルを、2． 5 % ウシ胎児血清を伴う 1 m l D M E M（D M E M - 2． 5）及び最終濃度 125 μ g／m l とするのに十分な B U d R で積層した。細胞を、37 °C で 3 日間、C O₂ インキュベーター中でインキュベーションした。3 日目に細胞を収集し、遠心によりペレット化し、かつ 500 μ l P B S 中に再懸濁した。ウイルスは、前述の凍結／解凍の 3 サイクルにより細胞から放出された。各ウイルスストックの 20 % を使用し、最終容量 3 m l の D M E M - 2． 5 中で、50 m m 組織培養皿において B S C - 1 細胞の集密な単層を感染した。2 時間の感染期間の最後に、細胞に D M E M - 2． 5 3 m l を積層した。細胞を、37 °C で 3 日間、C O₂ インキュベーター中でインキュベーションした。3 日目に細胞を収集し、遠心によりペレット化し、かつ 300 μ l P B S 中に再懸濁した。ウイルスは、前述の凍結／解凍の 3 サイクルにより細胞から放出された。粗ウイルスストック 100 μ l を、1． 5 m l チューブに移し、等容量の融解した 2 % 低融点アガロスを添加し、かつウイルス／アガロス混合物を、パルスフィールドゲルサンプルブロックに移した。寒天のウォーム（a g a r w o r m s）が固化した場合、これらは、サンプルブロックから除去し、3 個の等量の切片に切断した。3 個の切片全てを、同じ 1． 5 m l チューブに移し、かつ 0． 5 M E D T A、1 % S a r k o s y l、0． 5 m g／m l プロテイナーゼ K の 250 μ l を添加した。このウォームを、この溶液中で、37 °C、24 時間インキュベーションした。ウォームを、0． 5 X T B E 緩衝液 500 μ l で数回洗浄し、各ウォームの 1 切片を、1 % 低融点アガロスゲルのウェルに移した。これらのウォームを添加した後、ウェルを、追加の融解した 1 % 低融点アガロスを添加することにより、シールした。その後このゲルを、B i o - R a d 社パルスフィールドゲル電気泳動装置により、200 ボルト、8 秒パルス時間で、0． 5 X T B E 中、16 時間、電気泳動した。このゲルを、臭化エチジウム染色し、かつワクシニアゲノム c DNA を含有するアガロス部分を、ゲルから切出し、かつ 1． 5 m l チューブへ移した。ワクシニア DNA を、製造業者の推奨に従い β - A g a r a s e（G i b c o 社）を用い、アガロスから精製した。精製したワクシニア DNA を、50 μ l d d H

2 O中に再懸濁した。各DNAストック1 μ lを鋳型として用い、ワクシニアTK特異的プライマーMM428及びMM430（挿入部位にフランキングする）並びにKlent aqポリメラーゼ（Clontech社）を製造業者の推奨に従い用い、最終容量20 μ lでポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。反応条件は、最初の変性段階が95℃で5分間、その後下記を30サイクルであった：94℃で30秒間、55℃で30秒間、68℃で3分間。各PCR反応液2.5 μ lを、1%アガロースゲル上に溶解し、臭化エチジウムで染色した。多様なサイズの増幅断片が認められた。PCRにおいて増幅したフランキングベクター配列について補正した場合、これらの挿入断片のサイズは300～2500bpの範囲であった。

【0315】

このライブラリーの遺伝子産物の代表的発現は、ワクシニアライブラリーにおける特異的cDNA組換え体頻度は、標準プラスミドライブラリーにおいて同じcDNAの組換え体が生じる頻度から識別不能であることを明らかにすることにより、確立された。これを、マウス腫瘍においてアップレギュレーションされることが先に示されたIAP配列について表6に図示した。ワクシニアライブラリーからの平均800又は200ウイルスpfuのいずれかを伴う20種の個別のプールを、BDUR存在下における143B tk-細胞のマイクロ培養物の感染により増幅した。DNAは、3日後各感染培養物から抽出し、配列特異的プライマーによるPCRにより、先に特徴付けた内因性レトロウイルス（TAP、イントラシスターブルA粒子）配列の存在に関しアッセイした。陽性プールの頻度のポアソン解析は、およそ500ウイルスpfu毎に1個のIAP組換え体頻度を示している（表6）。同様に、プラスミドライブラリーからの平均1,400又は275細菌cfuのいずれかを伴う20種の個別のプールは、DH5細菌の形質転換により増幅した。各プールからのプラスミドDNAは、同じIAP配列の存在についてアッセイした。陽性プールの頻度のポアソン解析は、450プラスミド毎に1個のIAP組換え体頻度を示している（表6）。

【0316】

【表6】

組換えワクシニアライブラリー及び通常のプラスミド cDNAライブラリーにおけるIAP配列の限定希釈分析				
	PCRにより 陽性のウェル数	F_0	μ	頻度
#PFU/ウェル		ワクシニアライブラリー		
800	18/20	0.05	2.3	1/350
200	6/20	0.7	0.36	1/560
#CFU/ウェル		プラスミドライブラリー		
1400	20/20	0	-	-
275	9/20	0.55	0.6	1/450

F_0 = 陰性ウェル画分； μ = DNA前駆体／ウェル = $-\ln F_0$

【0317】

同様の分析を、ワクシニアライブラリーにおける α チューブリン配列の提示に関し行い、同様の結果であった。同じ腫瘍cDNAから構築したふたつのライブラリーにおける任意選択した配列の同等の頻度は、ワクシニアライブラリーの構築はプラスミドライブラリーの構築よりも、やや複雑でありかつある種一般性は低い、腫瘍cDNA配列を同等に提示することを示唆している。

【0318】

考察

前述の三分子組換え戦略は、ほぼ100%のウイルス組換え体を生じた。これは、プラスミド伝達ベクターのワクシニアウイルス感染細胞へのトランスフェクションによるウイルスの組換え体の作成について、現行法よりも高度に著しく改善されている。後者の手法は、わずかに0.1%の桁の頻度で、ウイルス組換え体を生じている。三分子組換えにおけるウイルス組換え体の高収率は、1回目に、ワクシニアウイルス由来のベクターにおいてゲノム又はcDNAライブラリーを効率的に構築することを可能にする。第一実験シリーズにおいて、力価 6×10^6 個の組換えウイルスを、20 μ gのNot I及びApa I消化したワクシニアベクターアームの、等モル濃度の腫瘍細胞cDNAとの混合物によるトランスフェクション後に得た。この技術の利点は、特異的ゲノム及びcDNAクローンの単離に関する、新規かつ効率的スクリーニング及び選択戦略の可能性をもたらしている。

【0319】

本明細書に明らかにされた三分子組換え法は、ワクシニア及びヘルペスウイルスを含む哺乳類ウイルスのような他のウイルスと共に使用することができる。典型的には、相同でない2種のウイルスアームが作成される。これらのウイルスアームが結合することができる唯一の方法は、プラスミドのような導入ベクターの挿入断片にフランキングしている相同配列の橋かけである。2種のウイルスアーム及び導入ベクターが、同じ細胞に存在する場合、作出された感染性ウイルスのみが、導入ベクター内のDNA挿入断片へ組換えられる。

【0320】

本発明の三分子組換え法によりワクシニア及び他の哺乳類ウイルスにおいて構築されたライブラリーは、本発明のCTLスクリーニングシステムにおいて標的抗原を同定する際にワクシニアウイルス及びその使用に関して本明細書に説明されたものと同様の利点を有すると考えられる。同様の利点は、真核細胞においてより複雑なアッセイが行われる場合に、ワクシニア又は他の哺乳類ウイルスにおいて構築されたDNAライブラリーについて期待される。このようなアッセイは、真核細胞における受容体及びリガンドをコードしているDNAのスクリーニングを含むが、これらに限定されるものではない。

【0321】

実施例 6伝達性プラスミドの調製

導入ベクターは、公知の手段によるクローニングのために調製される。好ましい方法は、適当な制限エンドヌクレアーゼ（例えば、Sma I及びSal I又はBamH I及びSall I）による、適当な緩衝液中、適当な温度における、少なくとも2時間にわたる、1～5 μ gのベクターの切断に関する。線状の消化されたベクターは、消化されたベクターの0.8%アガロースゲルによる電気泳動により単離される。線状プラスミドは、ゲルから切り出され、かつ周知の方法を用いて、アガロースから精製される。

【0322】

ライゲーション cDNA及び消化した導入ベクターを、周知の方法を用いて互いにライゲーションした。好ましい方法において、導入ベクター50～100ngを、T4 DNAリガーゼを用い、cDNAの変動する濃度で、適当な緩衝液、14℃で18～24時間かけて、ライゲーションした。

【0323】

形質転換 ライゲーション反応のアリコートを用い、周知の方法を用い、DH10B又はDH5 α のような大腸菌で電気穿孔により形質転換した。形質転換反応液を、選択的抗生物質（アンピシリン）を含有するLB寒天プレート上に播種し、かつ14～18時間31℃で増殖した。形質転換された細菌を全て、一緒にプールし、かつ周知の方法を用いプラスミドDNAを単離した。

【0324】

本発明の好ましい方法の前記説明において言及した緩衝液の調製は、当業者には明白であ

と思われる。

【0325】

実施例 7

三分子組換えのための組織培養細胞へのワクシニアウイルスDNA断片及び伝達性プラスミドの導入

cDNA又は他のライブラリーを、実施例5において説明したように、又は他の当技術分野において公知の技術により、4種の伝達性プラスミドにおいて構築した。三分子組換えを使用し、このcDNAライブラリーをワクシニアウイルスへ伝達した。BSC1細胞の集密な単層を、鶏痘ウイルスHP1によりMOI=1~1.5で感染した。感染は、0.1%ウシ血清アルブミンを補充した血清非含有培地において行った。BSC1細胞は、12ウェルもしくは6ウェルプレート、60mmもしくは100mm組織培養プレート、又は25cm²、75cm²、もしくは150cm² フラスコに入れた。v7. S/tk又はvEL/tk由来の精製したDNAを、制限エンドヌクレアーゼApaI及びNotIで消化した。これらの消化後、これらの酵素を熱失活し、かつ消化したワクシニアアームを、セントリコン100カラムを用い精製した。その後トランスフェクション複合体を、消化したワクシニアDNAと伝達性プラスミドcDNAライブラリーの間で形成した。好ましい方法は、リポフェクタミン又はリポフェクタミンプラス(Life Technologies社)を用い、これらのトランスフェクション複合体を形成する。12ウェルプレート中におけるトランスフェクションは、通常、0.5µgの消化されたワクシニアDNA及び10ng~200ngのライブラリーからのプラスミドDNAを必要としている。より大きい培養容器における細胞へのトランスフェクションは、比例して増大する量のワクシニアDNA及び伝達性プラスミドを必要とする。37℃で2時間の感染後、鶏痘を除去し、並びにワクシニアDNA、伝達性プラスミドのトランスフェクション複合体を添加した。これらの細胞を、トランスフェクション複合体と3~5時間インキュベーションし、その後トランスフェクション複合体を除去し、かつ2.5%ウシ血清アルブミンを補充した1ml DMEMと置き換えた。細胞を、CO₂中で37℃で3日間インキュベーションした。3日後、細胞を収集し、かつウイルスをドライアイス/イソプロパノール及び37℃の水浴の凍結/乾燥の3サイクルにより放出した。

【0326】

実施例 8

哺乳類細胞のトランスフェクション

本実施例は、ワクシニアDNA及び伝達性プラスミドで細胞をトランスフェクションする別法を説明している。三分子組換えは、例えば、リン酸カルシウム沈降法を使用する、消化したワクシニアDNA及び伝達性プラスミドの宿主細胞へのトランスフェクションにより行うことができる(F. L. Graham, A. J. Vander Eb, Virology, 52:456-467 (1973); C. Chen, H. Okayama, Mol. Cell. Biol., 7:2745-2752 (1987)、DEAE-デキストラン(D. J. Sussman, G. Milman, Mol. Cell. Biol., 4:1641-1643 (1984))、又は電気穿孔(T. K. Wong, E. Neumann, Biochem. Biophys. Res. Commun., 107:584-587 (1982); E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, EMBO J., 1:841-845 (1982))。

【0327】

実施例 9

MVA三分子組換えベクターの構築

三分子組換えに適した修飾ワクシニア・アンカラ(MVA)ベクターの構築のためには、2種の独自の制限エンドヌクレアーゼ部位が、MVA tk遺伝子へ挿入されなければならない。完全なMVAゲノム配列は公知である(GenBank U94848)。この配列を検索し、制限エンドヌクレアーゼAscI、RsrII、SfiI、及びXmaI

はMVAゲノムを切断しないことが明らかになった。制限エンドヌクレアーゼAscI及びXmaIを、市販の酵素という理由で選択し、AscI及びXmaIは、各々、8bp及び6bpの認識配列サイズを有する。これらの部位をMVA tk遺伝子に導入するためには、XmaI及びAscI部位にフランキングしたレポーター遺伝子（大腸菌gusA）を含む構築物が作出される。Gus遺伝子は、pCRII.Gusにおいて入手可能である（M. Merchlinsky, D. Eckert, E. Smith, M. Zauderer, Virology, 238: 444-451 (1997)）。このレポーター遺伝子構築物を、レポーター遺伝子の発現を制御するために、ワクシニアtk DNAフラグ及び初期／後期7.5kプロモーターを含む伝達性プラスミドにクローニングされる。Gus遺伝子は、この構築物から、Gus特異的プライマーを用い、PCR増幅される。Gusセンス

5'ATGTTACGTCCTGTAGAAACC 3' (配列番号 :94),

及びGusアンチセンス

5'TCATTGTTTGCCTCCCTGCTG3' (配列番号 :95).

その後このGus PCR産物は、センスプライマー上にNotI及びXmaI部位、アンチセンスプライマー上にAscI及びApaI部位を含むように修飾されているGus特異的プライマーによりPCR増幅される。これらのプライマーの配列は、以下である：NX-Gusセンス：

5'AAAGCGGCCCGCCCGGGATGTTACGTCC

3' (配列番号 :96);

及び

AA-Gusアンチセンス：

5'

AAAGGGCCCGGCGCGCCTCATTGTTTGCC 3' (配列番号 :97).

【0328】

このPCR産物は、NotI及びApaIにより消化され、かつp7.5/tkのNotI及びApaI部位へクローニングされる（M. Merchlinsky, D. Eckert, E. Smith, M. Zauderer, Virology, 238: 444-451 (1997)）。7.5k-XmaI-gusA-AscI構築物は、許容QT35又はBHK細胞において、通常の相位的組換えによりMVAへ導入される。組換え体プラークは、Gus基質X-Glu（5-ブromo-3-インドイル-β-D-グルクロン酸；Clontech社）により選択的に染色される（M. W. Carroll, B. Moss, Biotechniques, 19: 352-355 (1995)）。独自のXmaI及びAscI部位も含むMVA-Gusクローンは、等質性（homogeneity）にプラーク精製される。MVA-Gusの大規模培養物は、BHK細胞上において増幅され、かつ裸のDNAは、精製されたウイルスから単離される。XmaI及びAscIによる消化後、MVA-Gus DNAは、MVAにおけるcDNA発現ライブラリーの構築のための三分子組換えに使用される。

【0329】

MVAは、ほとんどの哺乳類細胞においてその生活環を完了することはできない。この弱毒化は、組換えcDNAの高レベルの発現の延長を生じるが、生存可能なMVAは、感染細胞から回収することができない。選択された細胞から生存可能なMVAを回収できないことは、関心のある機能性cDNA組換え体を単離するために必要な繰り返しの選択サイクルを妨害する。この問題に対する解決法は、MVAの宿主範囲欠損を補完することができるヘルパーウイルスによる、MVA感染細胞の感染である。このヘルパーウイルスは、その生活環の補完に必須のMVAが欠損している遺伝子産物（複数）を提供することができる

。恐らく別の宿主範囲が制限されたヘルパーウイルス、例えば鶏痘は、哺乳類細胞においても制限されているので、これらのウイルスはMVA欠損体（複数）を補完することができないと考えられる。ワクシニアウイルスの野生型株は、MVAを補完することができると考えられる。しかしこの場合、複製コンピテントなワクシニアウイルスの産生は、組換えMVAクローンの選択及び単離の追加のサイクルを完了するであろう。複製コンピテントなウイルスの作成を伴わずに、非許容条件下での哺乳類細胞からの生存可能なMVAの回収に必要なヘルパー機能を提供する条件付き欠損型ワクシニアウイルスを、使用することができる。ワクシニアD4Rオープンリーディングフレーム（orf）は、ウラシルDNAグリコシラーゼ酵素をコードしている。この酵素は、ワクシニアウイルス複製に必須であるが、これは感染後早期に発現され（DNA複製前）、この遺伝子の破壊はワクシニアにとって致命的である。ワクシニアD4R遺伝子を発現している安定してトランスフェクションされた哺乳類細胞株は、D4R欠失ワクシニアウイルスを補完することができることが明らかにされている（G. W. Holzer、F. G. Falkner、J. Virology、71：4997-5002（1997））。D4R欠損ワクシニアウイルスは、哺乳類細胞においてMVAを補完するヘルパーウイルスとしての優れた候補であると考えられる。

10

【0330】

D4Rを補完する細胞株を構築するために、D4R orfを、ワクシニア株v7.5/tkから、プライマーD4R-センス

5' AAAGGATCCA TAATGAATTC AGTGACTGTA TCACACG 3'

20

(配列番号 :98),

及びD4Rアンチセンス

5' CTTGCGGCCG CTTAATAAAT AAACCCTTGA GCCC 3' (配列番号 :99).

を用いるPCR増幅によりクローニングした。このセンスプライマーは、BamHI部位を含むように修飾され、かつアンチセンスプライマーは、NotI部位を含むように修飾されている。PCR増幅並びにBamHI及びNotIによる消化後に、D4R orfは、pIRESHyg (Clontech社)のBamHI部位及びNotI部位にクローニングされる。この哺乳類発現ベクターは、強力なCMV前初期プロモーター/エンハンサー及びECMV内部リボソーム結合部位(IRES)を含む。このD4RIRESHyg構築物は、BSC1細胞へトランスフェクションされ、かつトランスフェクションされたクローンは、ヒグロマイシンについて選択される。IRESは、5'末端にD4R orf、及び3'末端にヒグロマイシンホストトランスフェラーゼ遺伝子を含むポリシストロン性mRNAの効率的翻訳を可能にする。これは、機能性ヒグロマイシン耐性クローンを高頻度で生じる（これらのクローンはD4Rを発現する）。D4Rを発現しているBSC1細胞(BSC1.D4R)は、D4R欠損ワクシニアを補完し、この欠損株の作成及び繁殖をもたらすことができると考えられる。

30

【0331】

D4R欠損ワクシニアを構築するために、D4R orf（ワクシニアゲノムの100732位～101388位）並びにフランキング配列の983bp（5'末端）及び610bp（3'末端）が、このワクシニアゲノムからPCR増幅される。プライマーD4R Flankセンス

40

5' ATTGAGCTCT TAATACTTTT GTCGGGTAAC AGAG 3' (配列番号 :100),

及びD4R Flankアンチセンス

5' TTAATCGAGA GTGTCGCAAT

TTGGATTTT 3' (配列番号 :101)

は、クローニングのためのSacI（センス）及びXhoI（アンチセンス）部位を含み

50

、ワクシニアゲノムの99749位から101998位を増幅する。このPCR産物は、pBluescript I I KS (Stratagene社)のSac I部位及びXho I部位にクローニングされ、pBS.D4R.Flan kを作成する。このD4R遺伝子は、657bp or fのヌクレオチド3位から始まる独自のEcoR I部位、及びこのor fの433位のヌクレオチドで始まる独自のPst I部位を含む。Gus発現カセットのD4RのEcoR I部位及びPst I部位への挿入は、ほとんどのD4Rコード配列を除去する。7.5kプロモーター-Gus発現ベクターが構築されている(M. Merchlinsky, D. Eckert, E. Smith, M. Zauderer, Virology, 238:444-451 (1997))。7.5-Gus発現カセットは、このベクターから、プライマー7.5Gusセンス

10

5'AAAGAATTCC TTTATTGTCA
TCGGCCAAA 3' (配列番号 :102)

及び7.5Gusアンチセンス
5' AATCTGCAGT

CATTGTTTGC CTCCCTGCTG 3' (配列番号 :103).

を用いるPCRにより、単離される。この7.5Gusセンスプライマーは、EcoR I部位を含み、及び7.5GusアンチセンスプライマーはPst I部位を含むと考えられる。PCR増幅後、75Gus分子は、EcoR I及びPst Iにより消化され、pBS.D4R.Flan kのEcoR I部分及びPst I部位に挿入され、pBS.D4R⁻/7.5Gus⁺を作成する。D4R⁻/Gus⁺ワクシニアは、pBS.D4R⁻/7.5Gus⁺構築物のv7.5/tk感染BSC1.D4R細胞へのトランスフェクションによる通常の相同的組換えにより作成される。D4R⁻/Gus⁺ウイルスは、BSC1.D4R細胞上でのプラーク精製により単離され、かつX-Gluで染色される。D4R-ウイルスは、哺乳類細胞におけるMVAゲノムの補完及びレスキューに使用することができる。

20

【0332】

関連した態様において、MVAゲノムは、他の欠損ボックスウイルスを伴う哺乳類細胞においてレスキューされ、かつソラレン/UV失活された野生型ボックスウイルスによってもレスキューされる。ソラレン/UV失活はここで考察されている。

30

【0333】

実施例10

D4R三分子組換えベクターの構築及び使用

ボックスウイルス感染は、宿主細胞タンパク質及びRNAの合成に対する劇的な阻害作用を有する。これらの宿主遺伝子発現に対する作用は、一部の条件下で、限定された宿主細胞に対する生理的作用を有する特異的ボックスウイルス組換えの選択を妨害する。必須の初期遺伝子において欠失されているワクシニアウイルスの一部の株は、宿主細胞タンパク質合成に対するより大きく低下された阻害作用を有することが示されている。従って、初期遺伝子機能を欠失しているボックスウイルスベクターにおける組換えcDNAライブラリーの作成は、一部の宿主遺伝子の生理作用に関するそれらの継続した活性のある発現に依存したある種の組換え体の選択にとって有利であると考えられる。必須のウイルス遺伝子の破壊は、変異体株の繁殖を妨害する。しかしワクシニアの複製欠損株は、宿主細胞におけるトランス補完(trans complementation)を介した喪失機能の提供により、もしくはこの遺伝子の発現を誘導し得るヘルパーウイルスにより、レスキューされる。

40

【0334】

複製欠損株において構築されたボックスウイルスライブラリーによる細胞集団の感染は、宿主細胞シグナル伝達機能、分化経路、及び転写調節に対する感染の作用を大きく減弱する。この戦略の更なる重要な恩恵は、標的化された転写調節領域の制御下での必須遺伝子

50

の発現が、それ自身、転写調節領域の活性化に直接的又は間接的につながる組換えウイルスの選択によることである。例は、初期B細胞前駆体上の表面免疫グロブリン受容体の架橋の結果として活性化された遺伝子のプロモーター、又は幹細胞分化後に誘導されたマーカーをコードしている遺伝子のプロモーターを含む。このようなプロモーターが必須のウイルス遺伝子の発現を起動する場合、その結果その転写調節因子の発現を直接的又は間接的に活性化するこれらのウイルス組換え体が、複製しかつ感染性粒子としてパッケージングされる。この方法は、dipA又はCTL標的エピトープの発現を基にした選択法よりも(then)はるかに低いバックグラウンドを生じる可能性があり、その理由は、誘導されない細胞は、非特異的バースタンダー作用を介して放出される複製コンピテントなワクシニアウイルスを含まないからである。これらの選択された組換え体は、更に、補完する細胞株において又は補完するヘルパーウイルスもしくはトランスフェクションされたプラスミドの存在下で拡張することができる。

【0335】

多くの必須の初期ワクシニア遺伝子が説明されている。好ましくは、D4R遺伝子を欠失しているワクシニア株が使用される。ワクシニアD4Rオープンリーディングフレーム(orf)は、ウラシルDNAグリコシラーゼ酵素をコードしている。この酵素は、ウイルスDNA複製に必要であり、及びこの遺伝子の破壊はワクシニアにとって致命的である(A. K. Mills, M. S. Carpenter, 及びA. M. Delange, *Virology*, 198: 504-513 (1994))。ワクシニアD4R遺伝子を発現している安定してトランスフェクションされた哺乳類細胞株は、D4R欠失ワクシニアウイルスを補完することができることが明らかにされている(G. W. Holzner, F. G. Falkner, *J. Virology*, 71: 4997-5002 (1997))。D4Rが補完されない場合、D4R欠失ワクシニアによる感染は、宿主細胞タンパク質合成の阻害の大きい低下を招く(Hoizner及びFalkner)。D4R欠失ワクシニアのtk遺伝子へ挿入された外来遺伝子は、例えD4R補完を欠いていても、高レベルで発現され続けることも示されている(M. Himly, M. Pfeleiderer, G. Holzner, U. Fischer, E. Hannak, F. G. Falkner, 及びF. Dörner, *Protein Expression and Purification*, 14: 317-326 (1998))。従って複製欠失D4R株は、一部の宿主遺伝子の生理的作用に関するそれらの継続した活性のある発現に左右されるウイルス組換え体の選択に良く適している。

【0336】

D4R欠損ワクシニア株において構築された代表的cDNAライブラリーからの特異的組換え体の選択のためにこの戦略を実行するためには、下記細胞株及びベクターが必要である：

1. D4R発現している補完している細胞株が、D4R欠失ウイルスストックの拡張のために必要である。
2. D4R遺伝子は、三分子組換えに適したウイルス株において欠損又は失活されなければならない。
3. CH33 Bリンパ腫細胞上の膜免疫グロブリン受容体の架橋後に誘導されるBAX又は他の遺伝子の発現を調製するような様々な誘導性プロモーター、又はC3H10T1/2前駆細胞からの軟骨細胞分化の誘導後のX型コラーゲンの発現のためのプロモーターの制御下で、D4Rを発現するプラスミド又はウイルスの構築物が作成されなければならない。関連した細胞株におけるこれらの構築物の安定したトランスフェクションは、特異的組換え体をレスキューするために必要である。あるいは、関連のある構築物を発現しているヘルパーウイルスが、細胞株又は初代培養物のいずれかにおける発現の誘導に使用され得る。

【0337】

10. 1 D4R補完細胞株の構築 D4R補完細胞株は、下記のように構築される。第一に、D4R orf (ワクシニアゲノムの100732位から101388位に位置す

る)は、ワクシニア株 v7. 5 / tk から、下記プライマーを使用する PCR 増幅によりクローニングされる：

D4R-センス：

5' AAAGAATTCA TAATGAATTC
AGTGACTGTA TCACACG 3',

本明細書においては配列番号：104と称す；及び

D4R-アンチセンス：

5' CTTGGATCCT
TAATAAATAA ACCCTTGAGC CC 3',

10

本明細書においては配列番号：105と称す。

センスプライマーは、EcoRI 部位を含むように修飾され、アンチセンスプライマーは、BamHI 部位（両方とも下線付き）を含むように修飾された。標準 PCR 増幅及び EcoRI 及び BamHI による消化後、得られる D4R orf は、pIRESneo (Clontech 社から入手可能、パロアルト、CA) の EcoRI 及び BamHI 部位にクローニングした。この哺乳類発現ベクターは、強力な前初期プロモーター／エンハンサー及び ECMV 内部リボソーム結合部位 (IRES) を含む。この D4R / IRES neo 構築物を、BSC1 細胞へトランスフェクションし、かつトランスフェクションされたクローンを、G418 で選択した。この IRES は、5' 末端に D4R orf、及び 3' 末端にネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含むポリシストロン性 mRNA の効率的な翻訳を可能にする。これは、機能性高頻度の G418 耐性クローンを生じる（このクローンは D4R を発現する）。トランスフェクションされたクローンは、高レベルの D4R mRNA を発現しているクローンを同定するために、プローブとして D4R 遺伝子を用い、ノーザンブロットにより試験される。D4R を発現する BSC1 細胞 (BSC1. D4R) は、D4R 欠失ワクシニアを補完することができ、D4R 欠損ウイルスの作成及び繁殖をもたらす。

20

【0338】

10. 2. D4R 欠失ワクシニアベクターの構築 前記実施例 5 において説明された三分子組換えに適する D4R-欠失ワクシニアウイルスは、下記方法を用いる、大腸菌 GusA 発現カセットの 300-bp 欠損への挿入による、D4R orf (ワクシニアゲノムの 100732 位から 101388 位) の破壊により構築される。

30

【0339】

GusA 遺伝子を挿入するために、その挿入部位にフランキングする領域を、下記のようにワクシニアウイルスから増幅する。左側フランキング領域は、下記プライマーにより増幅される：

D4R 左側フランキングするセンス：

5' AATAAGCTTT
ACTCCAGATA ATATGGA 3',

本明細書において配列番号：106と称す；及び

D4R 左側フランキングするアンチセンス：

5' AATCTGCAGC
CCAGTTCAT TTT 3',

40

本明細書において配列番号：107と称す。

これらのプライマーは、ワクシニアゲノムの 100167 位から 100960 位に広がる領域を増幅し、かつクローニングのために HindIII (センス) 及び PstI (アンチセンス) 部位を含むように（両方とも下線付き）修飾される。得られる PCR 産物を、HindIII 及び PstI で消化し、かつ pBS (Stratagene 社より入手) の HindIII 部位及び PstI 部位にクローニングし、pBS. D4R. LF を作出した。右側フランキング領域は、下記プライマーにより増幅した：

50

D 4 R 右側にフランキングするセンス：

5' AATGGATCCT CATCCAGCGG CTA 3',

本明細書において配列番号：108と称す；及び

D 4 R 左側フランキングするアンチセンス：

5' AATGAGCTCT

AGTACCTACA ACCCGAA 3',

本明細書において配列番号：109と称す。

これらのプライマーは、ワクシニアゲノムの101271位から101975位に広がる領域を増幅し、かつクローニングのためにBamHI（センス）及びSacI（アンチセンス）部位を含むように（両方とも下線付き）修飾される。得られるPCR産物を、BamHI及びSacIで消化し、かつpBS.D4R.LFのBamHI部位及びSacI部位にクローニングし、pBS.D4R.LF/RFを作出した。 10

【0340】

ボックスウイルス合成初期／後期（E/L）プロモーターに操作可能に結合されたGusAコード領域を含む発現カセットは、pBS.D4R.LF/RFに、下記の方法により挿入される。E/Lプロモーター-Gusカセットは、Merchliński, M.らの論文（Virology、238：444-451（1997））に説明されたpEL/tk-Gus構築物に由来している。GusATG開始コドンのすぐ上流のNotI部位は、pEL/tk-GusのNotIによる消化により除去され、その後クレノウ断片との反応及びそれ自身の再ライゲーションにより満たされ、pEL/tk-Gus（NotI-）を生じる。E/L-Gus発現カセットは、pEL/tk-Gus（NotI-）から、下記プライマーを使用する標準のPCRにより単離される： 20

EL-Gusセンス：

5' AAAGTCGACG

GCCAAAAATT GAAATTTT 3',

本明細書において配列番号：110と称す；及び

EL-Gusアンチセンス：

5' AATGGATCCT

CATTGTTTGCCTCCC 3',

本明細書において配列番号：111と称す。 30

EL-Gusセンスプライマーは、SalI部位を含み、かつEL-Gusアンチセンスプライマーは、BamHI部位（両方とも下線付き）を含む。PCR増幅後、EL-Gusカセットは、SalI及びBamHIで消化され、かつpBS.D4R.LF/RFのSalI部位及びBamHI部位に挿入され、pBS.D4R⁻/ELGusを作成する。この伝達性プラスミドは、D4R配列により両側がフランキングされたEL-Gus発現カセットを含む。D4R orfへ操作された300bp欠損も存在する。

【0341】

三分子組換えに適したD4R⁻/Gus⁺ワクシニアウイルスは、pBS.D4R⁻/ELGus構築物のv7.5/tk-感染したBSC1.D4R細胞へのトランスフェクション後の通常の相同的組換えにより作出される。D4R⁻/Gus⁺ウイルスは、BSC1.D4R細胞上でのプラーク精製により単離され及びX-Gluにより染色される（M. W. Carroll、B. Moss、Biotechniques、19：352-355（1995））。この新規株は、消化されたv7.5/tk/Gus/D4Rである。 40

【0342】

v7.5/tk/Gus/D4Rから精製されたDNAを使用し、代表的ワクシニアcDNAライブラリーを、反応をBSC1.D4R補完している細胞株において行うこと以外は、実施例5に説明した三分子組換えによりを構築した。

【0343】

10. 3. 誘導性プロモーターの制御下でのD4Rを発現している宿主細胞の調製 誘 50

導性プロモーターの誘導時にD4R遺伝子を発現している宿主細胞は、下記のように調製される。誘導性プロモーターの制御下で、ワクシニアD4R遺伝子を発現しているプラスミド構築物が作成される。誘導性プロモーターの例は、CH33細胞上の膜免疫グロブリンの架橋後にアップレギュレーションされるプロモーター（抗体選択のため）、例えば実施例2及び3に記載されたBAXプロモーターを含むが、これらに限定されるものではない。ワクシニアD4Rorfは、10.1項に記されたプライマーD4Rセンス及びD4Rアンチセンスを使用するPCRにより増幅される。これらのPCRプライマーは、所望の制限エンドヌクレアーゼ部位を含むことを必要とするので修飾される。その後、D4Rorfは、適当な真核発現ベクター（これは安定して形質転換された細胞の選択ができる）へ、当業者に公知の方法を用い、所望のプロモーターの操作可能な結合において、クローニングされる。 10

【0344】

その後この構築物は、例えば実施例2及び3に説明された抗体の選択のため、適当な宿主細胞へトランスフェクションされ、BAXプロモーターに操作可能に結合されたD4R遺伝子は、適当な細胞株、例えば、CH33細胞株、CH31細胞株、又はWEHI-231細胞株に安定してトランスフェクションされる。得られる宿主細胞は、v7.5/tk/Gus/D4Rにおいて調製されたライブラリーを用い、本質的に実施例3に説明されたように、抗体の産生において利用される。宿主細胞の表面上の膜発現した免疫グロブリン分子の抗原誘導型架橋は、架橋した細胞におけるD4R遺伝子産物の発現の誘導を生じる。D4Rの発現は、ライブラリーが作成されるv7.5/tk/Gus/D4Rゲノムにおける欠損を補完し、これは感染性ウイルス粒子の産生を可能にする。 20

【0345】

実施例11

DNA合成の可逆的インヒビターによるポックスウイルス媒介型宿主シャットオフの減弱
 下記に説明したように、減弱された又は欠損されたウイルスは、細胞変性効果を低下することが望ましいことが多い。ウイルスの感染時の細胞変性効果は、宿主細胞死（例えば、架橋により誘導されたアポトーシス）を利用する方法を用いる免疫グロブリン分子の選択及び同定により妨害される。このような作用は、DNA合成の可逆的インヒビター、例えばヒドロキシ尿素（HU）により減弱することができる（Pogo, B. G. 及びS. Dales, *Virology*, 43 (1): 144-51 (1971)）。HUは、デオキシリボヌクレオチド前駆体の複製複合体を奪うことにより、細胞及びウイルスの両DNA合成を阻害する（Hendricks, S. P. 及びC. K. Matthews, *J. Biol. Chem.*, 273 (45): 29519-23 (1998)）。ウイルスDNA複製の阻害は、後期ウイルスRNAの転写をブロックする一方、初期ワクシニアプロモーターの制御下で遺伝子の転写及び翻訳は可能である（Nagaya, A., B. G. Pogo, 及びS. Dales, *Virology*, 40 (4): 1039-51 (1970)）。従って、HUのようなDNA合成の可逆的インヒビターによる処理は、架橋の作用の検出を可能にする。適当なインキュベーション後、HU阻害が、宿主細胞の洗浄により逆行され、その結果ウイルスの複製サイクルは継続され、かつ感染性組換え体を回収することができる（Pogo, B. G. 及びS. Dales, *Virology*, 43 (1): 144-51 (1971)）。 30 40

【0346】

図9の結果は、BMP-2（骨形成タンパク質-2）により処理したC3H10T^{1/2}前駆細胞における軟骨細胞分化のマーカーであるX型コラーゲン合成の誘導は、ワクシニア感染によりブロックされるが、その合成はウイルスDNA合成のHU媒介された阻害によりレスキューされることを示している。HUが新鮮培地による洗浄により培養物から取除かれる場合、ウイルスのDNA合成及び感染性粒子の集成は迅速に進行し、その結果感染性ウイルス粒子を、洗浄後2時間足らずで単離することができる。

【0347】

C3H10T^{1/2}細胞を、WRワクシニアウイルスでMOI=1で感染し、1時間後、 50

2 mM HUの存在又は非存在下で、培地又は400 ng/ml BMP-2のいずれかを添加した。更に37℃で21時間インキュベーションした後、HUを新鮮培地による洗浄により除去した。感染性サイクルを、更に2時間継続し、ウイルスDNA複製及び感染性粒子の集成をもたらした。24時間後に、RNAを、4種の異なる培養条件下で維持した細胞から抽出した。ノーザン解析を、X型コラーゲン特異的プローブを用いて行った。誘導されないC3H10T^{1/2}細胞は、間葉前駆細胞表現型を有し、それ自体X型コラーゲンを発現しない（左側第一のレーン）。正常な未感染のC3H10T^{1/2}細胞へのBMP-2の添加は、成熟軟骨細胞への分化及びX型コラーゲンの発現を誘導する（左から第一及び第二のレーンの比較）が、BMP-2のワクシニア感染したC3H10T（1/2）細胞への添加は、X型コラーゲンの合成の誘導に失敗した（左側から第三のレーン）。2 mM HUの存在下において、BMP-2は、例えばワクシニア感染したC3H10T（1/2）細胞においても、X型コラーゲン合成を誘導する（左側から第四のレーン）。

10

【0348】

このウイルス細胞変性効果を減弱する戦略は、他のウイルス、他の細胞型及び例えば架橋時にアポトーシスを誘導するような免疫グロブリン分子の選択に適用可能である。

【0349】

実施例12

多様な特異性のヒトFab断片ライブラリーの構築

完全なヒトの多様な免疫グロブリンFab断片をコードしているポリヌクレオチドのライブラリーは、下記のように産生される。これらのFab断片は、免疫グロブリン軽鎖と対形成した第一の定常領域ドメインに結合した重鎖可変領域（VH-CH1）を含む。ヒトVH（重鎖の可変領域）、VK（κ軽鎖の可変領域）及びVL（λ軽鎖の可変領域）の遺伝子は、PCR増幅される。3種の可変遺伝子ファミリーの各々について、組換えプラスミドライブラリー及びワクシニアウイルスライブラリーの両方が構築される。これらの可変領域遺伝子は、重鎖のCH1ドメイン又はκ軽鎖定常領域CKに相当する定常領域配列のすぐ上流のp7.5/tkベースの伝達／発現プラスミドへ挿入される。これらのプラスミドを利用し、三分子組換えにより、対応するワクシニアウイルス組換え体を作成され、かつひとつの免疫グロブリン鎖又はそれらの断片の、第二の免疫グロブリン鎖又はそれらの断片のワクシニアウイルス組換え体に感染した細胞へのトランスフェクション後の、Fab断片の高レベルの発現のために直接使用することもできる。これらふたつの鎖は、合成及び集成され、Fab断片を形成する。当業者に理解されるように、これらのFab断片は、シグナル配列、膜貫通ドメイン、及び／又は細胞内ドメインのためのコード配列の付着により、膜結合又は分泌され得る。

20

30

【0350】

12.1 pVHEc pVHEcと称される、CμのVH及びCH1ドメインを含むヒト重鎖断片をコードしている発現ベクターは、下記のように構築される。プラスミドp7.5/tk2は、前記実施例1.1に説明されたように作成される。VH及びCH1ドメインのアミノ酸109～113、すなわちCμのアミノ酸109～223BをコードしているDNA構築物を、実施例1のように単離されたIgM重鎖遺伝子から増幅し、かつPCRにより修飾し、アミノ酸109～113+をコードしている領域の5'末端にBstEII部位、及びその3'末端にCμCH1ドメイン、停止コドンSalI部位を含んだ。このDNAは、p7.5/tk2へ、BstEII部位とSalI部位の間に挿入され、pVHEcを作成する。実施例1.4(a)のように作成された重鎖可変領域（VH）PCR産物（アミノ酸（-4）から（110））、表1及び2に列記されたプライマーを用い、BssHII部位及びBstEII部位へクローニングした。CH1ドメイン配列と選択された制限酵素部位の間の重複のために、これは、機能的シグナルペプチドを欠いているが、正確な翻訳リーディングフレームは維持しているコンティグ重鎖断片の構築物を生じる。

40

【0351】

12.2 pVKEc及びpVLEc 本明細書においてpVKEc及びpVLEcと称

50

されるヒト κ 及び λ 免疫グロブリン軽鎖定常領域をコードしている発現ベクターは、下記のように構築される。プラスミド p 7. 5 / t k 3. 1 は前記実施例 1. 3 のように作成される。

【0352】

(a) プラスミド p 7. 5 / t k 3. 1 は、下記の方法により p V K E c へ転換される。 C_{κ} 領域をコードしている c D N A は、アミノ酸 104 ~ 107 + C_{κ} をコードしている領域の 5' 末端に X h o I 部位を、並びに 3' 末端に停止コドン及び S a l I 部位を含むためのプライマーにより、実施例 1 に説明されたように単離され、これはその後 p 7. 5 / t k 3. 1 へ、X h o I 部位及び S a l I 部位でクローニングされ、p V K E c を作成する。 κ 軽鎖可変領域 (V K) P C R 産物 (アミノ酸 (-3) から (105)) は、表 1 及び 2 に列記されたプライマーを用い、実施例 1. 4 (b) に説明されたように作成され、その後 p V K E c へ A p a L I 部位及び X h o I 部位でクローニングされる。 κ 軽鎖配列と選択された制限酵素部位の重複のために、これは、機能的シグナルペプチドを欠いているが、正確な翻訳リーディングフレームは維持しているコンティグ κ 軽鎖の構築物を生じる。

10

【0353】

(b) プラスミド p 7. 5 / t k 3. 1 は、下記の方法により p V L E c へ転換される。 C_{κ} 領域をコードしている c D N A は、その 5' 末端に H i n d I I I 部位及び V $_{\lambda}$ のアミノ酸 105 から 107、並びにその 3' 末端に停止コドン及び S a l I 部位を含むプライマーにより、実施例 1 に説明されたように単離され、これはその後 p 7. 5 / t k 3 へ H i n d I I I 部位及び S a l I 部位でクローニングされ、p V L E c を作成する。 λ 軽鎖可変領域 (V L) P C R 産物 (アミノ酸 (-3) から (104)) は、表 1 及び 2 に列記されたプライマーを用い、実施例 1. 4 (c) に説明されたように作成され、その後 p V L E c へ A p a L I 及び H i n d I I I 部位でクローニングされる。 λ 軽鎖配列と選択された制限酵素部位の重複のために、これは、機能的シグナルペプチドを欠いているが、正確な翻訳リーディングフレームは維持しているコンティグ λ 軽鎖の構築物を生じる。

20

【0354】

12. 3 F a b の分泌型又は膜結合型 これらの発現ベクター (p V H E c、p V K E c 及び p V L E c) を、細胞表面又は細胞外空隙への F a b の標的化のために分泌シグナル、膜貫通ドメイン、細胞質ドメイン、又はそれらの組合せをクローニングするプロトタイプベクターとして利用する。例えば表 7 に示されたようなこれらのシグナル及びドメインは、p V H E c の N c o I 及び B s s H I I の間の (又は p V K E c 及び p V L E c の N c o I 及び A p a L I) の F a b の N 末端側及び / 又は C 末端側の S a l I 部位のいずれかに挿入することができる。細胞外区画への分泌に関して F a b を標的化するために、シグナルペプチドが、F a b 鎖、V H - C H 1 又は軽鎖のいずれか又は両方の N 末端に挿入される。細胞外提示のための形質膜における F a b の係留のために、膜貫通ドメインが、V H - C H 1 鎖及び / 又は軽鎖のカルボキシル末端に添加される。細胞質ドメインも添加される。

30

【0355】

【表 7】

40

局在化シグナル			
シグナル配列	末端	位置	タンパク質
MGWSCILFLVATATGAHS (配列番号:146)	N	ES	IgG1
NLWTTASTFIVLFLLSLFYSTTVTLF (配列番号:147)	C/N	PM	IgM

50

位置の欄の略号：E S、細胞外間隙；P M、形質膜

【0356】

実施例 13

ヒト単鎖-Fv (ScFv) 抗体ライブラリーの構築

13. 1 ヒトscFv発現ベクターp7. 5 / tk3. 2及びp7. 5 / tk3. 3は、図10に説明されたように、下記方法により構築される。プラスミドp7. 5 / tk3は、前記実施例1. 3に説明されたように作成された。プラスミドp7. 5 / tk3は、NcoI部位とApaLI部位の間の4個のヌクレオチドATACを、ATAGCへ代えることにより、p7. 5 / tk3. 1へと転換し、その結果NcoI中のATG開始コドンは、挿入されたシグナルペプチドを伴うことなくApaLIとインフレームであった。これは、実施例1. 3に説明されたようなNotIからSalIカセット（配列番号：29）の、本明細書において配列番号：112と称される、以下の配列

10

5'-GCGGCCGCCC

ATGGATAGCG TGCACCTTGAC TCGAGAAGCT TAGTAGTCGA C-3',

を有するカセットによる交換により、簡便に達成される。

【0357】

プラスミドp7. 5 / tk3. 1は、配列番号：113と称されるXhoI及びSalI間の領域（すなわち、配列番号：112のヌクレオチド30から51）の、下記カセットとの置換により、p7. 5 / tk3. 2へ転換される：XhoI-（Vκのアミノ酸106～107をコードしているヌクレオチド）-（10個のアミノ酸リンカーをコードしているヌクレオチド）-G-BssHII-ATGC-BstEII-（VHのアミノ酸111～113をコードしているヌクレオチド）-停止コドン-SalI。これは、p7. 5 / tk3. 1を、XhoI及びSalIで消化し、かつ配列番号：114と称される配列

20

5'CTCGAGAT

CAAAGAGGGT AAATCTTCCG GATCTGGTTC CGAAGGCGCG

CATGCGGTCA CCGTCTCCTCATGAGTCGAC 3',

を有するカセットを挿入することにより達成される。VκとVHの間のリンカーは、最終サイズが14個のアミノ酸であり、最後の4個のアミノ酸は、下記のように挿入されるVH PCR産物に寄与している。このリンカーの配列は、

30

5'GAG GGT AAA TCT TCC

GGA TCT GGT TCC GAA GGC GCG CAC TCC 3' (配列番号 :115),

であり、これはアミノ酸

EGKSSGSGSEGAHS (配列番号 :116).

をコードしている。

【0358】

プラスミドp7. 5 / tk3. 1は、本明細書において配列番号：117と称されるHindIIIとSalIの間の領域（すなわち、配列番号：112のアミノ酸6～51のヌクレオチド）の、下記カセットとの置換により、p7. 5 / tk3. 3へ転換される：HindIII-（Vλのアミノ酸残基105～107をコードしているヌクレオチド）-（10個のアミノ酸リンカーをコードしているヌクレオチド）-G-BssHII-ATGC-BstEII-（VHのアミノ酸111～113をコードしているヌクレオチド）-停止コドン-SalI。これは、p7. 5 / tk3. 1を、HindIII及びSalIで消化し、かつ配列

40

5'AAGCTTACCG

TCCTAGAGGG TAAATCTTCC GGATCTGGTTC CGAAGGCGCG

CATGCGGTCA CCGTCTCCTC ATGAGTCGAC 3' (配列番号 :118).

を有するカセットを挿入することにより達成される。V λ とV H の間のリンカーは、最終サイズが14個のアミノ酸であり、最後の4個のアミノ酸は、下記のように挿入されるV H PCR産物に寄与している。このリンカーの配列は、

5'GAG GGT AAA TCT TCC GGA TCT GGT

TCC GAA GGC GCG CAC TCC 3' (配列番号 :119),

であり、これはアミノ酸

EGKSSGSGSEGAHS (配列番号 :120).

をコードしている。

【0359】

13.2 s c F vの細胞質ゾル型 ヒト κ 又は λ 免疫グロブリン軽鎖可変領域を含むs c F vポリペプチドをコードしている発現ベクターは、ヒト重鎖可変領域とインフレーションで融合され、これは下記を構築している：

(a) 細胞質ゾルV κ V H s c F v発現産物は、下記のように調製される。実施例1.4 (b)のように作成された κ 軽鎖可変領域(V κ) PCR産物(アミノ酸(-3)から(105))は、表1及び2に列記されたプライマーを用い、A p a L I部位及びX h o I部位の間でp7.5 / t k 3.2ヘクロニングされる。 κ 軽鎖配列と選択された制限酵素部位の間の重複のために、これは、下流のリンカーと同じ翻訳リーディングフレーム内のコンティグ κ 軽鎖の構築物を生じる。実施例1.4 (a)のように作成された重鎖可変領域(V H) PCR産物(アミノ酸(-4)から(110))は、表1及び2に列記されたプライマーを用い、B s s H I I部位及びB s t E I I部位の間でp7.5 / t k 3.2ヘクロニングされ、完全なs c F vオープンリーディングフレームを形成する。得られる産物は、14個のアミノ酸のリンカーにより接続されたV κ -V H 融合タンパク質の細胞質ゾル型である。このs c F vも、これらの制限部位及びV κ シグナルペプチドの一部によりコードされたアミノ末端で、6個の余分のアミノ酸に先行される。

【0360】

(b) 細胞質ゾルV λ V H s c F v発現産物は、下記のように調製される。実施例1.4 (c)のように作成された λ 軽鎖可変領域(V L) PCR産物(アミノ酸(-3)から(104))は、表1及び2に列記されたプライマーを用い、A p a L I部位及びH i n d I I I部位の間でp7.5 / t k 3.3ヘクロニングされる。 λ 軽鎖配列と選択された制限酵素部位の間の重複のために、これは、下流のリンカーと同じ翻訳リーディングフレーム内のコンティグ λ 軽鎖の構築物を生じる。実施例1.4 (a)のように作成された重鎖可変領域(V H) PCR産物(アミノ酸(-4)から(110))は、表1及び2に列記されたプライマーを用い、B s s H I I部位及びB s t E I I部位の間でp7.5 / t k 3.3ヘクロニングされ、完全なs c F vオープンリーディングフレームを形成する。得られる産物は、14個のアミノ酸のリンカーにより接続されたV λ -V H 融合タンパク質の細胞質ゾル型である。このs c F vも、これらの制限部位及びV λ シグナルペプチドの一部によりコードされたアミノ末端で、6個の余分のアミノ酸に先行される。

【0361】

13.3 s c F vの分泌型又は膜結合型 13.2項に説明された細胞質ゾルs c F v発現ベクターを、細胞表面又は細胞外空隙へのs c F vポリペプチドの標的化のために分泌シグナル、膜貫通ドメイン、細胞質ドメイン、又はそれらの組合せをクロニングするプロトタイプベクターとして利用する。シグナルペプチド及び膜係留ドメインの例は、前記表7に示している。細胞外空隙へ分泌されるs c F vポリペプチドを作成するために、インフレーションに分泌シグナルペプチドをコードしているカセットが、p7.5 / t k 3.

10

20

30

40

50

2又はp7.5/tk3.3のNcoI及びApaLI部位の間のscFvポリペプチドのN末端において発現されるように挿入される。Ig架橋又はIg結合を基にした選択のために膜結合したscFvを作成するために、シグナルペプチドに加え、Cμの膜結合型をコードしているカセットが、VHのアミノ酸111～113をコードしているヌクレオチドの下流及びインフレイムで、BstEII及びSalI部位の間のscFvのC末端にクローニングされる。細胞質ドメインも追加される。

【0362】

実施例14

ラクダ化されたヒト単ドメイン抗体ライブラリーの構築

ラクダ種は、重鎖のみを使用し、重鎖抗体と称される抗体が作成される。ポックスウイルス発現システムは、分泌型及び膜結合型の両方のヒト単ドメインライブラリーの作成に改良可能であり、ここでヒトV_Hドメインは、「ラクダ化」、すなわち、ラクダ抗体のV_HHドメインに類似するように変更され、その後これは機能アッセイ又はIg-架橋/結合のいずれかを基に選択され得る。ヒトV_H遺伝子は、標準の突然変異誘発法によりラクダ化され、よりラクダのV_HH遺伝子に類似する。例えば、表1及び2から選択された適当なプライマー対を用い、実施例1.4に説明された方法を用いて作出されたヒトV_H3遺伝子は、G44E、L45R、及びW47G又はIとの置換によりラクダ化される。例えば、Riechmann, L. 及びMuyldermans, S. の論文 (J. Immunol. Meth., 231: 25-38) 参照のこと。分泌型単ドメイン抗体ライブラリーを作成するために、ラクダ化されたヒトV_H遺伝子をコードしているカセットが、実施例1.2に説明されたように作成されたpVHESへクローニングされ、BssHII部位及びBstEII部位の間にインフレイムで発現される。膜結合型単ドメイン抗体ライブラリーを作成するために、ラクダ化されたヒトV_H遺伝子をコードしているカセットが、実施例1.1に説明されたように作出されたpVHEへクローニングされ、BssHII部位及びBstEII部位の間にインフレイムで発現される。ベクターpVHE及びpVHESは既に、NcoI部位とBssHII部位の間にクローニングされたシグナルペプチドを有している。ラクダ化されたヒトV_H遺伝子の3種のCDR領域のアミノ酸残基に、大規模なランダム化が施され、かつ得られたライブラリーは、本明細書に説明されたようにポックスウイルスにおいて選択することができる。

【0363】

実施例15

増強された免疫エフェクター機能に関するFc修飾した抗体の選択

ヒトモノクローナル抗体は、増大しつつあるヒト疾患の治療のために治療的用途に使用される。ヒト抗体は、特異的細胞受容体を介したシグナル伝達を誘導又はブロックすることができる。一部の用途において、ヒト抗体は、抗体分子のFc部分とこれらのエフェクター細胞上のマッチするFc受容体(FcR)の間の相互作用を介して、様々なアクセサリ-エフェクター細胞のいずれかを活性化することができる。従って、FcRを介した結合及びシグナル伝達もしくは補体カスケード成分のような免疫エフェクター機能の他のメディエーターの結合及び活性化を増強又は阻害する免疫グロブリン重鎖定常領域配列の修飾を同定することはかなり興味深い。例えば、米国特許第5,624,821号; Xu, D. ら, Cell Immunol, 200: 16-26 (2000); 及び、米国特許第6,194,551号を参照し、これらはその全体が本明細書に参照として組入れられている。

【0364】

このような特異的エフェクター機能のひとつは、抗体-依存性細胞性細胞傷害作用(ADCC)であり、その過程において、抗体で覆われた標的細胞がNK細胞又は他の単球により破壊される。ADCCは、標的細胞の表面分子を特異的にコードした可変領域及びNK細胞上のFcγRIIIを特異的にコードした定常領域を伴う抗体分子により媒介される。結晶構造及び位置指定突然変異誘発の解析を通して、ヒトIgG1上のFcγRIII結合部位は、主に下側のヒンジ、すなわちIgG1の約アミノ酸247～252、及び隣

10

20

30

40

50

接するCH2領域に局在していることが決定される。例えば、Sarmay G. ら、Mol Immunol、29:633-639(1992)；及び、Michaelson, T. E. ら、Mol. Immunol、29:319-26(1992) 参照のこと。選択可能な哺乳類発現ベクターにおいて無作為に変異された下側ヒンジ領域を伴う抗体分子をコードしている遺伝子のライブラリーを構築することにより、ADCCについて増強された機能を伴う特異的定常領域変種を選択することが実現可能であると考えられる。この戦略の履行を簡略化するために、所望の特異性を付与する定義された免疫グロブリン可変領域配列を伴うライブラリーが構築される。

【0365】

15. 1. pVHE-X及びpVKE-X又はpVLE-Xの構築 プラスミドpVHE-Xは限定された可変領域を伴うヒトVH発現ベクターであり、本明細書においてXと称されるが、これは下記のように構築される。この構築は、図11に示される。限定された特異性Xを伴う抗体は、常法に従い単離されるか、又は本明細書に説明された方法に従い、ボックスウイルスベクターを用い、真核細胞において産生及び選択される。必要であるならば、この抗体のVH遺伝子は、実施例1. 1に記されたように作成されたpVHEへ、BssHI/BstEI部位の間にサブクロニングされ、プラスミドpVHE-Xを得る。更に必要ならば、抗体のVK又はVL遺伝子が、実施例1. 3に記されたように作成されたpVKEへ、ApaLI/XhoI部位の間にサブクロニングされるか、もしくは、実施例1. 3に記されたように作成されたpVLEへ、ApaLI/HindIII部位の間にサブクロニングされ、各々pVKE-X又はpVLE-Xを作成する。

【0366】

15. 2 ヒトCγ1カセットの単離 ヒトCγ1重鎖をコードしているcDNAを、骨髄RNAから、SMAR(登録商標) RACE cDNA増幅キットを用い、下記プライマーにより単離される：

huCγ1-5B：

5'ATTAGGATCCGGTCACCGTC TCCTCAGCC 3'(配列番号 :121)

huCγ1-3S：

5'ATTAGTCGACTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG

3'(配列番号 :122)

【0367】

このPCR産物は、下記エレメントを含む：BamHI-BstEII-(VHのアミノ酸111~113をコードしているヌクレオチド)-(Cγ1のアミノ酸114~478をコードしているヌクレオチド)-TGA-SalI。この産物は、pBluescript II/KSへ、BamHI部位及びSalI部位でサブクロニングされ、Cγ1のCH1ドメイン中のアミノ酸191及び192に相当する第二のBstEII部位が、アミノ酸配列に変化を及ぼすことなく、部位特異的変異誘発により除去される。

【0368】

15. 3 Fcγ1ライブラリーの構築 Cγ1変種は、下記方法による重複PCRにより作成される。15. 2項に説明されたように作成されたBstEII-突然変異誘発したCγ1カセットを、鋳型として使用する。第一回のPCRラウンドにおいて、ふたつの個別の反応においてCγ1-センス/Cγ1-内部-R及びCγ1-内部-S/Cγ1-リバープライマーセットを用い増幅が行われる。

Cγ1-センス：

5'AATATGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3'(配列番号 :123)

Cγ1-内部-R：

10

20

30

40

5'(MNN)₆TTCAGGTGCTGGGCACGG 3' (配列番号 :124)

C_γ1-内部-S :

5'(NNK)₆GTCTTCCTCTTCCCCCA 3' (配列番号 :125)

C_γ1-リバーズ :

5'AATATGTCGACTCATTTACCCGG 3' (配列番号 :126)

(M = A + C、K = G + T、N = A + T + G + C)

C_γ1-内部-R及びC_γ1-内部-Sプライマーは、下側ヒンジにおいて6個のアミノ酸含有残基247～252の変種をコードしている縮重配列尾部を有する。第二回のPCRラウンドにおいて、第一回のラウンドの精製産物が、C_γ1-センス及びC_γ1-リバープライマーセットを用いる、重複PCRにより融合される。

【0369】

得られた産物は、サイズおよそ1000bpであり、6個のアミノ酸位置247～252の各々において無作為に20種全てのアミノ酸をコードしている。このPCR産物は、BstEII及びSalIにより消化され、かつBstEII/SalI-消化された15.1項に説明されたように作成されたpVHE-Xヘクロニングされ、pVHE-X- γ 1変種のライブラリーを作成する。その後これらの変種は、実施例5に説明されたような三分子組換えを用いて、ワクシニアウイルスへ導入される。軽鎖を収容している組換えワクシニアウイルスとの結合において、Fc γ 1ライブラリーは、VHE-X- γ 1発現している抗体へ増強されたADCC活性を付与するFc変種の選択に使用される。

【0370】

15.4 その他の用途 アミノ酸247～252での変種の作成に加え、他の残基、例えばIgG1のアミノ酸278～282及びアミノ酸346～351も、Fc γ RIIIへの結合に関連している。増強されたADCC活性を示すアミノ酸247～252におけるFc γ 1変種の同定後、同じ戦略を用い、ADCC機能の相乗的増強を示す他のふたつの領域内の更なる変異を同定することができる。

【0371】

同じ原理/技術を適用し、異なるFc受容体に結合する他の免疫グロブリン重鎖定常領域アイソタイプにエフェクター機能を付与する変種を同定することができる。好ましい態様において、標的化されるべきこれらの受容体は、Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII-A(CD32)、Fc γ RII-B1、Fc γ RII-B2、Fc γ RIII(CD16)、Fc ϵ RIが含まれる。別の好ましい態様において、補体成分のFc領域の結合又は胎盤経由の輸送のための膜様胎盤へのFc媒介した結合を増強する変種が、選択される。

【0372】

実施例16

特異的免疫グロブリン遺伝子組換えワクシニアウイルスに感染した細胞選択を促進するための重鎖融合タンパク質の構築

16.1 CH1-Fasの構築 Fasの膜貫通ドメイン及びデスドメインに融合されたC μ のヒト重鎖CH1ドメインを含む融合タンパク質をコードしている発現ベクターは、本明細書においてCH1-Fasと称されるが、これが下記の方法により構築される。この融合タンパク質は、図13(a)に図示した。

【0373】

実施例1.1において説明されたように産生されたプラスミドpVHEは、BstEII及びSalIにより消化され、かつ約1.4Kbの比較的小さいDNA断片はゲル精製される。この比較的小さい断片は、その後フォワードプライマーCH1(F)

5'ACACGGTCACCGTCTCCTCAGGGAGTGC3' (配列番号 :127)

10

20

30

40

50

及びリバースプライマー C H 1 (R)
 5'AGTTAGATCT GGATCCTGGA
 AGAGGCACGT T 3' (配列番号 :128).

を使用する P C R 反応における鋳型として使用される。得られた約 3 2 0 塩基対の P C R 産物は、ゲルで精製される。

【 0 3 7 4 】

F a s の膜貫通ドメイン及びデスドメインを含む D N A 断片は、プラスミド p B S - A P O 1 4 . 2 から、フォワードプライマー F A S (F)
 5'AACGTGCCTC TTCCAGGATC CAGATCTAAC 3' (配列番号 :129)

10

及びリバースプライマー F A S (R)
 5'ACGCGTCGAC CTAGACCAAG CTTTGGATT
 CAT 3' (配列番号 :130).

により増幅される。得られた約 5 0 4 塩基対の P C R 産物は、ゲルで精製される。

【 0 3 7 5 】

その後得られた 3 2 0 及び 5 0 4 塩基対の断片は、フォワードプライマー C H 1 (F) 及びリバースプライマー F A S (R) を使用する P C R において一緒にされ、約 8 2 4 塩基対の融合断片を作成する。この断片は、B s t E I I 及び S a l I で消化され、かつ得られた 8 1 0 塩基対の断片はゲルで精製される。プラスミド p V H E も、B s t E I I 及び S a l I で消化され、かつ約 5 . 7 K b の比較的大きい得られた断片がゲルで精製される。これらの 2 種の B s t E I I / S a l I 断片は、その後ライゲーションされ、C H 1 - F a s を作成する。

20

【 0 3 7 6 】

1 6 . 2 C H 4 - F a s の構築 F a s の膜貫通ドメイン及びデスドメインに融合された C μ のヒト重鎖 C H 1 - C H 4 ドメインを含む融合タンパク質をコードしている発現ベクターは、本明細書において C H 4 - F a s と称されるが、これが下記の方法により構築される。この融合タンパク質は、図 1 3 (b) に図示した。

【 0 3 7 7 】

実施例 1 . 1 において説明されたように産生されたプラスミド p V H E は、B s t E I I 及び S a l I により消化され、かつ約 1 . 4 K b の比較的小さい D N A 断片はゲル精製される。この比較的小さい断片は、その後フォワードプライマー C H 4 (F)
 5'CTCTCCCGCG GACGTCTTCG T 3' (配列番号 :131)

30

及びリバースプライマー C H 4 (R)
 5'AGTTAGATCT GGATCCCTCA AAGCCCTCCT C
 3' (配列番号 :132).

を使用する P C R 反応における鋳型として使用される。得られた約 2 8 6 塩基対の P C R 産物は、ゲルで精製される。

40

【 0 3 7 8 】

F a s の膜貫通ドメイン及びデスドメインを含む D N A 断片は、プラスミド p B S - A P O 1 4 . 2 から、フォワードプライマー F A S (F - 2)
 5'GAGGAGGGCTTTGAGGGATC CAGATCTAAC 3' (SEQ ID NO:133)

及び 1 6 . 1 項に記したリバースプライマー F A S (R) により増幅される。得られた約 5 0 4 塩基対の P C R 産物は、ゲルで精製される。

【 0 3 7 9 】

その後得られた 2 6 8 及び 5 0 4 塩基対の断片は、フォワードプライマー C H 4 (F) 及

50

びリバースプライマー F A S (R) を使用する P C R において一緒にされ、約 7 6 5 塩基対の融合断片を作成する。この断片は、S a c I I 及び S a l I で消化され、かつ得られた 7 5 0 塩基対の断片はゲルで精製される。プラスミド p V H E も、S a c I I 及び S a l I で消化され、かつ約 6 . 8 K b の比較的大きい得られた断片がゲルで精製される。これらの 2 種の S a c I I / S a l I 断片は、その後ライゲーションされ、C H 4 - F a s を作成する。

【0380】

1 6 . 3 C H 4 (T M) - F a s の構築 F a s のデスドメインに融合された C μ のヒト重鎖 C H 1 - C H 4 ドメイン及び膜貫通ドメインを含む融合タンパク質をコードしている発現ベクターは、本明細書において C H 4 (T M) - F a s と称されるが、これが下記の方法により構築される。この融合タンパク質は、図 1 3 (c) に図示した。

10

【0381】

実施例 1 . 1 において説明されたように産生されたプラスミド p V H E は、B s t E I I 及び S a l I により消化され、かつ約 1 . 4 K b の比較的小さい D N A 断片はゲル精製される。この比較的小さい断片は、その後 1 6 . 2 項に記されたフォワードプライマー C H 4 (F) 及びリバースプライマー C H 4 (R 2)

5'AATAGTGGTGATATATTTCA CCTTGAACAA 3' (SEQ ID NO:134).

を使用する P C R 反応における鋳型として使用される。得られた約 3 5 6 塩基対の P C R 産物は、ゲルで精製される。

20

【0382】

F a s のデスドメインを含む D N A 断片は、プラスミド p B S - A P O 1 4 . 2 から、フォワードプライマー F A S (F 3)

5'TTGTTCAAGG

TGAAAGTGAA GAGAAAGGAA 3' (SEQ ID NO:135)

及び 1 6 . 1 項に記したリバースプライマー F A S (R) により増幅される。得られた約 4 4 0 塩基対の P C R 産物は、ゲルで精製される。

【0383】

その後得られた 3 5 6 及び 4 4 0 塩基対の断片は、フォワードプライマー C H 4 (F) 及びリバースプライマー F A S (R) を使用する P C R において一緒にされ、約 7 9 5 塩基対の融合断片を作成する。この断片は、S a c I I 及び S a l I で消化され、かつ得られた 7 8 0 塩基対の断片はゲルで精製される。プラスミド p V H E も、S a c I I 及び S a l I で消化され、かつ約 6 . 8 K b の比較的大きい得られた断片がゲルで精製される。これらの 2 種の S a c I I / S a l I 断片は、その後ライゲーションされ、C H 4 (T M) - F a s を作成する。

30

【0384】

1 6 . 4 多様な V H 遺伝子の I g - F a s 融合タンパク質へのクローニング及び挿入

実施例 1 . 4 (a) において説明されたように産生された重鎖可変領域 (V H) P C R 産物 (アミノ酸 (4) から (1 1 0)) は、表 1 及び 2 に列記されたプライマーを用い、C H 1 - F a s 、 C H 4 - F a s 及び C H 4 (T M) - F a s の B s s H I I 部位及び B s t E I I 部位へクローニングされる。C H 1 ドメイン配列と選択された制限酵素部位の間の重複のために、これは、機能性シグナルペプチドは欠いているが、正確な翻訳リーディングフレーム内に維持されているコンティグ重鎖断片の構築物を生じる。

40

【0385】

実施例 1 7

I g α 及び I g β - 発現する H e L a S 3 及び C O S 7 細胞株の作成

細胞表面上において特異的ヒトモノクローナル抗体を発現するために、重鎖及び軽鎖免疫グロブリンは、B 細胞受容体複合体の他のタンパク質と物理的に結合していなければならない。従って宿主細胞がヒト抗体ライブラリーを発現することができるようにするために

50

、これらは、抗体の膜結合した受容体への効率的合成及び集成に必要な分子及び構造を、発現することができなければならない。マウスリンパ腫細胞は、細胞表面上の特異的ヒト抗体の発現に必要な分子及び構造を発現している。しかし、ヒト抗体ライブラリー発現に関するこれらのリンパ腫細胞の使用のひとつの欠点は、内在性に発現された免疫グロブリン重鎖及び／又は軽鎖は、トランスジェニック免疫グロブリン鎖と同時に集成され、非特異的な異質分子の形成を招き、これは抗原特異的受容体を希釈することである。ヒト抗体ライブラリーの発現にマウスリンパ腫細胞を使用する際の別の欠点は、ワクシニアウイルスはリンパ系細胞株において余り複製しないことである。従って、特異的ヒト抗体の発現に好ましい細胞型は、高力価のワクシニアウイルス産生を許容するもの及びB細胞系統に由来しないものである。好ましい細胞型は、HeLa細胞、COS7細胞及びBSC-1細胞を含む。 10

【0386】

B細胞受容体の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖は、Igα及びIgβ膜貫通タンパク質のヘテロ二量体に物理的に結合している(Reth, M., Annu. Rev. Immunol., 10:97(1992))。この物理的結合は、膜結合した免疫グロブリンの細胞表面への効率的輸送、及びB細胞受容体を介したシグナル伝達に必要である(Venkataraman, A. R.ら、Nature, 352:777(1991))。しかし、Igα/Igβヘテロ二量体が異種細胞株における膜結合型免疫グロブリンの発現に必要な十分であるかどうかは不明である。従って、HeLaS3及びCOS7細胞上のヒト抗体の細胞表面発現が、ヒトIgα及びIgβ cDNAによるそれらのトランス 20

【0387】

17. 1 ヒトIgα及びIgβ cDNAのPCRによるクローニング EBV-形質転換されたヒトB細胞から作成されたcDNAを、PCR反応の鋳型として使用し、ヒトIgα及びIgβ cDNAを増幅した。ヒトIgα cDNAを、下記プライマーにより増幅した：

igα 5' -

5'ATTAGAATTCATGCCTGGGGGTCCAGGA3',

本明細書において（配列番号：136）と称す；及び 30

igα 3' -

5'ATTAGGATCCTCACGGCTTCTCCAGCTG3',

本明細書において（配列番号：137）と称す；。

ヒトIgβ cDNAは、下記プライマーにより増幅した：

igβ 5' -

5'ATTAGGATCCATGGCCAGGCTGGCGTTG3',

本明細書において（配列番号：138）と称す；及び 40

igβ 3' -

5'ATTACCAGCACACTGGTCACTCCTGGCCTGGGTG3',

本明細書において（配列番号：139）と称す；。

【0388】

Igα PCR反応由来の産物は、pIRESneo発現ベクター(ClonTech社)に、EcoRI部位及びBamHI部位においてクローニングし、Igβ PCR反応由来のものは、pIREShygベクター(ClonTech社)へBamHI部位及びBstXI部位でクローニングした。クローニングしたIgα及びIgβの同一性は、DNA配列決定により確認した。

【0389】

17. 2 Igα及びIgβ-発現するHeLaS3及びCOS7の安定したトランスフ 50

エクタントの確立 HeLaS3及びCOS7細胞（6-ウェルプレート中 1×10^6 /ウェル）を、精製したpIRESneo-Ig α 及びpIREShyg-Ig β プラスミドDNA各0.5~1 μ gで、LIPOFECTAMINE PLUS試薬（Life technologies社）を用いて、トランスフェクションした。開始の2日後、細胞を、G418（0.4mg/ml）及びヒグロマイシンB（0.2mg/ml）で約2週間選択した。薬物耐性HeLaS3コロニーを、直接単離し、かつCOS7トランスフェクタントを、限定希釈によりクローニングした。これらの各クローンにおけるIg α 及びIg β の発現は、その後RT-PCRにより解析し、代表的クローンの結果を、図14に示した。

【0390】

10

実施例18

高親和性ヒト抗体の多様なライブラリーの構築

本発明は、免疫グロブリン遺伝子の多様なライブラリーのワクシニア又は他のポックスウイルスにおける構築のための唯一利用可能な方法である。ワクシニアベクターは消化され、高レベルの膜受容体発現を生じ、抗原被覆したマトリックスへの効率的結合を可能にする。あるいは、組換え免疫グロブリン重鎖遺伝子を、操作し、抗原による受容体の架橋時にアポトーシスを誘導することができる。ワクシニアウイルスは、プログラムされた細胞死を受けている細胞からであっても容易かつ効率的に回収されるので、このシステムの独自の特性は、特異的ヒト抗体遺伝子の迅速な選択を可能にする。

【0391】

20

最適な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖は、順次選択され、これは全ての利用可能な重鎖及び軽鎖の組合せのスクリーニングにより多様性を最大化する。逐次スクリーニング戦略は、最初に 10^4 個の多様な軽鎖の小さいライブラリーの存在下で、 10^5 個のH鎖組換え体の小さいライブラリーから最適な重鎖を選択する。この最適化されたH鎖は、次に 10^6 ~ 10^7 個の組換えL鎖のより大きいライブラリーからの最適化されたパートナーの選択に使用される。一旦最適なL鎖が選択されたならば、 10^6 ~ 10^7 個の組換えH鎖のより大きいライブラリーから更なる最適化されたH鎖を戻し選択することが可能である。この繰り返しは、 10^{14} 個と多数の H_2L_2 組合せと特異的に高親和性の抗体の選択を可能にするブートストラップ戦略である。対照的に、ファージライブラリーにおける単鎖Fvの又は単プラスミド上にコードされた個別のVH-CH1及びVL-CL遺伝子で構成されたFabの選択は、恐らく 10^{11} 個ファージ粒子という、単ファージライブラリーの実際のサイズの限界により限定される段階プロセスのひとつである。

30

【0392】

10^7 個H鎖及び 10^7 個L鎖の 10^{14} 組合せのスクリーニングは実行不可能であるので、最適のH鎖の選択は、非感染性ベクター中の 10^4 個L鎖の存在下における 10^5 個H鎖ワクシニア組換え体のライブラリーから始まる。これらの組合せは、大部分は様々なエピトープに対する低親和性抗体から生じ、かつ例えば、1~100個の異なるH鎖の選択を招く。基本的抗体に関して100個のH鎖が選択された場合、その後これらは、100個の最適なL鎖パートナーを見つけるために、 10^6 又は 10^7 個のワクシニア組換え体L鎖のより大きいライブラリーによる第二の選択サイクルにおいて使用することができる。その後当初のH鎖は取り分けられ、100個のL鎖を使用し、新たに高親和性H鎖をより大きい 10^6 又は 10^7 個のH鎖ライブラリーから選択する。

40

【0393】

この戦略は、インビトロ親和性成熟の一種である。通常の免疫応答の場合のように、低親和性抗体が最初に選択され、かつ免疫感作の反復サイクルの間のより高親和性子孫の選択の基礎として利用される。より高い親和性クローンはインビボの体細胞変異に由来するが、このインビトロ戦略は、免疫グロブリン鎖の再結合により同じ目的を達成している。両方の場合において、改善された免疫グロブリン鎖のパートナーは、当初の低親和性抗体のパートナーと同じである。

【0394】

50

この戦略の基礎は、低親和性抗体の最初の選択の活用である。低親和性抗体が選択されることは必須である。H鎖及びL鎖の逐次選択するワクシニアベースの方法は、二価抗体の発現から来るアビディティの利点を有するので、これは最初の低親和性選択がうまくいったことを確実にするのによく適している。加えて、抗体発現のレベルは、ワクシニアシステムにおいて様々なプロモーターを使用することにより調節することができる。例えば、ワクシニアに適合されたT7ポリメラーゼシステムは、未変性のワクシニアプロモーターに比べ、高レベルの発現を生じる。初回選択ラウンドは、低親和性「基本的抗体」の選択を確実にするために、高レベルのT7発現システムを基にし、かつ以降の選択ラウンドは、比較的高親和性誘導体の選択を起動するために、低レベル発現を基礎とすることができる。

10

【0395】

ワクシニアにおける免疫グロブリン遺伝子の多様なライブラリー構築に関する本発明の方法の概略を、以下に示す：

1. 本明細書に記された方法に従い、重鎖cDNAライブラリーに結合された免疫グロブリン膜が、ワクシニアウイルスベクターにおいて、ヒトリンパ球から構築される。特に操作された細胞、例えば、CH33細胞、マウス骨髄腫細胞、及びヒトEBV形質転換細胞株、又は好ましくはHeLa細胞、及び競合する免疫グロブリン鎖を産生せずかつワクシニア複製を効率的に支持する他の非リンパ球様細胞が、ウイルスライブラリーにより、平均で各細胞が1個のウイルスの免疫グロブリン重鎖組換え体で感染されているような希釈で、感染される。

20

2. これらの同じ細胞は更に、同じワクシニアウイルスベクターにおいて構築された免疫グロブリン軽鎖ライブラリー由来のソラレン失活された免疫グロブリン軽鎖組換えワクシニアウイルスにより感染される。あるいは、これらの細胞は、プラスミド発現ベクターにおいて、免疫グロブリン軽鎖組換え体によりトランスフェクションされ得る。全体としての細胞集団において、各重鎖は、いずれかの軽鎖に結合することができる。

3. これらの細胞は、細胞表面上で完全に集成された抗体の最適な発現を可能にするために、適当な期間インキュベーションされる。宿主細胞がリンパ球起源でない場合は、膜抗体発現の効率は、Igα及びIgβタンパク質を発現している遺伝子又はcDNAにより安定してトランスフェクションされた宿主細胞、例えば、HeLa細胞又はCos7細胞の使用により、増強される。

30

4a. 関心のある抗原が、不活性ビーズに結合され、これは次に抗体発現している細胞のライブラリーと混合される。抗原で覆われたビーズに結合する細胞は回収され、かつ結合された免疫グロブリン重鎖組換えウイルスが抽出される。

4b. あるいは、蛍光タグが、関心のある抗原に、直接又は間接に結合される。抗原に結合する抗体を発現している細胞が、蛍光標示式細胞分取器（FACS）により回収される。

4c. あるいは、抗体受容体の抗原との架橋が細胞死を誘導する宿主細胞を使用することができる。これは、B細胞系の未成熟細胞である宿主細胞においては自然に生じるか、もしくはこれは免疫グロブリン重鎖定常領域のカルボキシル末端へのFasコードされたデスドメインの取込みの結果である。溶解された細胞は、生存細胞から分離され、関連した免疫グロブリン重鎖を保持する組換えウイルスが抽出される。

40

5. 前記サイクルの段階1～4を、複数回繰り返す、各回組換え体ウイルスを単離し、かつ更に最適な抗原結合に寄与している重鎖について濃縮する。

6. 一旦特異的抗体重鎖が選択されたならば、全体の手順を、最適の抗原結合に寄与する特異的免疫グロブリン軽鎖を選択するために、所有の（proprietary）ワクシニアベクターにおいて構築された免疫グロブリン軽鎖cDNAライブラリーについて繰り返す。重鎖及び軽鎖の逐次選択は、全ての入手可能な重鎖及び軽鎖の組合せのスクリーニングにより、多様性を最大化する。最終的なMAb産物は、単鎖Fv又は単量体Fabよりもむしろ完全に集成された二価抗体の選択により最適化される。

7. MAb配列が決定され、かつ特異的結合が、標準実験的技法を用い検証される。

50

【0396】

最終的M a b産物は、単鎖F vよりむしろ完全に集成された二価抗体の選択により最適化される。すなわち、選択は、s c F v又はF a b断片よりもむしろ二価(H₂L₂)抗体を基にしている。全てヒトの完全抗体の合成及び集成は、哺乳類細胞において、免疫グロブリン鎖が通常の翻訳後修飾及び集成を受けるようにする。完全抗体の合成及び集成は、恐らく細菌細胞においては無効であり、かつ多くの特異性が、細菌細胞の異常な生理的環境における多くの抗体の正確な折畳みの失敗のために喪失される。

【0397】

機能活性を基にした特異性の選択を含む、比較的広範な抗体エピトープ特異性を選択することができる。具体的には、抗体は、標的細胞に対する特異的生理作用を基に選択することができる(例えば、活性化された単球によるT N Fー分泌阻害のスクリーニング; アポトーシス誘導; など)。機能アッセイを基にした特異的M a bのスクリーニング法の概略を以下に示す:

1. 分泌型の免疫グロブリン重鎖c D N Aライブラリーは、本明細書に記された方法に従い調製されたワクシニアウイルスベクターにおいて、ナイーブヒトリンパ球から構築される。例えば、約100~約1000個のような組換えウイルスの複数のプールが、個別に拡張され、かつプロデューサー細胞の、平均で各細胞が1個の免疫グロブリン重鎖組換えウイルスで感染されるような希釈での感染に使用される。これらの同じ細胞も、同じワクシニアウイルスベクターで構築された免疫グロブリン軽鎖ライブラリーからのソラレン失活された免疫グロブリン軽鎖組換えワクシニアウイルスで感染される。あるいは、感染細胞は、プラスミド発現ベクターにおいて、免疫グロブリン軽鎖組換え体によりトランスフェクションされ得る。全体としての細胞集団において、各重鎖は、いずれかの軽鎖に結合することができる。

2. 感染細胞は、完全に集成された抗体が分泌されるのに十分な時間インキュベーションされる。

3. 関心のある機能のインジケーター細胞が分泌された抗体のアリコートが存在下においてインキュベーションされるアッセイウェルを、設定する。これらは、例えば、T N F αを分泌している活性化された単球を含むことができる。次にT N F αのための簡単なE L I S Aアッセイを用い、サイトカイン分泌を阻害する活性を含む抗体プールをスクリーニングすることができる。

4. 選択されたプールの個々のメンバーは更に、関連した免疫グロブリン重鎖を同定するために分析される。

5. 一旦特異的抗体重鎖が選択されたならば、最適な抗原結合に寄与する特異的免疫グロブリン軽鎖を選択するために、所有のワクシニアベクターにおいて構築された免疫グロブリン軽鎖c D N Aライブラリーについて全体の手順が繰り返される。

6. M A b配列が同定され、かつ特異的結合が、標準実験的技法を用い検証される。機能選択は、標的膜受容体の先験的知識を必要としないので、選択されたM a bは、治療の可能性及び関連する膜受容体を同定する道具の発見の両面がある。

【0398】

選択は、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな結合後にヒト細胞培養物中で行われる。前述のように、これは、細菌における合成の制約に起因するレパトア制限を回避する。これは、マウスにおける相同遺伝子産物に対する免疫寛容に起因する抗体レパトアの制限も回避する。重要なヒトタンパク質のマウスホモログは、ヒト配列と80%~85%同一であることが多い。従って、ヒトタンパク質に応答するマウス抗体は、ヒトとマウスにおいて異なるエピトープの15%~20%に主に焦点を当てていると予想される。本発明は、広範なエピトープ特異性を伴う高親和性の全てヒトの抗体の効率的選択を可能にする。この技術は、限定された生理的意義を伴う未同定の膜受容体に対する抗体の機能選択を含む、多種多様なプロジェクト及び目標に適用可能である。

【0399】

本発明は、本発明の個々の局面の一つの例示として意図されている記載された具体的態様

10

20

30

40

50

、本発明の範囲内である機能的に同等である構築物、ウイルス又は酵素により範囲が限定されるものではない。実際に、本明細書に示されかつ説明されたものに加え、本発明の様々な修飾が、当業者には先の説明及び添付図面から明らかであると思われる。このような修飾は、添付された「特許請求の範囲」内に収まることが意図されている。

【0400】

本明細書において言及された全ての刊行物及び特許明細書は、各個別の刊行物及び特許明細書が具体的かつ個別に参照として組入れられていることが示されているのと同程度に、本明細書に参照として組入れられている。1997年9月22日に出願された米国特許出願第08/935,377号、及び2000年3月28日に出願された米国特許出願第60/192,586号の開示及び「特許請求の範囲」は本明細書に参照として組入れられている。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】特異的ヒト抗体の抗原誘導型アポトーシスによる選択。

【図2A】表面免疫グロブリンに架橋している抗原に反応して、直接又は間接に細胞死を受ける宿主細胞の調製。

【図2B】表面免疫グロブリンに架橋している抗原に反応して、CTL-誘導した溶解又は細胞死を受けるようにデザインされた修飾されたCH33宿主細胞のバリデーション。

【図3】pVHEの構築。

【図4】pVKE及びpVLEの構築。

【図5】抗原-依存型接着による特異的ヒト抗体の選択。

20

【図6】三分子組換え法の概略。

【図7】p7.5/tk及びpEL/tkプロモーターのヌクレオチド配列。v7.5/tk（配列番号：140）及びvEL/tk（配列番号：142）に関する、プロモーターのヌクレオチド配列及びチミジンキナーゼ遺伝子の始まりが示され、開始コドン及びオープンリーディングフレームの一部を含む対応するアミノ酸配列は、各々、配列番号：141及び配列番号：143のようにデザインされている。

【図8】pVHEの構築。

【図9】ボックスウイルス媒介した細胞変性作用の減弱。

【図10】scFv発現ベクターの構築。

【図11】pVHE-X-G1の構築。

30

【図12A】p7.5/tk（配列番号：1）ワクシニア伝達性プラスミドのヌクレオチド配列の修飾。新規ベクターp7.5/ATG0/tk（配列番号：2）は、本文中に説明されたようにp7.5/tkワクシニア伝達性プラスミド由来である。

【図12B】新規ベクターp7.5/ATG1/tk（配列番号：3）は、本文中に説明されたようにp7.5/tkワクシニア伝達性プラスミド由来である。

【図12C】新規ベクターp7.5/ATG2/tk（配列番号：4）は、本文中に説明されたようにp7.5/tkワクシニア伝達性プラスミド由来である。

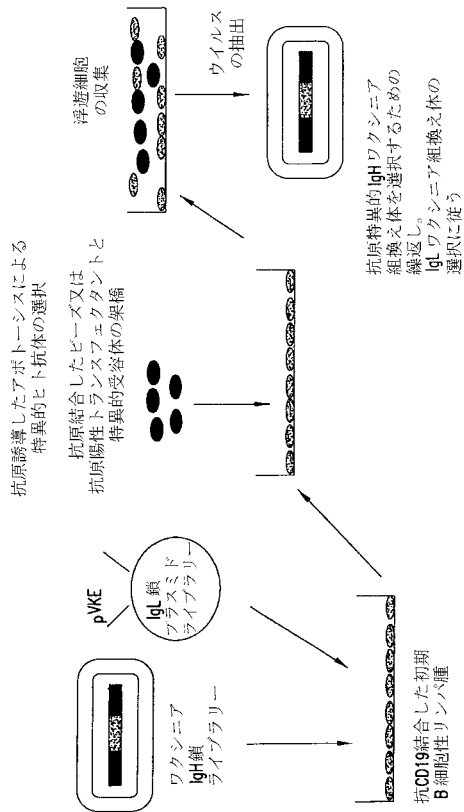
【図12D】新規ベクターp7.5/ATG3/tk（配列番号：5）は、本文中に説明されたようにp7.5/tkワクシニア伝達性プラスミド由来である。

【図13】IgM-Fas融合産物の構築。

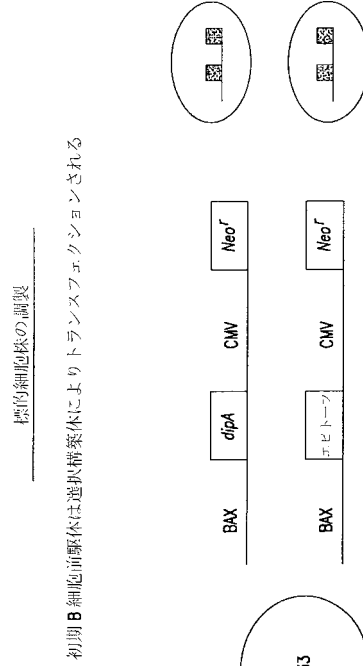
40

【図14】トランスフェクションしたCOS7及びHeLaS3細胞株におけるIgα及びIgβの発現。総RNAは、(A)COS7-Igαβ-1、(B)COS7-Igαβ-2、(C)HeLaS3-Igαβ-1、及び(D)EBV-形質転換したヒトB細胞から単離し、逆転写酵素の存在又は非存在下で、cDNAへ逆転写し、その後igα5'/igα3'及びigβ5'/igβ3'プライマーセットによりPCR増幅した。次に、PCR産物を0.8%アガロースゲル上で分析した。ヒトB細胞は、Igα及びIgβの両方について別のスプライシングを示すことに注意。Hashimoto, S.らの論文(Mol. Immunol.、32:651(1995))参照のこと。

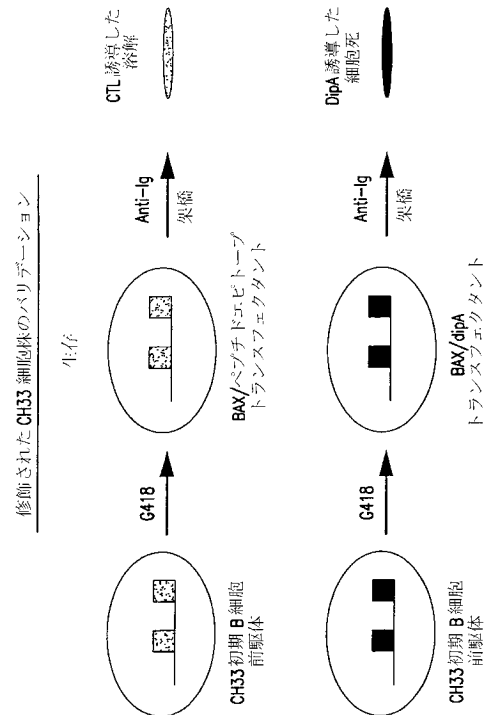
【図 1】



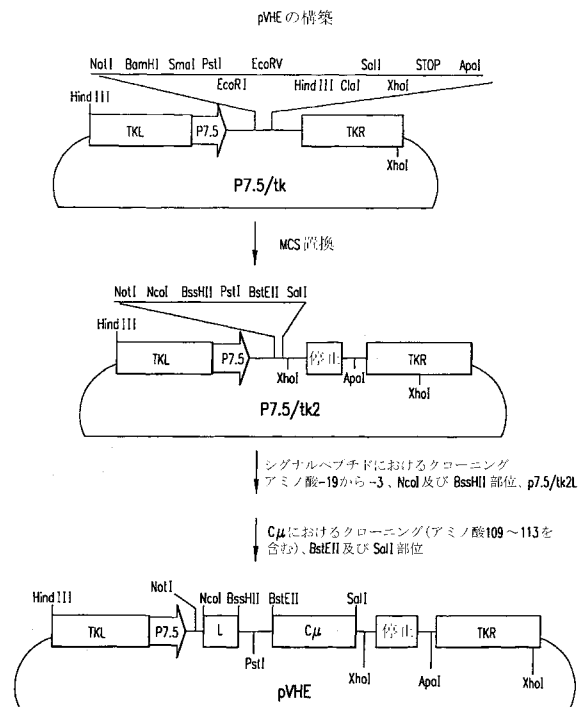
【図 2 A】



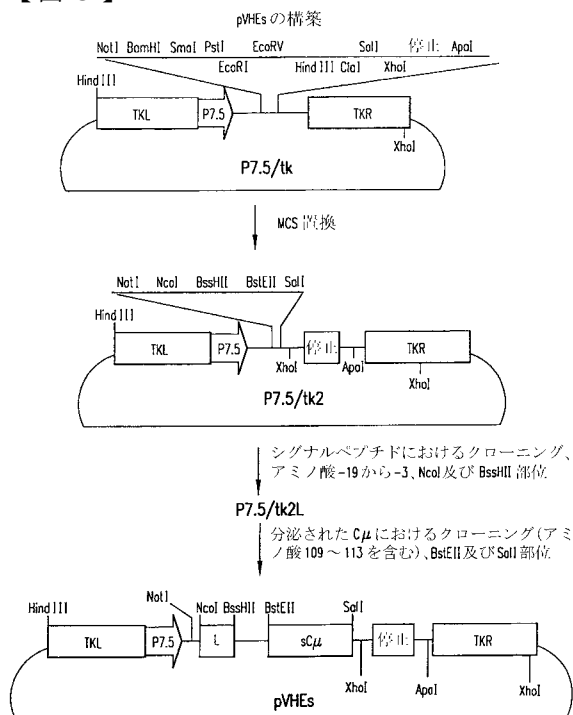
【図 2 B】



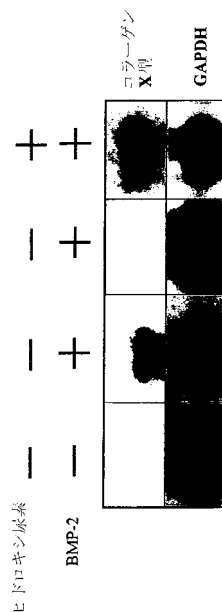
【図 3】



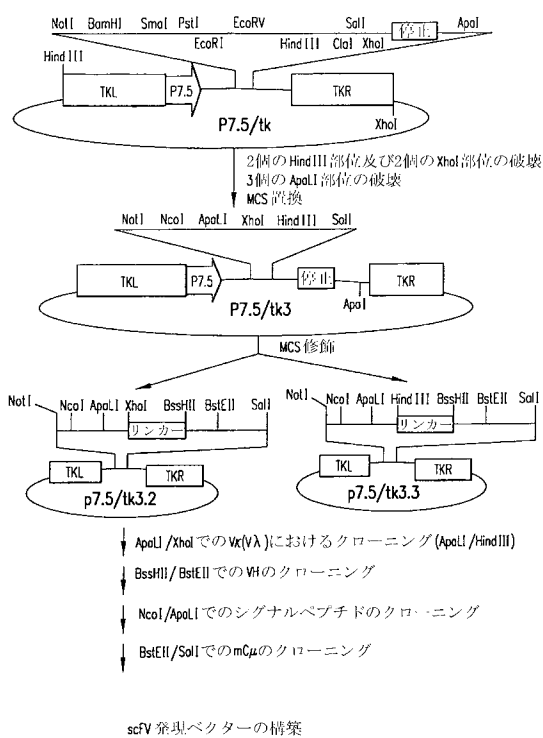
【図 8】



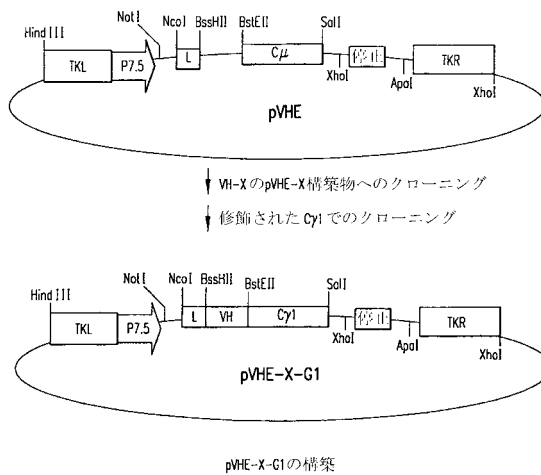
【図 9】



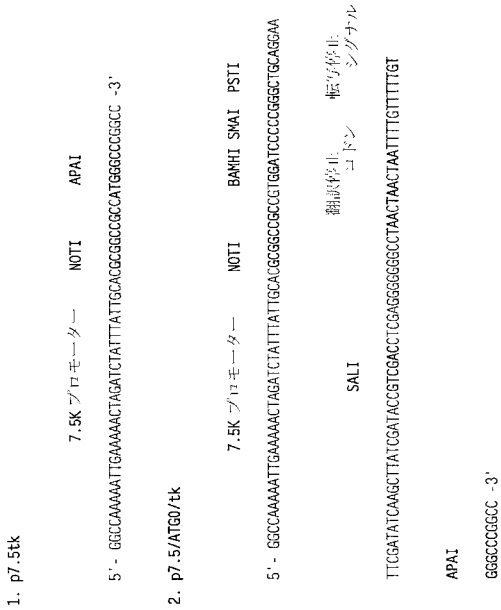
【図 10】



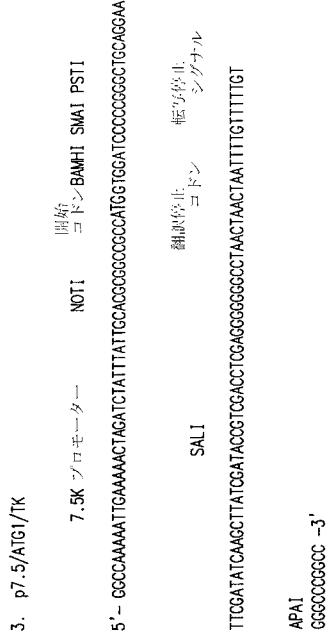
【図 11】



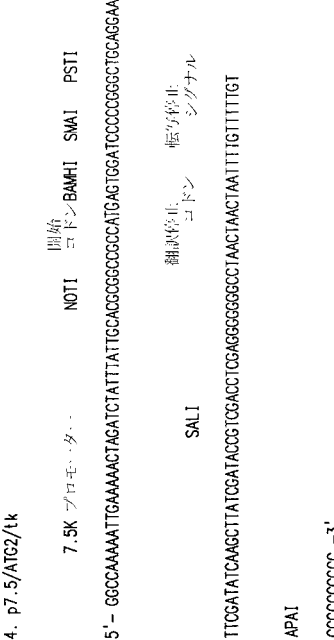
【図 1 2 A】



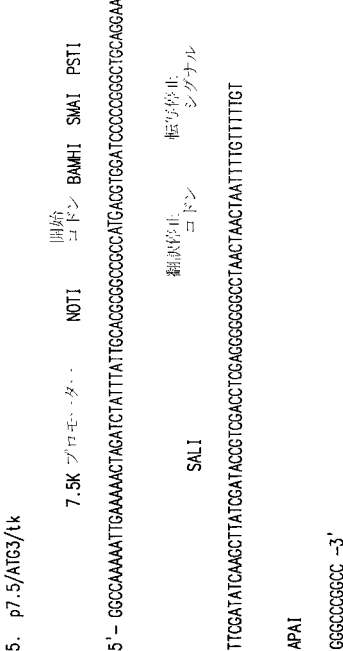
【図 1 2 B】



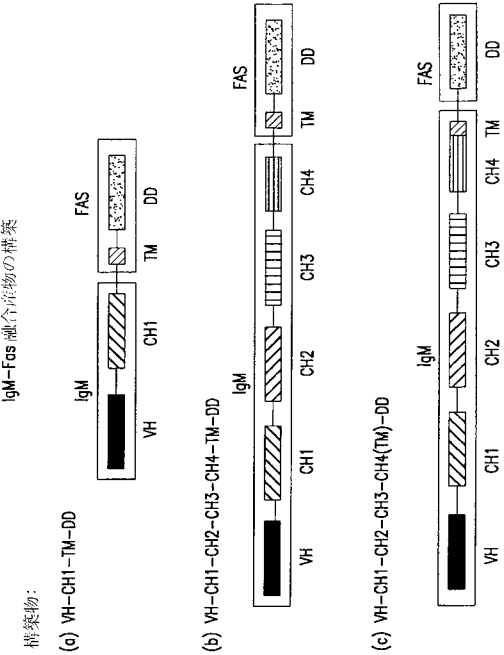
【図 1 2 C】



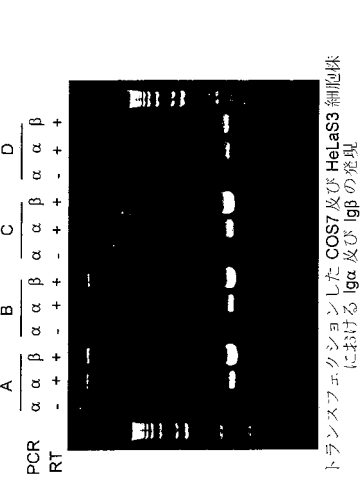
【図 1 2 D】



【図 1 3】



【図 1 4】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/102855 A2

(51) International Patent Classification: C07K 16/00

(74) Agents: STEFFE, Eric, K. et al.; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C., Suite 600, 1100 New York Avenue, N.W., Washington, DC 20005-3934 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/43076

(22) International Filing Date:
14 November 2001 (14.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/249,268 17 November 2000 (17.11.2000) US
60/262,067 18 January 2001 (18.01.2001) US
60/271,424 27 February 2001 (27.02.2001) US
60/298,087 15 June 2001 (15.06.2001) US(81) Designated States (*national*): AT, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (*for all designated States except US*): UNIVERSITY OF ROCHESTER [US/US]; Office of Technology Transfer, 518 Tjylan Building, Rochester, NY 14627-0140 (US).Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): ZAUDERER, Maurice [US/US]; 44 Woodland Road, Pittsford, NY 14534 (US). SMITH, Ernest, S. [US/US]; 328 Boston Road, Ontario, NY 14519 (US).*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/102855 A2

(54) Title: IN VITRO METHODS OF PRODUCING AND IDENTIFYING IMMUNOGLOBULIN MOLECULES IN EUKARYOTIC CELLS

(57) Abstract: The present invention relates to a high efficiency method of expressing immunoglobulin molecules in eukaryotic cells. The invention is further drawn to a method of producing immunoglobulin heavy and light chain libraries, particularly using the trimolecular recombination method, for expression in eukaryotic cells. The invention further provides methods of selecting and screening for antigen-specific immunoglobulin molecules, and antigen-specific fragments thereof. The invention also provides kits for producing, screening and selecting antigen-specific immunoglobulin molecules. Finally, the invention provides immunoglobulin molecules, and antigen-specific fragments thereof, produced by the methods provided herein.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

***In Vitro* Methods of Producing And Identifying
Immunoglobulin Molecules in Eukaryotic Cells**

Background of the Invention

5

Field of the Invention

The present invention relates to a high efficiency method of expressing immunoglobulin molecules in eukaryotic cells, a method of producing immunoglobulin heavy and light chain libraries for expression in eukaryotic cells, methods of isolating immunoglobulins which bind specific antigens, and immunoglobulins produced by any of these methods.

Related Art

15

Immunoglobulin Production

Antibodies of defined specificity are being employed in an increasing number of diverse therapeutic applications.

Defined antibodies directed against self antigens are of particular value for *in vivo* therapeutic and diagnostic purposes. Many rodent monoclonal antibodies have been isolated using hybridoma technology and utilized for *in vivo* therapeutic and diagnostic purposes in humans. For example, an early application of these mouse monoclonal antibodies was as targeting agents to kill or image tumors (F. H. Deland and D. M. Goldenberg 1982 in 'Radionuclide Imaging' ed. D. E. Kuhl pp289-297, Pergamon, Paris; R. Levy and R. A. Miller Ann. Rev. Med. 1983, 34 pp107-116). However, the use of such antibodies *in vivo* can lead to problems. The foreign immunoglobulins can elicit an anti-immunoglobulin response which can interfere with therapy (R. A. Miller et al, 1983 Blood 62 988-995) or cause allergic or immune complex hypersensitivity (B. Ratner, 1943, Allergy, Anaphylaxis and Immunotherapy Williams and Wilkins, Baltimore). Accordingly, it is especially important for such applications to develop antibodies that are not themselves immunogenic in host, for example, to develop antibodies against human antigens that are not themselves immunogenic in humans.

It is a demanding task to isolate an antibody fragment with specificity against self antigen. Animals do not normally produce antibodies to self antigens, a phenomenon called tolerance (Nossal, G. J. *Science* 245:147-153 (1989)). In general, vaccination with a self antigen does not result in production of circulating antibodies. It is therefore difficult to raise antibodies to self antigens.

Previously, three general strategies have been employed to produce immunoglobulin molecules which specifically recognize "self" antigens. In one approach, rodent antibody sequences have been converted into human antibody sequences, by grafting the specialized complementarity-determining regions (CDR) that comprise the antigen-binding site of a selected rodent monoclonal antibody onto the framework regions of a human antibody (Winter, *et al.*, United Kingdom Patent No. GB2188638B (1987); Reichmann, L., *et al.* *Nature* (London) 332:323-327 (1988); Foote, J., and Winter, G. *J. Mol. Biol.* 224:487-499 (1992)). In this approach, which has been termed antibody humanization, the three CDR loops of each rodent immunoglobulin heavy and light chain are grafted into homologous positions of the four framework regions of a corresponding human immunoglobulin chain. Because some of the framework residues also contribute to antibody affinity, the structure must, in general, be further refined by additional framework substitutions to enhance affinity. This can be a laborious and costly process.

More recently, transgenic mice have been generated that express human immunoglobulin sequences (Mendez, M.J., *et al.*, *Nat. Genet.* 15:146-156 (1997)). While this strategy has the potential to accelerate selection of human antibodies, it shares with the antibody humanization approach the limitation that antibodies are selected from the available mouse repertoire which has been shaped by proteins encoded in the mouse genome rather than the human genome. This could bias the epitope specificity of antibodies selected in response to a specific antigen. For example, immunization of mice with a human protein for which a mouse homolog exists might be expected to result predominantly in antibodies specific for those epitopes that are different in humans and mice. These may, however, not be the optimal target epitopes.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-3-

An alternative approach, which does not suffer this same limitation, is to screen recombinant human antibody fragments displayed on bacteriophage (Vaughan, T.J., *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 14:309-314 (1996); Barbas, C.F., III *Nat. Med.* 1:837-839 (1995); Kay, B.K., *et al.* (eds.) "Phage Display of Peptides and Proteins" Academic Press (1996)) In phage display methods, functional immunoglobulin domains are displayed on the surface of a phage particle which carries polynucleotide sequences encoding them. In typical phage display methods, immunoglobulin fragments, *e.g.*, Fab, Fv or disulfide stabilized Fv immunoglobulin domains are displayed as fusion proteins, *i.e.*, fused to a phage surface protein. Examples of phage display methods that can be used to make the antibodies include those disclosed in Brinkman U. *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames, R.S. *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough, C.A. *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic, L. *et al.* (1997) *Gene* 187 9-18; Burton, D.R. *et al.* (1994) *Advances in Immunology* 57:191-280; PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; and U.S. Patents Nos. 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727 and 5,733,743 (said references incorporated by reference in their entireties).

Since phage display methods normally only result in the expression of an antigen-binding fragment of an immunoglobulin molecule, after phage selection, the immunoglobulin coding regions from the phage must be isolated and re-cloned to generate whole antibodies, including human antibodies, or any other desired antigen binding fragment, and expressed in any desired host including mammalian cells, insect cells, plant cells, yeast, and bacteria. For example, techniques to recombinantly produce Fab, Fab' and F(ab')₂ fragments can also be employed using methods known in the art such as those disclosed in WO 92/22324; Mullinax, R.L. *et al.*, *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); and Sawai, H. *et al.*, *AJRI* 34:26-34 (1995); and Better, M. *et al.*, *Science* 240:1041-1043 (1988) (said references incorporated by reference in their entireties).

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-4-

Immunoglobulin libraries constructed in bacteriophage may derive from antibody producing cells of naïve or specifically immunized individuals and could, in principle, include new and diverse pairings of human immunoglobulin heavy and light chains. Although this strategy does not suffer from an intrinsic repertoire limitation, it requires that complementarity determining regions (CDRs) of the expressed immunoglobulin fragment be synthesized and fold properly in bacterial cells. Many antigen binding regions, however, are difficult to assemble correctly as a fusion protein in bacterial cells. In addition, the protein will not undergo normal eukaryotic post-translational modifications. As a result, this method imposes a different selective filter on the antibody specificities that can be obtained.

There is a need, therefore, for an alternative method to identify immunoglobulin molecules, and antigen-specific fragments thereof, from an unbiased immunoglobulin repertoire that can be synthesized, properly glycosylated and correctly assembled in eukaryotic cells.

Eukaryotic Expression Libraries. A basic tool in the field of molecular biology is the conversion of poly(A)⁺ mRNA to double-stranded (ds) cDNA, which then can be inserted into a cloning vector and expressed in an appropriate host cell. A method common to many cDNA cloning strategies involves the construction of a "cDNA library" which is a collection of cDNA clones derived from the poly(A)⁺ mRNA derived from a cell of the organism of interest. For example, in order to isolate cDNAs which express immunoglobulin genes, a cDNA library might be prepared from pre B cells, B cells, or plasma cells. Methods of constructing cDNA libraries in different expression vectors, including filamentous bacteriophage, bacteriophage lambda, cosmids, and plasmid vectors, are known. Some commonly used methods are described, for example, in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, publisher, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

Many different methods of isolating target genes from cDNA libraries have been utilized, with varying success. These include, for example, the use of nucleic acid hybridization probes, which are labeled nucleic acid fragments

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-5-

having sequences complementary to the DNA sequence of the target gene. When this method is applied to cDNA clones in transformed bacterial hosts, colonies or plaques hybridizing strongly to the probe are likely to contain the target DNA sequences. Hybridization methods, however, do not require, and do not measure, whether a particular cDNA clone is expressed. Alternative screening methods rely on expression in the bacterial host, for example, colonies or plaques can be screened by immunoassay for binding to antibodies raised against the protein of interest. Assays for expression in bacterial hosts are often impeded, however, because the protein may not be sufficiently expressed in bacterial hosts, it may be expressed in the wrong conformation, and it may not be processed, and/or transported as it would in a eukaryotic system. Many of these problems have been encountered in attempts to produce immunoglobulin molecules in bacterial hosts, as alluded to above.

Accordingly, use of mammalian expression libraries to isolate cDNAs encoding immunoglobulin molecules would offer several advantages over bacterial libraries. For example, immunoglobulin molecules, and subunits thereof, expressed in eukaryotic hosts should be functional and should undergo any normal posttranslational modification. A protein ordinarily transported through the intracellular membrane system to the cell surface should undergo the complete transport process. Further, use of a eukaryotic system would make it possible to isolate polynucleotides based on functional expression of eukaryotic RNA or protein. For example, immunoglobulin molecules could be isolated based on their specificity for a given antigen.

With the exception of some recent lymphokine cDNAs isolated by expression in COS cells (Wong, G. G., *et al.*, *Science* 228:810-815 (1985); Lee, F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2061-2065 (1986); Yokota, T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5894-5898 (1986); Yang, Y., *et al.*, *Cell* 47:3-10 (1986)), few cDNAs have been isolated from mammalian expression libraries. There appear to be two principal reasons for this: First, the existing technology (Okayama, H. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 2:161-170 (1982)) for construction of large plasmid libraries is difficult to master, and library size rarely approaches that

accessible by phage cloning techniques. (Huynh, T. *et al.*, In: *DNA Cloning Vol. I, A Practical Approach*, Glover, D. M. (ed.), IRL Press, Oxford (1985), pp. 49-78). Second, the existing vectors are, with one exception (Wong, G. G., *et al.*, *Science* 228:810-815 (1985)), poorly adapted for high level expression. Thus, expression in mammalian hosts previously has been most frequently employed solely as a means of verifying the identity of the protein encoded by a gene isolated by more traditional cloning methods.

Poxvirus Vectors. Poxvirus vectors are used extensively as expression vehicles for protein and antigen expression in eukaryotic cells. The ease of cloning and propagating vaccinia in a variety of host cells has led to the widespread use of poxvirus vectors for expression of foreign protein and as vaccine delivery vehicles (Moss, B., *Science* 252:1662-7 (1991)).

Large DNA viruses are particularly useful expression vectors for the study of cellular processes as they can express many different proteins in their native form in a variety of cell lines. In addition, gene products expressed in recombinant vaccinia virus have been shown to be efficiently processed and presented in association with MHC class I for stimulation of cytotoxic T cells. The gene of interest is normally cloned in a plasmid under the control of a promoter flanked by sequences homologous to a non-essential region in the virus and the cassette is introduced into the genome via homologous recombination. A panoply of vectors for expression, selection and detection have been devised to accommodate a variety of cloning and expression strategies. However, homologous recombination is an ineffective means of making a recombinant virus in situations requiring the generation of complex libraries or when the insert DNA is large. An alternative strategy for the construction of recombinant genomes relying on direct ligation of viral DNA "arms" to an insert and the subsequent rescue of infectious virus has been explored for the genomes of poxvirus (Merchinskyy, *et al.*, 1992, *Virology* 190:522-526; Pfleiderer, *et al.*, 1995, *J. General Virology* 76:2957-2962; Scheiflinger, *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9977-9981), herpesvirus (Rixon, *et al.*, 1990, *J. General*

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-7-

Virology 71:2931-2939) and baculovirus (Ernst, *et al.*, 1994, Nucleic Acids Research 22:2855-2856).

Poxviruses are ubiquitous vectors for studies in eukaryotic cells as they are easily constructed and engineered to express foreign proteins at high levels.

5 The wide host range of the virus allows one to faithfully express proteins in a variety of cell types. Direct cloning strategies have been devised to extend the scope of applications for poxvirus viral chimeras in which the recombinant genomes are constructed *in vitro* by direct ligation of DNA fragments to vaccinia "arms" and transfection of the DNA mixture into cells infected with a helper virus (Merchlinsky, *et al.*, 1992, Virology 190:522-526; Scheiflinger, *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9977-9981). This approach has been used for high level expression of foreign proteins (Pfleiderer, *et al.*, 1995, J. Gen. Virology 76:2957-2962) and to efficiently clone fragments as large as 26 kilobases in length (Merchlinsky, *et al.*, 1992, Virology 190:522-526).

15 Naked vaccinia virus DNA is not infectious because the virus cannot utilize cellular transcriptional machinery and relies on its own proteins for the synthesis of viral RNA. Previously, temperature sensitive conditional lethal (Merchlinsky, *et al.*, 1992, Virology 190:522-526) or non-homologous poxvirus fowlpox (Scheiflinger, *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9977-9981) have been utilized as helper virus for packaging. An ideal helper virus will efficiently facilitate the production of infectious virus from input DNA, but will not replicate in the host cell or recombine with the vaccinia DNA products. Fowlpox virus is a very useful helper virus for these reasons. It can enter mammalian cells and provide proteins required for the replication of input vaccinia virus DNA. However, it does not recombine with vaccinia DNA, and infectious fowlpox virions are not produced in mammalian cells. Therefore, it can be used at relatively high multiplicity of infection (MOI).

25 Customarily, a foreign protein coding sequence is introduced into the poxvirus genome by homologous recombination with infectious virus. In this traditional method, a previously isolated foreign DNA is cloned in a transfer plasmid behind a vaccinia promoter flanked by sequences homologous to a region

30

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-8-

in the poxvirus which is non-essential for viral replication. The transfer plasmid is introduced into poxvirus-infected cells to allow the transfer plasmid and poxvirus genome to recombine *in vivo* via homologous recombination. As a result of the homologous recombination, the foreign DNA is transferred to the viral genome.

Although traditional homologous recombination in poxviruses is useful for expression of previously isolated foreign DNA in a poxvirus, the method is not conducive to the construction of libraries, since the overwhelming majority of viruses recovered have not acquired a foreign DNA insert. Using traditional homologous recombination, the recombination efficiency is in the range of approximately 0.1% or less. Thus, the use of poxvirus vectors has been limited to subcloning of previously isolated DNA molecules for the purposes of protein expression and vaccine development.

Alternative methods using direct ligation vectors have been developed to efficiently construct chimeric genomes in situations not readily amenable for homologous recombination (Merchlinsky, M. *et al.*, 1992, *Virology* 190:522-526; Scheiflinger, F. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:9977-9981). In such protocols, the DNA from the genome is digested, ligated to insert DNA *in vitro*, and transfected into cells infected with a helper virus (Merchlinsky, M. *et al.*, 1992, *Virology* 190:522-526, Scheiflinger, F. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9977-9981). In one protocol, the genome was digested at a unique NotI site and a DNA insert containing elements for selection or detection of the chimeric genome was ligated to the genomic arms (Scheiflinger, F. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:9977-9981). This direct ligation method was described for the insertion of foreign DNA into the vaccinia virus genome (Pfleiderer *et al.*, 1995, *J. General Virology* 76:2957-2962).

Alternatively, the vaccinia WR genome was modified to produce vNotI/tk by removing the NotI site in the HindIII F fragment and reintroducing a NotI site proximal to the thymidine kinase gene such that insertion of a sequence at this locus disrupts the thymidine kinase gene, allowing isolation of chimeric genomes via use of drug selection (Merchlinsky, M. *et al.*, 1992, *Virology* 190:522-526).

The direct ligation vector vNotI/tk allows one to efficiently clone and propagate previously isolated DNA inserts at least 26 kilobase pairs in length (Merchinskyy, M. *et al.*, 1992, Virology, 190:522-526). Although large DNA fragments are efficiently cloned into the genome, proteins encoded by the DNA insert will only
5 be expressed at the low level corresponding to the thymidine kinase gene, a relatively weakly expressed early class gene in vaccinia. In addition, the DNA will be inserted in both orientations at the NotI site, and therefore might not be expressed at all. Additionally, although the recombination efficiency using direct ligation is higher than that observed with traditional homologous recombination,
10 the resulting titer is relatively low.

Accordingly, poxvirus vectors were previously not used to identify previously unknown genes of interest from a complex population of clones, because a high efficiency, high titer-producing method of cloning did not exist for poxviruses. More recently, however, the present inventor developed a method
15 for generating recombinant poxviruses using tri-molecular recombination. See Zauderer, WO 00/028016, published May 18, 2000, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Tri-molecular recombination is a novel, high efficiency, high titer-producing method for producing recombinant poxviruses. Using the tri-molecular recombination method in vaccinia virus, the present inventor has
20 achieved recombination efficiencies of at least 90%, and titers at least 2 orders of magnitude higher, than those obtained by direct ligation. According to the tri-molecular recombination method, a poxvirus genome is cleaved to produce two nonhomologous fragments or "arms." A transfer vector is produced which carries
25 the heterologous insert DNA flanked by regions of homology with the two poxvirus arms. The arms and the transfer vector are delivered into a recipient host cell, allowing the three DNA molecules to recombine *in vivo*. As a result of the recombination, a single poxvirus genome molecule is produced which comprises each of the two poxvirus arms and the insert DNA.

Summary of the Invention

5 In accordance with one aspect of the present invention, there is provided a method of identifying polynucleotides which encode an antigen-specific immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, from libraries of polynucleotides expressed in eukaryotic cells.

Also provided is a method of identifying polynucleotides which encode immunoglobulin molecules, or fragments thereof, which possess altered effector
10 function.

Also provided is a method of constructing libraries of polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides in eukaryotic cells using virus vectors, where the libraries are constructed by trimolecular recombination.

Further provided are methods of identifying host cells expressing antigen-specific immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof on
15 their surface by selecting and/or screening for antigen-induced cell death, antigen-induced signaling, or antigen-specific binding.

Also provided are methods of screening for soluble immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, expressed from eukaryotic host
20 cells expressing libraries of polynucleotides encoding soluble secreted immunoglobulin molecules, through antigen binding or through detection of an antigen- or organism-specific function of the immunoglobulin molecule.

Brief Description of the Figures

25 FIG. 1. Selection for specific human antibody by antigen-induced apoptosis.

FIG. 2A. Preparation of host cells which directly or indirectly undergo cell death in response to antigen cross linking of surface immunoglobulins.

FIG. 2B. Validation of modified CH33 host cells designed to undergo CTL-induced lysis or cell death in response to antigen cross linking of surface immunoglobulins.

FIG. 3. Construction of pVHE

FIG. 4. Construction of pVKE and pVLE

FIG. 5. Selection for Specific Human Antibody by Antigen-dependent Adherence

FIG. 6. Schematic of the Tri-Molecular Recombination Method.

FIG. 7. Nucleotide Sequence of p7.5/tk and pEL/tk promoters. The nucleotide sequence of the promoter and beginning of the thymidine kinase gene for v7.5/tk (SEQ ID NO: 140) and vEL/tk is shown (SEQ ID NO: 142), and the corresponding amino acid sequence including the initiator codon and a portion of the open reading frame, designated wherein as SEQ ID NO: 141 and SEQ ID NO: 143, respectively.

FIG. 8. Construction of pVHEs.

FIG. 9. Attenuation of poxvirus-mediated cytopathic effects.

FIG. 10 Construction of scFv expression vectors.

FIG. 11 Construction of pVHE-X-G1.

FIG. 12A A modification in the nucleotide sequence of the p7.5/tk (SEQ ID NO:1) vaccinia transfer plasmid. A new vector, p7.5/ATG0/tk (SEQ ID NO:2), derived as described in the text from the p7.5/tk vaccinia transfer plasmid.

FIG. 12B A new vector, p7.5/ATG1/tk (SEQ ID NO:3) derived as described in the text from the p7.5/tk vaccinia transfer plasmid.

FIG. 12C A new vector, p7.5/ATG2/tk (SEQ ID NO:4) derived as described in the text from the p7.5/tk vaccinia transfer plasmid.

FIG. 12D A new vector, p7.5/ATG3/tk (SEQ ID NO:5) derived as described in the text from the p7.5/tk vaccinia transfer plasmid.

FIG. 13 Construction of IgM-Fas fusion products.

FIG 14. Expression of Ig α and Ig β in the transfected COS7 and HeLaS3 cell lines. Total RNA was isolated from (A) COS7-Ig $\alpha\beta$ -1, (B) COS7-Ig $\alpha\beta$ -2, (C) HeLaS3-Ig $\alpha\beta$ -1 and (D) EBV-transformed human B cells, reverse transcribed

into cDNA in the presence or absence of reverse transcriptase, then PCR amplified with the $\text{ig}\alpha 5'/\text{ig}\alpha 3'$ and $\text{ig}\beta 5'/\text{ig}\beta 3'$ primer sets. PCR products were then analyzed on 0.8% agarose gels. It should be noted that human B cells exhibit alternative splicing for both Ig α and Ig β . See, e.g., Hashimoto, S., *et al.*, *Mol. Immunol.* 32:651 (1995).

Detailed Description of the Preferred Embodiments

The present invention is broadly directed to methods of identifying and/or producing functional, antigen-specific immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments (*i.e.*, antigen-binding fragments) thereof, in a eukaryotic system. In addition, the invention is directed to methods of identifying polynucleotides which encode an antigen-specific immunoglobulin molecule, or an antigen-specific fragment thereof, from complex expression libraries of polynucleotides encoding such immunoglobulin molecules or fragments, where the libraries are constructed and screened in eukaryotic host cells. Further embodiments include an isolated antigen-specific immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, produced by any of the above methods, and a kit allowing production of such isolated immunoglobulins.

A particularly preferred aspect of the present invention is the construction of complex immunoglobulin libraries in eukaryotic host cells using poxvirus vectors constructed by trimolecular recombination. The ability to construct complex cDNA libraries in a pox virus based vector and to select and/or screen for specific recombinants on the basis of either antigen induced cell death, antigen induced signaling, or antigen-specific binding can be the basis for identification of immunoglobulins, particularly human immunoglobulins, with a variety of well-defined specificities in eukaryotic cells. It would overcome the bias imposed by selection of antibody repertoire in rodents or the limitations of synthesis and assembly in phage or bacteria.

It is to be noted that the term "a" or "an" entity, refers to one or more of that entity; for example, "an immunoglobulin molecule," is understood to

represent one or more immunoglobulin molecules. As such, the terms "a" (or "an"), "one or more," and "at least one" can be used interchangeably herein.

The term "eukaryote" or "eukaryotic organism" is intended to encompass all organisms in the animal, plant, and protist kingdoms, including protozoa, fungi, yeasts, green algae, single celled plants, multi celled plants, and all animals, both vertebrates and invertebrates. The term does not encompass bacteria or viruses. A "eukaryotic cell" is intended to encompass a singular "eukaryotic cell" as well as plural "eukaryotic cells," and comprises cells derived from a eukaryote.

The term "vertebrate" is intended to encompass a singular "vertebrate" as well as plural "vertebrates," and comprises mammals and birds, as well as fish, reptiles, and amphibians.

The term "mammal" is intended to encompass a singular "mammal" and plural "mammals," and includes, but is not limited to humans; primates such as apes, monkeys, orangutans, and chimpanzees; canids such as dogs and wolves; felids such as cats, lions, and tigers; equids such as horses, donkeys, and zebras; food animals such as cows, pigs, and sheep; ungulates such as deer and giraffes; rodents such as mice, rats, hamsters and guinea pigs; and bears. Preferably, the mammal is a human subject.

The terms "tissue culture" or "cell culture" or "culture" or "culturing" refer to the maintenance or growth of plant or animal tissue or cells *in vitro* under conditions that allow preservation of cell architecture, preservation of cell function, further differentiation, or all three. "Primary tissue cells" are those taken directly from tissue, *i.e.*, a population of cells of the same kind performing the same function in an organism. Treating such tissue cells with the proteolytic enzyme trypsin, for example, dissociates them into individual primary tissue cells that grow or maintain cell architecture when seeded onto culture plates. Cell cultures arising from multiplication of primary cells in tissue culture are called "secondary cell cultures." Most secondary cells divide a finite number of times and then die. A few secondary cells, however, may pass through this "crisis period," after which they are able to multiply indefinitely to form a continuous

"cell line." The liquid medium in which cells are cultured is referred to herein as "culture medium" or "culture media." Culture medium into which desired molecules, *e.g.*, immunoglobulin molecules, have been secreted during culture of the cells therein is referred to herein as "conditioned medium."

5 The term "polynucleotide" refers to any one or more nucleic acid segments, or nucleic acid molecules, *e.g.*, DNA or RNA fragments, present in a nucleic acid or construct. A "polynucleotide encoding an immunoglobulin subunit polypeptide" refers to a polynucleotide which comprises the coding region for such a polypeptide. In addition, a polynucleotide may encode a
10 regulatory element such as a promoter or a transcription terminator, or may encode a specific element of a polypeptide or protein, such as a secretory signal peptide or a functional domain.

As used herein, the term "identify" refers to methods in which desired molecules, *e.g.*, polynucleotides encoding immunoglobulin molecules with a
15 desired specificity or function, are differentiated from a plurality or library of such molecules. Identification methods include "selection" and "screening." As used herein, "selection" methods are those in which the desired molecules may be directly separated from the library. For example, in one selection method described herein, host cells comprising the desired polynucleotides are directly
20 separated from the host cells comprising the remainder of the library by undergoing a lytic event and thereby being released from the substrate to which the remainder of the host cells are attached. As used herein, "screening" methods are those in which pools comprising the desired molecules are subjected to an assay in which the desired molecule can be detected. Aliquots of the pools in
25 which the molecule is detected are then divided into successively smaller pools which are likewise assayed, until a pool which is highly enriched from the desired molecule is achieved. For example, in one screening method described herein, pools of host cells comprising library polynucleotides encoding immunoglobulin molecules are assayed for antigen binding through expression of a reporter
30 molecule.

Immunoglobulins. As used herein, an "immunoglobulin molecule" is defined as a complete, bi-molecular immunoglobulin, *i.e.*, generally comprising four "subunit polypeptides," *i.e.*, two identical heavy chains and two identical light chains. In some instances, *e.g.*, immunoglobulin molecules derived from camelid species or engineered based on camelid immunoglobulins, a complete immunoglobulin molecule may consist of heavy chains only, with no light chains. See, *e.g.*, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993). Thus, by an "immunoglobulin subunit polypeptide" is meant a single heavy chain polypeptide or a single light chain polypeptide. Immunoglobulin molecules are also referred to as "antibodies," and the terms are used interchangeably herein. An "isolated immunoglobulin" refers to an immunoglobulin molecule, or two or more immunoglobulin molecules, which are substantially removed from the milieu of proteins and other substances, and which bind a specific antigen.

The heavy chain, which determines the "class" of the immunoglobulin molecule, is the larger of the two subunit polypeptides, and comprises a variable region and a constant region. By "heavy chain" is meant either a full-length secreted heavy chain form, *i.e.*, one that is released from the cell, or a membrane bound heavy chain form, *i.e.*, comprising a membrane spanning domain and an intracellular domain. The membrane spanning and intracellular domains can be the naturally-occurring domains associated with a certain heavy chain, *i.e.*, the domain found on memory B-cells, or it may be a heterologous membrane spanning and intracellular domain, *e.g.*, from a different immunoglobulin class or from a heterologous polypeptide, *i.e.*, a non-immunoglobulin polypeptide. As will become apparent, certain aspects of the present invention are preferably carried out using cell membrane-bound immunoglobulin molecules, while other aspects are preferably carried out with using secreted immunoglobulin molecules, *i.e.*, those lacking the membrane spanning and intracellular domains. Immunoglobulin "classes" refer to the broad groups of immunoglobulins which serve different functions in the host. For example, human immunoglobulins are divided into five classes, *i.e.*, IgG, comprising a γ heavy chain, IgM, comprising a μ heavy chain, IgA, comprising an α heavy chain, IgE, comprising an ϵ heavy

chain, and IgD, comprising a δ heavy chain. Certain classes of immunoglobulins are also further divided into "subclasses." For example, in humans, there are four different IgG subclasses, IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 comprising γ -1, γ -2, γ -3, and γ -4 heavy chains, respectively, and two different IgA subclasses, IgA-1 and IgA-2, comprising α -1 and α -2 heavy chains, respectively. It is to be noted that the class and subclass designations of immunoglobulins vary between animal species, and certain animal species may comprise additional classes of immunoglobulins. For example, birds also produce IgY, which is found in egg yolk.

By "light chain" is meant the smaller immunoglobulin subunit which associates with the amino terminal region of a heavy chain. As with a heavy chain, a light chain comprises a variable region and a constant region. There are two different kinds of light chains, κ and λ , and a pair of these can associate with a pair of any of the various heavy chains to form an immunoglobulin molecule.

Immunoglobulin subunit polypeptides each comprise a constant region and a variable region. In most species, the heavy chain variable region, or V_H domain, and the light chain variable region, or V_L domain, combine to form a "complementarity determining region" or CDR, the portion of an immunoglobulin molecule which specifically recognizes an antigenic epitope. In camelid species, however, the heavy chain variable region, referred to as V_HH , forms the entire CDR. The main differences between camelid V_HH variable regions and those derived from conventional antibodies (V_H) include (a) more hydrophobic amino acids in the light chain contact surface of V_H as compared to the corresponding region in V_HH , (b) a longer CDR3 in V_HH , and (c) the frequent occurrence of a disulfide bond between CDR1 and CDR3 in V_HH . Each complete immunoglobulin molecule comprises two identical CDRs. A large repertoire of variable regions associated with heavy and light chain constant regions are produced upon differentiation of antibody-producing cells in an animal through rearrangements of a series of germ line DNA segments which results in the formation of a gene which encodes a given variable region. Further variations of heavy and light chain variable regions take place through somatic mutations in

differentiated cells. The structure and *in vivo* formation of immunoglobulin molecules is well understood by those of ordinary skill in the art of immunology. Concise reviews of the generation of immunoglobulin diversity may be found, *e.g.*, in Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988) (hereinafter, "Harlow"); and Roitt, *et al.*, *Immunology* Gower Medical Publishing, Ltd., London (1985) (hereinafter, "Roitt"). Harlow and Roitt are incorporated herein by reference in their entirety.

Immunoglobulins further have several effector functions mediated by binding of effector molecules. For example, binding of the C1 component of complement to an immunoglobulin activates the complement system. Activation of complement is important in the opsonisation and lysis of cell pathogens. The activation of complement also stimulates the inflammatory response and may also be involved in autoimmune hypersensitivity. Further, immunoglobulins bind to cells via the Fc region, with an Fc receptor site on the antibody Fc region binding to an Fc receptor (FcR) on a cell. There are a number of Fc receptors which are specific for different classes of antibody, including, but not limited to, IgG (gamma receptors), IgE (eta receptors), IgA (alpha receptors) and IgM (mu receptors). Binding of antibody to Fc receptors on cell surfaces triggers a number of important and diverse biological responses including engulfment and destruction of antibody-coated particles, clearance of immune complexes, lysis of antibody-coated target cells by killer cells (called antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, or ADCC), release of inflammatory mediators, placental transfer and control of immunoglobulin production.

Immunoglobulins of the present invention may be from any animal origin including birds, fish, and mammals. Preferably, the antibodies are of human, mouse, dog, cat, rabbit, goat, guinea pig, camel, llama, horse, or chicken origin. In a preferred aspect of the present invention, immunoglobulins are identified which specifically interact with "self" antigens, *e.g.*, human immunoglobulins which specifically bind human antigens.

As used herein, an "antigen-specific fragment" of an immunoglobulin molecule is any fragment or variant of an immunoglobulin molecule which

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-18-

remains capable of binding an antigen. Antigen-specific fragments include, but are not limited to, Fab, Fab' and F(ab')₂, Fd, single-chain Fvs (scFv), single-chain immunoglobulins (*e.g.*, wherein a heavy chain, or portion thereof, and light chain, or portion thereof, are fused), disulfide-linked Fvs (sdFv), diabodies, triabodies, 5 tetrabodies, scFv minibodies, Fab minibodies, and dimeric scFv and any other fragments comprising a V_L and a V_H domain in a conformation such that a specific CDR is formed. Antigen-specific fragments may also comprise a V_HH domain derived from a camelid antibody. The V_HH may be engineered to include CDRs from other species, for example, from human antibodies. Alternatively, 10 a human-derived heavy chain V_H fragment may be engineered to resemble a single-chain camelid CDR, a process referred to as "camelization." See, *e.g.*, Davies J., and Riechmann, L., *FEBS Letters* 339:285-290 (1994), and Riechmann, L., and Muyldermans, S., *J. Immunol. Meth.* 231:25-38 (1999), both of which are incorporated herein by reference in their entireties.

Antigen-specific immunoglobulin fragments, including single-chain immunoglobulins, may comprise the variable region(s) alone or in combination with the entire or partial of the following: a heavy chain constant domain, or portion thereof, *e.g.*, a CH1, CH2, CH3, transmembrane, and/or cytoplasmic domain, on the heavy chain, and a light chain constant domain, *e.g.*, a C_κ or C_λ 20 domain, or portion thereof on the light chain. Also included in the invention are any combinations of variable region(s) and CH1, CH2, CH3, C_κ, C_λ, transmembrane and cytoplasmic domains.

As is known in the art, Fv comprises a V_H domain and a V_L domain, Fab comprises V_H joined to CH1 and an L chain, a Fab minibody comprises a fusion 25 of CH3 domain to Fab, etc.

As is known in the art, scFv comprises V_H joined to V_L by a peptide linker, usually 15-20 residues in length, diabodies comprise scFv with a peptide linker about 5 residues in length, triabodies comprise scFv with no peptide linker, tetrabodies comprise scFv with peptide linker 1 residue in length, a scFv 30 minibody comprises a fusion of CH3 domain to scFv, and dimeric scFv comprise a fusion of two scFvs in tandem using another peptide linker (reviewed in

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-19-

Chames and Baty, *FEMS Microbiol. Letts.* 189:1-8 (2000)). Preferably, an antigen-specific immunoglobulin fragment includes both antigen binding domains, *i.e.*, V_H and V_L. Other immunoglobulin fragments are well known in the art and disclosed in well-known reference materials such as those described herein.

In certain embodiments, the present invention is drawn to methods to identify, *i.e.*, select or alternatively screen for, polynucleotides which singly or collectively encode antigen-specific immunoglobulin molecules, antigen-specific fragments thereof, or immunoglobulin molecules or fragments with specific antigen-related functions. In related embodiments, the present invention is drawn to isolated immunoglobulin molecules encoded by the polynucleotides identified by these methods.

The preferred methods comprise a two-step screening and/or selection process. In the first step, a polynucleotide encoding a first immunoglobulin subunit, *i.e.*, either a heavy chain or a light chain, is identified from a library of polynucleotides encoding that subunit by introducing the library into a population of eukaryotic host cells, and expressing the immunoglobulin subunit in combination with one or more species of a second immunoglobulin subunit, where the second immunoglobulin subunit is not the same as the first immunoglobulin subunit, *i.e.*, if the first immunoglobulin subunit polypeptide is a heavy chain polypeptide, the second immunoglobulin subunit polypeptide will be a light chain polypeptide.

Once one or more polynucleotides encoding one or more first immunoglobulin subunit are isolated from the library in the first step, a second immunoglobulin subunit is identified in the second step. Isolated polynucleotides encoding the isolated first immunoglobulin subunit polypeptide(s) are transferred into and expressed in host cells in which a library of polynucleotides encoding the second immunoglobulin subunit are expressed, thereby allowing identification of a polynucleotide encoding a second immunoglobulin subunit polypeptide which, when combined with the first immunoglobulin subunit identified in the first step,

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-20-

forms a functional immunoglobulin molecule, or fragment thereof, which recognizes a specific antigen and/or performs a specific function.

Where immunoglobulin fragments are composed of one polypeptide, *i.e.*, a single-chain fragment or a fragment comprising a V_H H domain, and therefore
5 encoded by one polynucleotide, preferred methods comprise a one-step screening and/or selection process. Polynucleotides encoding a single-chain fragment, comprising a heavy chain variable region and a light chain variable region, or comprising a V_H H region, are identified from a library by introducing the library into host cells such as eukaryotic cells and recovering polynucleotides of said
10 library from those host cells which encode immunoglobulin fragments.

In certain embodiments, particular immunoglobulin molecules are identified through contacting the host cells expressing immunoglobulin molecules on their surface to antigen, which allows for selection and/or screening of
15 antigen-binding cells in a number of different ways as described below. In other embodiments, desired soluble secreted immunoglobulin molecules are identified by assaying pools of conditioned media for desired functional characteristics of the immunoglobulin molecule, *e.g.*, virus neutralization.

Where the immunoglobulin molecules are bound to the host cell surface, the first step comprises introducing into a population of host cells capable of
20 expressing the immunoglobulin molecule a first library of polynucleotides encoding a plurality of first immunoglobulin subunit polypeptides through operable association with a transcriptional control region, introducing into the same host cells a second library of polynucleotides encoding, through operable association with a transcriptional control region, a plurality of second
25 immunoglobulin subunit polypeptides, permitting expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, on the membrane surface of the host cells, contacting the host cells with an antigen, and recovering polynucleotides derived from the first library from those host cells which bind the antigen.

Where the immunoglobulin molecules are fully secreted into the cell medium, the first step comprises introducing into a population of host cells
30 capable of expressing the immunoglobulin molecule a first library of

polynucleotides encoding a plurality of first immunoglobulin subunit polypeptides through operable association with a transcriptional control region, introducing into the same host cells a second library of polynucleotides encoding, through operable association with a transcriptional control region, a plurality of
5 second immunoglobulin subunit polypeptides, permitting expression and secretion of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, into the cell medium, assaying aliquots of conditioned medium for desired antigen-related antibody functions, and recovering polynucleotides derived from the first library from those host cell pools grown in conditioned medium in which
10 the desired function was observed.

As used herein, a "library" is a representative genus of polynucleotides, *i.e.*, a group of polynucleotides related through, for example, their origin from a single animal species, tissue type, organ, or cell type, where the library collectively comprises at least two different species within a given genus of
15 polynucleotides. A library of polynucleotides preferably comprises at least 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , or 10^9 different species within a given genus of polynucleotides. More specifically, a library of the present invention encodes a plurality of a certain immunoglobulin subunit polypeptide, *i.e.*, either a heavy chain subunit polypeptide or a light chain subunit polypeptide. In this context,
20 a "library" of the present invention comprises polynucleotides of a common genus, the genus being polynucleotides encoding an immunoglobulin subunit polypeptide of a certain type and class *e.g.*, a library might encode a human μ , γ -1, γ -2, γ -3, γ -4, α -1, α -2, ϵ , or δ heavy chain, or a human κ or λ light chain. Although each member of any one library of the present invention will encode the
25 same heavy or light chain constant region, the library will collectively comprise at least two, preferably at least 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , or 10^9 different variable regions *i.e.*, a "plurality" of variable regions associated with the common constant region.

In other embodiments, the library encodes a plurality of immunoglobulin
30 single-chain fragments which comprise a variable region, such as a light chain variable region or a heavy chain variable region, and preferably comprises both

a light chain variable region and a heavy chain variable region. Optionally, such a library comprises polynucleotides encoding an immunoglobulin subunit polypeptide of a certain type and class, or domains thereof.

In one aspect, the present invention encompasses methods to produce libraries of polynucleotides encoding immunoglobulin subunits. Furthermore, the present invention encompasses libraries of immunoglobulin subunits constructed in eukaryotic expression vectors according to the methods described herein. Such libraries are preferably produced in eukaryotic virus vectors, even more preferably in poxvirus vectors. Such methods and libraries are described herein.

By "recipient cell" or "host cell" or "cell" is meant a cell or population of cells into which polynucleotide libraries of the present invention are introduced. A host cell of the present invention is preferably a eukaryotic cell or cell line, preferably a plant, animal, vertebrate, mammalian, rodent, mouse, primate, or human cell or cell line. By "a population of host cells" is meant a group of cultured cells into which a "library" of the present invention can be introduced and expressed. Any host cells which will support expression from a given library constructed in a given vector is intended. Suitable and preferred host cells are disclosed herein. Furthermore, certain host cells which are preferred for use with specific vectors and with specific selection and/or screening schemes are disclosed herein. Although it is preferred that a population of host cells be a monoculture, *i.e.*, where each cell in the population is of the same cell type, mixed cultures of cells are also contemplated. Host cells of the present invention may be adherent, *i.e.*, host cells which grow attached to a solid substrate, or, alternatively, the host cells may be in suspension. Host cells may be cells derived from primary tumors, cells derived from metastatic tumors, primary cells, cells which have lost contact inhibition, transformed primary cells, immortalized primary cells, cells which may undergo apoptosis, and cell lines derived therefrom.

As noted above, preferred methods to identify immunoglobulin molecules comprise the introduction of a "first" library of polynucleotides into a population of host cells, as well as a "second" library of polynucleotides into the same population of host cells. The first and second libraries are complementary, *i.e.*,

if the "first" library encodes immunoglobulin heavy chains, the "second" library will encode immunoglobulin light chains, thereby allowing assembly of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, in the population of host cells. Also, as noted above, another method to identify immunoglobulins or immunoglobulin fragments comprises introduction of a single library of polynucleotides encoding single-chain fragments into a population of host cells. The description of polynucleotide libraries, the composition of the polynucleotides in the library, and the polypeptides encoded by the polynucleotides therefore encompass both the polynucleotides which comprise the "first library" and the polynucleotides which comprise the "second library," and the polypeptides encoded thereby. The libraries may be constructed in any suitable vectors, and both libraries may, but need not be, constructed in the same vector. Suitable and preferred vectors for the first and second libraries are disclosed *infra*.

Polynucleotides contained in libraries of the present invention encode immunoglobulin subunit polypeptides through "operable association with a transcriptional control region." One or more nucleic acid molecules in a given polynucleotide are "operably associated" when they are placed into a functional relationship. This relationship can be between a coding region for a polypeptide and a regulatory sequence(s) which are connected in such a way as to permit expression of the coding region when the appropriate molecules (*e.g.*, transcriptional activator proteins, polymerases, etc.) are bound to the regulatory sequences(s). "Transcriptional control regions" include, but are not limited to promoters, enhancers, operators, and transcription termination signals, and are included with the polynucleotide to direct its transcription. For example, a promoter would be operably associated with a nucleic acid molecule encoding an immunoglobulin subunit polypeptide if the promoter was capable of effecting transcription of that nucleic acid molecule. Generally, "operably associated" means that the DNA sequences are contiguous or closely connected in a polynucleotide. However, some transcription control regions, *e.g.*, enhancers, do not have to be contiguous.

By "control sequences" or "control regions" is meant DNA sequences necessary for the expression of an operably associated coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

A variety of transcriptional control regions are known to those skilled in the art. Preferred transcriptional control regions include those which function in vertebrate cells, such as, but not limited to, promoter and enhancer sequences from poxviruses, adenoviruses, herpesviruses, *e.g.*, human cytomegalovirus (preferably the intermediate early promoter, preferably in conjunction with intron-A), simian virus 40 (preferably the early promoter), retroviruses (such as Rous sarcoma virus), and picornaviruses (particularly an internal ribosome entry site, or IRES, enhancer region, also referred to herein as a CITE sequence). Other preferred transcriptional control regions include those derived from mammalian genes such as actin, heat shock protein, and bovine growth hormone, as well as other sequences capable of controlling gene expression in eukaryotic cells. Additional suitable transcription control regions include tissue-specific promoters and enhancers as well as inducible promoters (*e.g.*, promoters inducible by tetracycline, and temperature sensitive promoters). As will be discussed in more detail below, especially preferred are promoters capable of functioning in the cytoplasm of poxvirus-infected cells.

In certain preferred embodiments, each "immunoglobulin subunit polypeptide," *i.e.*, either a "first immunoglobulin subunit polypeptide" or a "second immunoglobulin subunit polypeptide" comprises (i) a first immunoglobulin constant region selected from the group consisting of a heavy chain constant region, either a membrane bound form of a heavy chain constant region or a fully secreted form of a heavy chain constant region; and a light chain constant region, (ii) an immunoglobulin variable region corresponding to the first constant region, *i.e.*, if the immunoglobulin constant region is a heavy chain constant region, the immunoglobulin variable region preferably comprises a V_H

region, and if the immunoglobulin constant region is a light chain constant region, the immunoglobulin variable region preferably comprises a V_L region, and (iii) a signal peptide capable of directing transport of the immunoglobulin subunit polypeptide through the endoplasmic reticulum and through the host cell plasma membrane, either as a membrane-bound or fully secreted heavy chain, or a light chain associated with a heavy chain. Accordingly, through the association of two identical heavy chains and two identical light chains, either a surface immunoglobulin molecule or a fully secreted immunoglobulin molecule is formed.

Also in certain preferred embodiments in the context of an immunoglobulin fragment, a single-chain fragment comprises an immunoglobulin variable region selected from the group consisting of a heavy chain variable region and a light chain variable region, and preferably comprises both variable regions. If the immunoglobulin fragment comprises both a heavy chain variable region and a light chain variable region, they may be directly joined (*i.e.*, they have no peptide or other linker), or they may be joined by another means. If they are joined by other means, they may be joined directly or by a disulfide bond formed during expression or by a peptide linker, as discussed below. Accordingly, through the association of the heavy chain variable region and the light chain variable region, a CDR is formed.

The heavy chain variable region and light chain variable region of one single-chain fragment may associate with one another or the heavy chain variable region of one single-chain fragment may associate with a light chain variable region of another single-chain fragment, and vice versa, depending on the type of linker. In one embodiment, the single-chain fragment also comprises a constant region selected from the group consisting of a heavy chain constant region, or a domain thereof, and a light chain constant region, or a domain thereof. Two single-chain fragments may associate with one another via their constant regions.

As mentioned above, in certain embodiments, the polynucleotide encoding the light chain variable region and heavy chain variable region of the single-chain fragment encode a linker. The single-chain fragment may comprise

a single polypeptide with the sequence V_H -linker- V_L or V_L -linker- V_H . In some embodiments, the linker is chosen to permit the heavy chain and light chain of a single polypeptide to bind together in their proper conformational orientation. See for example, Huston, J.S., et al, *Methods in Enzym.* 203:46-121 (1991). Thus, in these embodiments, the linker should be able to span the 3.5 nm distance between its points of fusion to the variable domains without distortion of the native Fv conformation. In these embodiments, the amino acid residues constituting the linker are such that it can span this distance and should be 5 amino acids or longer. Single-chain fragments with a linker of 5 amino acids form are found in monomer and predominantly dimer form. Preferably, the linker should be at least about 10 or at least about 15 residues in length. In other embodiments, the linker length is chosen to promote the formation of scFv tetramers (tetrabodies), and is 1 amino acid in length. In some embodiments, the variable regions are directly linked (*i.e.*, the single-chain fragment contains no peptide linker) to promote the formation of scFv trimers (triabodies). These variations are well known in the art. (See, for example, Chames and Baty, *FEMS Microbiol. Letts.* 189:1-8 (2000). The linker should not be so long it causes steric interference with the combining site. Thus, it preferably should be about 25 residues or less in length.

The amino acids of the peptide linker are preferably selected so that the linker is hydrophilic so it does not get buried into the antibody. The linker (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID NO:6) is a preferred linker that is widely applicable to many antibodies as it provides sufficient flexibility. Other linkers include Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO:7), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr (SEQ ID NO:8), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln (SEQ ID NO:9), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp (SEQ ID NO:10), Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly (SEQ ID NO:11), Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser Leu Asp (SEQ ID NO:12), and Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp (SEQ ID NO:13). Alternatively, a linker such as the (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID

NO:6) linker, although any sequence can be used, is mutagenized or the amino acids in the linker are randomized, and using phage display vectors or the methods of the invention, antibodies with different linkers are screened or selected for the highest affinity or most affect on phenotype. Examples of shorter linkers include fragments of the above linkers, and examples of longer linkers include combinations of the linkers above, combinations of fragments of the linkers above, and combinations of the linkers above with fragments of the linkers above.

Also preferred are immunoglobulin subunit polypeptides which are variants or fragments of the above-described immunoglobulin subunit polypeptides. Any variants or fragments which result in an antigen binding fragment of an immunoglobulin molecule are contemplated. Such variants may be attached to the host cell surface, *e.g.*, through association with a naturally-occurring transmembrane domain, through a receptor-ligand interaction, or as a fusion with a heterologous transmembrane domain, or may be secreted into the cell medium. Examples of antigen binding fragments of immunoglobulin molecules are described herein.

In those embodiments where the immunoglobulin subunit polypeptide comprises a heavy chain polypeptide, any immunoglobulin heavy chain, from any animal species, is intended. Suitable and preferred immunoglobulin heavy chains are described herein. Immunoglobulin heavy chains from vertebrates such as birds, especially chickens, fish, and mammals are included, with mammalian immunoglobulin heavy chains being preferred. Examples of mammalian immunoglobulin heavy chains include human, mouse, dog, cat, horse, goat, rat, sheep, cow, pig, guinea pig, camel, llama, and hamster immunoglobulin heavy chains. Of these, human immunoglobulin heavy chains are particularly preferred. Also contemplated are hybrid immunoglobulin heavy chains comprising portions of heavy chains from one or more species, such as mouse/human hybrid immunoglobulin heavy chains, or "camelized" human immunoglobulin heavy chains. Of the human immunoglobulin heavy chains, preferably, an immunoglobulin heavy chain of the present invention is selected from the group consisting of a μ heavy chain, *i.e.*, the heavy chain of an IgM immunoglobulin,

a γ -1 heavy chain, *i.e.*, the heavy chain of an IgG1 immunoglobulin, a γ -2 heavy chain, *i.e.*, the heavy chain of an IgG2 immunoglobulin, a γ -3 heavy chain, *i.e.*, the heavy chain of an IgG3 immunoglobulin, a γ -4 heavy chain, *i.e.*, the heavy chain of an IgG4 immunoglobulin, an α -1 heavy chain, *i.e.*, the heavy chain of an IgA1 immunoglobulin, an α -2 heavy chain, *i.e.*, the heavy chain of an IgA2 immunoglobulin, and ϵ heavy chain, *i.e.*, the heavy chain of an IgE immunoglobulin, and a δ heavy chain, *i.e.*, the heavy chain of an IgD immunoglobulin. In certain embodiments, the preferred immunoglobulin heavy chains include membrane-bound forms of human μ , γ -1, γ -2, γ -3, γ -4, α -1, α -2, ϵ , and δ heavy chains. Especially preferred is a membrane bound form of the human μ heavy chain.

Membrane bound forms of immunoglobulins are typically anchored to the surface of cells by a transmembrane domain which is made part of the heavy chain polypeptide through alternative transcription termination and splicing of the heavy chain messenger RNA. *See, e.g.*, Roitt at page 9.10. By "transmembrane domain" "membrane spanning region," or related terms, which are used interchangeably herein, is meant the portion of heavy chain polypeptide which is anchored into a cell membrane. Typical transmembrane domains comprise hydrophobic amino acids as discussed in more detail below. By "intracellular domain," "cytoplasmic domain," "cytosolic region," or related terms, which are used interchangeably herein, is meant the portion of the polypeptide which is inside the cell, as opposed to those portions which are either anchored into the cell membrane or exposed on the surface of the cell. Membrane-bound forms of immunoglobulin heavy chain polypeptides typically comprise very short cytoplasmic domains of about three amino acids. A membrane-bound form of an immunoglobulin heavy chain polypeptide of the present invention preferably comprises the transmembrane and intracellular domains normally associated with that immunoglobulin heavy chain, *e.g.*, the transmembrane and intracellular domains associated with μ and δ heavy chains in pre-B cells, or the transmembrane and intracellular domains associated with any of the immunoglobulin heavy chains in B-memory cells. However, it is also

contemplated that heterologous transmembrane and intracellular domains could be associated with a given immunoglobulin heavy chain polypeptide, for example, the transmembrane and intracellular domains of a μ heavy chain could be associated with the extracellular portion of a γ heavy chain. Alternatively, transmembrane and/or cytoplasmic domains of an entirely heterologous polypeptide could be used, for example, the transmembrane and cytoplasmic domains of a major histocompatibility molecule, a cell surface receptor, a virus surface protein, chimeric domains, or synthetic domains.

In those embodiments where the immunoglobulin subunit polypeptide comprises a light chain polypeptide, any immunoglobulin light chain, from any animal species, is intended. Suitable and preferred immunoglobulin light chains are described herein. Immunoglobulin light chains from vertebrates such as birds, especially chickens, fish, and mammals are included, with mammalian immunoglobulin light chains being preferred. Examples of mammalian immunoglobulin light chains include human, mouse, dog, cat, horse, goat, rat, sheep, cow, pig, guinea pig, and hamster immunoglobulin light chains. Of these, human immunoglobulin light chains are particularly preferred. Also contemplated are hybrid immunoglobulin light chains comprising portions of light chains from one or more species, such as mouse/human hybrid immunoglobulin light chains. Preferred immunoglobulin light chains include human κ and λ light chains. A pair of either light chain may associate with an identical pair of any of the heavy chains to produce an immunoglobulin molecule, with the characteristic H_2L_2 structure which is well understood by those of ordinary skill in the art.

According to a preferred aspect of the invention, each member of a library of polynucleotides as described herein, *e.g.*, a first library of polynucleotides or a second library of polynucleotides, comprises (a) a first nucleic acid molecule encoding an immunoglobulin constant region common to all members of the library, and (b) a second nucleic acid molecule encoding an immunoglobulin variable region, where the second nucleic acid molecule is directly upstream of and in-frame with the first nucleic acid molecule. Accordingly, an

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-30-

immunoglobulin subunit polypeptide encoded by a member of a library of polynucleotides of the present invention, *i.e.*, an immunoglobulin light chain or an immunoglobulin heavy chain encoded by such a polynucleotide, preferably comprises an immunoglobulin constant region associated with an immunoglobulin variable region.

The constant region of a light chain encoded by the "first nucleic acid molecule," comprises about half of the subunit polypeptide and is situated C-terminal, *i.e.*, in the latter half of the light chain polypeptide. A light chain constant region, referred to herein as a C_L constant region, or, more specifically a C_K constant region or a C_λ constant region, comprises about 110 amino acids held together in a "loop" by an interchain disulfide bond.

The constant region of a heavy chain encoded by the "first nucleic acid molecule" comprises three quarters or more of the subunit polypeptide, and is situated in the C-terminal, *i.e.*, in the latter portion of the heavy chain polypeptide. The heavy chain constant region, referred to herein as a C_H constant region, comprises either three or four peptide loops or "domains" of about 110 amino acid each enclosed by interchain disulfide bonds. More specifically, the heavy chain constant regions in human immunoglobulins include a C_μ constant region, a C_δ constant region, a C_γ constant region, a C_α constant region, and a C_ε constant region. C_γ, C_α, and C_δ heavy chains each contain three constant region domains, referred to generally as C_{H1}, C_{H2}, and C_{H3}, while C_μ and C_ε heavy chains contain four constant region domains, referred to generally as C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, and C_{H4}. Nucleic acid molecules encoding human immunoglobulin constant regions are readily obtained from cDNA libraries derived from, for example, human B cells or their precursors by methods such as PCR, which are well known to those of ordinary skill in the art and further, are disclosed in the Examples, *infra*.

Immunoglobulin subunit polypeptides of the present invention each comprise an immunoglobulin variable region, encoded by the "second nucleic acid molecule." Within a library of polynucleotides, each polynucleotide will comprise the same constant region, but the library will contain a plurality, *i.e.*, at

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-31-

least two, preferably at least 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , or 10^9 different variable regions. As is well known by those of ordinary skill in the art, a light chain variable region is encoded by rearranged nucleic acid molecules, each comprising a light chain V_L region, specifically a V_{κ} region or a V_{λ} region, and a light chain J region, specifically a J_{κ} region or a J_{λ} region. Similarly, a heavy chain variable region is encoded by rearranged nucleic acid molecules, each comprising a heavy chain V_H region, a D region and J region. These rearrangements take place at the DNA level upon cellular differentiation. Nucleic acid molecules encoding heavy and light chain variable regions may be derived, for example, by PCR from mature B cells and plasma cells which have terminally differentiated to express an antibody with specificity for a particular epitope. Furthermore, if antibodies to a specific antigen are desired, variable regions may be isolated from mature B cells and plasma cells of an animal who has been immunized with that antigen, and has thereby produced an expanded repertoire of antibody variable regions which interact with the antigen. Alternatively, if a more diverse library is desired, variable regions may be isolated from precursor cells, *e.g.*, pre-B cells and immature B cells, which have undergone rearrangement of the immunoglobulin genes, but have not been exposed to antigen, either self or non-self. For example, variable regions might be isolated by PCR from normal human bone marrow pooled from multiple donors. Alternatively, variable regions may be synthetic, for example, made in the laboratory through generation of synthetic oligonucleotides, or may be derived through *in vitro* manipulations of germ line DNA resulting in rearrangements of the immunoglobulin genes.

In addition to first and second nucleic acid molecules encoding immunoglobulin constant regions and variable regions, respectively, each member of a library of polynucleotides of the present invention as described above may further comprise a third nucleic acid molecule encoding a signal peptide directly upstream of and in frame with the second nucleic acid molecule encoding the variable region.

By "signal peptide" is meant a polypeptide sequence which, for example, directs transport of nascent immunoglobulin polypeptide subunit to the surface of the host cells. Signal peptides are also referred to in the art as "signal sequences," "leader sequences," "secretory signal peptides," or "secretory signal sequences." Signal peptides are normally expressed as part of a complete or "immature" polypeptide, and are normally situated at the N-terminus. The common structure of signal peptides from various proteins is commonly described as a positively charged n-region, followed by a hydrophobic h-region and a neutral but polar c-region. In many instances the amino acids comprising the signal peptide are cleaved off the protein once its final destination has been reached, to produce a "mature" form of the polypeptide. The cleavage is catalyzed by enzymes known as signal peptidases. The (-3,-1)-rule states that the residues at positions -3 and -1 (relative to the cleavage site) must be small and neutral for cleavage to occur correctly. See, e.g., McGeoch, *Virus Res.* 3:271-286 (1985), and von Heinje, *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690 (1986).

All cells, including host cells of the present invention, possess a constitutive secretory pathway, where proteins, including secreted immunoglobulin subunit polypeptides destined for export, are secreted from the cell. These proteins pass through the ER-Golgi processing pathway where modifications may occur. If no further signals are detected on the protein it is directed to the cells surface for secretion. Alternatively, immunoglobulin subunit polypeptides can end up as integral membrane components expressed on the surface of the host cells. Membrane-bound forms of immunoglobulin subunit polypeptides initially follow the same pathway as the secreted forms, passing through to the ER lumen, except that they are retained in the ER membrane by the presence of stop-transfer signals, or "transmembrane domains." Transmembrane domains are hydrophobic stretches of about 20 amino acid residues that adopt an alpha-helical conformation as they transverse the membrane. Membrane embedded proteins are anchored in the phospholipid bilayer of the plasma membrane. As with secreted proteins, the N-terminal region of transmembrane proteins have a signal peptide that passes through the membrane and is cleaved

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-33-

upon exiting into the lumen of the ER. Transmembrane forms of immunoglobulin heavy chain polypeptides utilize the same signal peptide as the secreted forms.

A signal peptide of the present invention may be either a naturally-occurring immunoglobulin signal peptide, *i.e.*, encoded by a sequence which is part of a naturally occurring heavy or light chain transcript, or a functional derivative of that sequence that retains the ability to direct the secretion of the immunoglobulin subunit polypeptide that is operably associated with it. Alternatively, a heterologous signal peptide, or a functional derivative thereof, may be used. For example, a naturally-occurring immunoglobulin subunit polypeptide signal peptide may be substituted with the signal peptide of human tissue plasminogen activator or mouse β -glucuronidase.

Signal sequences, transmembrane domains, and cytosolic domains are known for a wide variety of membrane bound proteins. These sequences may be used accordingly, either together as pairs (*e.g.*, signal sequence and transmembrane domain, or signal sequence and cytosolic domain, or transmembrane domain and cytosolic domain) or threesomes from a particular protein, or with each component being taken from a different protein, or alternatively, the sequences may be synthetic, and derived entirely from consensus as artificial delivery domains, as mentioned above.

Particularly preferred signal sequences and transmembrane domains include, but are not limited to, those derived from CD8, ICAM-2, IL-8R, CD4 and LFA-1. Additional useful sequences include sequences from: 1) class I integral membrane proteins such as IL-2 receptor beta-chain (residues 1-26 are the signal sequence, 241-265 are the transmembrane residues; see Hatakeyama *et al*, Science 244:551 (1989) and von Heijne *et al*, Eur. J. Biochem. 174:671 (1988)) and insulin receptor beta-chain (residues 1-27 are the signal, 957-959, are the transmembrane domain and 960-1382 are the cytoplasmic domain; see Hatakeyama *supra*, and Ebina *et al.*, Cell 40:747 (1985)); 2) class II integral membrane proteins such as neutral endopeptidase (residues 29-51 are the transmembrane domain, 2-28 are the cytoplasmic domain; see Malfroy *et al.*,

Biochem. Biophys. Res. Commun. 144:59 (1987)); 3) type III proteins such as human cytochrome P450 NF25 (Hatakeyama, *supra*); and 4) type IV proteins such as human P-glycoprotein (Hatakeyama, *supra*). In this alternative, CD8 and ICAM-2 are particularly preferred. For example, the signal sequences from CD8 and ICAM-2 lie at the extreme 5' end of the transcript. These consist of the amino acids 1-32 in the case of CD8 (Nakauchi *et al.*, PNAS USA 82:5126 (1985)) and 1-21 in the case of ICAM-2 (Staunton *et al.*, Nature (London) 339:61 (1989)). These transmembrane domains are encompassed by amino acids 145-195 from CD8 (Nakauchi, *supra*) and 224-256 from ICAM-2 (Staunton, *supra*).

Alternatively, membrane anchoring domains include the GPI anchor, which results in a covalent bond between the molecule and the lipid bilayer via a glycosyl-phosphatidylinositol bond for example in DAF (see Homans *et al.*, Nature 333(6170):269-72 (1988), and Moran *et al.*, J. Biol. Chem. 266:1250 (1991)). In order to do this, the GPI sequence from Thy-1 can be cassetted 3' of the immunoglobulin or immunoglobulin fragment in place of a transmembrane sequence.

Similarly, myristylation sequences can serve as membrane anchoring domains. It is known that the myristylation of c-src recruits it to the plasma membrane. This is a simple and effective method of membrane localization, given that the first 14 amino acids of the protein are solely responsible for this function (see Cross *et al.*, Mol. Cell. Biol. 4(9) 1834 (1984); Spencer *et al.*, Science 262:1019 1024 (1993)). This motif has already been shown to be effective in the localization of reporter genes and can be used to anchor the zeta chain of the TCR. This motif is placed 5' of the immunoglobulin or immunoglobulin fragment in order to localize the construct to the plasma membrane. Other modifications such as palmitoylation can be used to anchor constructs in the plasma membrane; for example, palmitoylation sequences from the G protein-coupled receptor kinase GRK6 sequence (Stoffel *et al.*, J. Biol. Chem 269:27791 (1994)); from rhodopsin (Barnstable *et al.*, J. Mol. Neurosci. 5(3):207 (1994)); and the p21 H-ras 1 protein (Capon *et al.*, Nature 302:33 (1983)).

In addition to first and second nucleic acid molecules encoding immunoglobulin constant regions and variable regions, respectively, each member of a library of polynucleotides of the present invention as described above may further comprise additional nucleic acid molecule encoding
5 heterologous polypeptides. Such additional polynucleotides may be in addition to or as an alternative of the third nucleic acid molecule encoding a signal peptide. Such additional nucleic acid molecules encoding heterologous polypeptides may be upstream of or downstream from the nucleic acid molecules encoding the variable chain region or the heavy chain region.

10 A heterologous polypeptide encoded by an additional nucleic acid molecule may be a rescue sequence. A rescue sequence is a sequence which may be used to purify or isolate either the immunoglobulin or fragment thereof or the polynucleotide encoding it. Thus, for example, peptide rescue sequences include purification sequences such as the 6-His tag for use with Ni affinity columns and
15 epitope tags for detection, immunoprecipitation, or FACS (fluorescence-activated cell sorting). Suitable epitope tags include myc (for use with commercially available 9E10 antibody), the BSP biotinylation target sequence of the bacterial enzyme BirA, flu tags, LacZ, and GST. The additional nucleic acid molecule may also encode a peptide linker.

20 In a preferred embodiment, combinations of heterologous polypeptides are used. Thus, for example, any number of combinations of signal sequences, rescue sequences, and stability sequences may be used, with or without linker sequences. One can cassette in various fusion polynucleotides encoding heterologous polypeptides 5' and 3' of the immunoglobulin or fragment thereof-
25 encoding polynucleotide. As will be appreciated by those in the art, these modules of sequences can be used in a large number of combinations and variations.

The polynucleotides comprised in the first and second libraries are introduced into suitable host cells. Suitable host cells are characterized by being
30 capable of expressing immunoglobulin molecules attached to their surface. Polynucleotides may be introduced into host cells by methods which are well

known to those of ordinary skill in the art. Suitable and preferred introduction methods are disclosed herein.

As is easily appreciated, introduction methods vary depending on the nature of the vector in which the polynucleotide libraries are constructed. For example, DNA plasmid vectors may be introduced into host cells, for example, by lipofection (such as with anionic liposomes (*see, e.g., Felgner et al., 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7413 or cationic liposomes (*see, e.g., Brigham, K.L. et al. Am. J Med Sci.* 298(4):278-282(1989); U.S. Patent No. 4,897,355 (Eppstein, *et al.*)), by electroporation, by calcium phosphate precipitation (*see generally, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989), by protoplast fusion, by spheroplast fusion, or by the DEAE dextran method (Sussman *et al.*, *Cell. Biol.* 4:1641-1643 (1984)). The above references are incorporated herein by reference in their entireties.

When the selected method is lipofection, the nucleic acid can be complexed with a cationic liposome, such as DOTMA:DOPE, DOTMA, DOPE, DC-cholesterol, DOTAP, Transfectam® (Promega), Tfx® (Promega), LipoTAXI™ (Stratagene), PerFect Lipid™ (Invitrogen), SuperFect™ (Qiagen). When the nucleic acid is transfected via an anionic liposome, the anionic liposome can encapsulate the nucleic acid. Preferably, DNA is introduced by liposome-mediated transfection using the manufacturer's protocol (such as for Lipofectamine; Life Technologies Incorporated).

Where the plasmid is a virus vector, introduction into host cells is most conveniently carried out by standard infection. However, in many cases viral nucleic acids may be introduced into cells by any of the methods described above, and the viral nucleic acid is "infectious," *i.e.*, introduction of the viral nucleic acid into the cell, without more, is sufficient to allow the cell to produce viable progeny virus particles. It is noted, however, that certain virus nucleic acids, for example, poxvirus nucleic acids, are not infectious, and therefore must be introduced with additional elements provided, for example, by a virus particle

enclosing the viral nucleic acid, by a cell which has been engineered to produce required viral elements, or by a helper virus.

The first and second libraries of polynucleotides may be introduced into host cells in any order, or simultaneously. For example, if both the first and second libraries of polynucleotides are constructed in virus vectors, whether infectious or inactivated, the vectors may be introduced by simultaneous infection as a mixture, or may be introduced in consecutive infections. If one library is constructed in a virus vector, and the other is constructed in a plasmid vector, introduction might be carried out most conveniently by introduction of one library before the other.

Following introduction into the host cells of the first and second libraries of polynucleotides, expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, is permitted to occur either on the membrane surface of said host cells, or through secretion into the cell medium. By "permitting expression" is meant allowing the vectors which have been introduced into the host cells to undergo transcription and translation of the immunoglobulin subunit polypeptides, preferably allowing the host cells to transport fully assembled immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, to the membrane surface or into the cell medium. Typically, permitting expression requires incubating the host cells into which the polynucleotides have been introduced under suitable conditions to allow expression. Those conditions, and the time required to allow expression will vary based on the choice of host cell and the choice of vectors, as is well known by those of ordinary skill in the art.

In certain embodiments, host cells which have been allowed to express immunoglobulin molecules on their surface, or soluble immunoglobulin molecules secreted into the cell medium are then contacted with an antigen. As used herein, an "antigen" is any molecule that can specifically bind to an antibody, immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof. By "specifically bind" is meant that the antigen binds to the CDR of the antibody. The portion of the antigen which specifically interacts with the CDR is an "epitope," or an "antigenic determinant." An antigen may comprise a single

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-38-

epitope, but typically, an antigen comprises at least two epitopes, and can include any number of epitopes, depending on the size, conformation, and type of antigen.

Antigens are typically peptides or polypeptides, but can be any molecule or compound. For example, an organic compound, *e.g.*, dinitrophenol or DNP, a nucleic acid, a carbohydrate, or a mixture of any of these compounds either with or without a peptide or polypeptide can be a suitable antigen. The minimum size of a peptide or polypeptide epitope is thought to be about four to five amino acids. Peptide or polypeptide epitopes preferably contain at least seven, more preferably at least nine and most preferably between at least about 15 to about 30 amino acids. Since a CDR can recognize an antigenic peptide or polypeptide in its tertiary form, the amino acids comprising an epitope need not be contiguous, and in some cases, may not even be on the same peptide chain. In the present invention, peptide or polypeptide antigens preferably contain a sequence of at least 4, at least 5, at least 6, at least 7, more preferably at least 8, at least 9, at least 10, at least 15, at least 20, at least 25, and, most preferably, between about 15 to about 30 amino acids. Preferred peptides or polypeptides comprising, or alternatively consisting of, antigenic epitopes are at least 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, or 100 amino acid residues in length. The antigen may be in any form and may be free, for example dissolved in a solution, or may be attached to any substrate. Suitable and preferred substrates are disclosed herein. In certain embodiments, an antigen may be part of an antigen-expressing presenting cell as described in more detail below.

It is to be understood that immunoglobulin molecules specific for any antigen may be produced according to the methods of the present invention. Preferred antigens are "self" antigens, *i.e.*, antigens derived from the same species as the immunoglobulin molecules produced. As an example, it might be desired to produce human antibodies directed to human tumor antigens such as, but not limited to, a CEA antigen, a GM2 antigen, a Tn antigen, an sTn antigen, a Thompson-Friedenreich antigen (TF), a Globo H antigen, an Le(y) antigen, a MUC1 antigen, a MUC2 antigen, a MUC3 antigen, a MUC4 antigen, a MUC5AC antigen, a MUC6 antigen, a MUC7 antigen, a carcinoembryonic antigen, a beta chain of human chorionic gonadotropin (hCG beta) antigen, a

HER2/neu antigen, a PSMA antigen, a EGFRvIII antigen, a KSA antigen, a PSA antigen, a PSCA antigen, a GP100 antigen, a MAGE 1 antigen, a MAGE 2 antigen, a TRP 1 antigen, a TRP 2 antigen, and a tyrosinase antigen. Other desired "self" antigens include, but are not limited to, cytokines, receptors, ligands, glycoproteins, and hormones.

It is also contemplated to produce antibodies directed to antigens on infectious agents. Examples of such antigens include, but are not limited to, bacterial antigens, viral antigens, parasite antigens, and fungal antigens. Examples of viral antigens include, but are not limited to, adenovirus antigens, alphavirus antigens, calicivirus antigens, *e.g.*, a calicivirus capsid antigen, coronavirus antigens, distemper virus antigens, Ebola virus antigens, enterovirus antigens, flavivirus antigens, hepatitis virus (A-E) antigens, *e.g.*, a hepatitis B core or surface antigen, herpesvirus antigens, *e.g.*, a herpes simplex virus or varicella zoster virus glycoprotein antigen, immunodeficiency virus antigens, *e.g.*, a human immunodeficiency virus envelope or protease antigen, infectious peritonitis virus antigens, influenza virus antigens, *e.g.*, an influenza A hemagglutinin or neuraminidase antigen, leukemia virus antigens, Marburg virus antigens, oncogenic virus antigens, orthomyxovirus antigens, papilloma virus antigens, parainfluenza virus antigens, *e.g.*, hemagglutinin/neuraminidase antigens, paramyxovirus antigens, parvovirus antigens, pestivirus antigens, picorna virus antigens, *e.g.*, a poliovirus capsid antigen, rabies virus antigens, *e.g.*, a rabies virus glycoprotein G antigen, reovirus antigens, retrovirus antigens, rotavirus antigens, as well as other cancer-causing or cancer-related virus antigens.

Examples of bacterial antigens include, but are not limited to, *Actinomyces*, antigens *Bacillus* antigens, *Bacteroides* antigens, *Bordetella* antigens, *Bartonella* antigens, *Borrelia* antigens, *e.g.*, a *B. burgdorferi* OspA antigen, *Brucella* antigens, *Campylobacter* antigens, *Capnocytophaga* antigens, *Chlamydia* antigens, *Clostridium* antigens, *Corynebacterium* antigens, *Coxiella* antigens, *Dermatophilus* antigens, *Enterococcus* antigens, *Ehrlichia* antigens, *Escherichia* antigens, *Francisella* antigens, *Fusobacterium* antigens, *Haemobartonella* antigens, *Haemophilus* antigens, *e.g.*, *H. influenzae* type b outer

membrane protein antigens, *Helicobacter* antigens, *Klebsiella* antigens, L-form bacteria antigens, *Leptospira* antigens, *Listeria* antigens, *Mycobacteria* antigens, *Mycoplasma* antigens, *Neisseria* antigens, *Neorickettsia* antigens, *Nocardia* antigens, *Pasteurella* antigens, *Peptococcus* antigens, *Peptostreptococcus* antigens, *Pneumococcus* antigens, *Proteus* antigens, *Pseudomonas* antigens, *Rickettsia* antigens, *Rochalimaea* antigens, *Salmonella* antigens, *Shigella* antigens, *Staphylococcus* antigens, *Streptococcus* antigens, e.g., *S. pyogenes* M protein antigens, *Treponema* antigens, and *Yersinia* antigens, e.g., *Y. pestis* F1 and V antigens.

Examples of fungal antigens include, but are not limited to, *Absidia* antigens, *Acremonium* antigens, *Alternaria* antigens, *Aspergillus* antigens, *Basidiobolus* antigens, *Bipolaris* antigens, *Blastomyces* antigens, *Candida* antigens, *Coccidioides* antigens, *Conidiobolus* antigens, *Cryptococcus* antigens, *Curvularia* antigens, *Epidermophyton* antigens, *Exophiala* antigens, *Geotrichum* antigens, *Histoplasma* antigens, *Madurella* antigens, *Malassezia* antigens, *Microsporium* antigens, *Moniliella* antigens, *Mortierella* antigens, *Mucor* antigens, *Paecilomyces* antigens, *Penicillium* antigens, *Phialemonium* antigens, *Phialophora* antigens, *Prototheca* antigens, *Pseudallescheria* antigens, *Pseudomicrodochium* antigens, *Pythium* antigens, *Rhinosporidium* antigens, *Rhizopus* antigens, *Scolecobasidium* antigens, *Sporothrix* antigens, *Stemphylium* antigens, *Trichophyton* antigens, *Trichosporon* antigens, and *Xylomyces* antigens.

Examples of protozoan parasite antigens include, but are not limited to, *Babesia* antigens, *Balantidium* antigens, *Besnoitia* antigens, *Cryptosporidium* antigens, *Eimeri* antigens, *Encephalitozoon* antigens, *Entamoeba* antigens, *Giardia* antigens, *Hammondia* antigens, *Hepatozoon* antigens, *Isospora* antigens, *Leishmania* antigens, *Microsporidia* antigens, *Neospora* antigens, *Nosema* antigens, *Pentatrichomonas* antigens, *Plasmodium* antigens, e.g., *P. falciparum* circumsporozoite (PfCSP), sporozoite surface protein 2 (PfSSP2), carboxyl terminus of liver stage antigen 1 (PfLSA-1 c-term), and exported protein 1 (PfExp-1) antigens, *Pneumocystis* antigens, *Sarcocystis* antigens, *Schistosoma* antigens, *Theileria* antigens, *Toxoplasma* antigens, and *Trypanosoma* antigens.

Examples of helminth parasite antigens include, but are not limited to, *Acanthocheilonema* antigens, *Aelurostrongylus* antigens, *Ancylostoma* antigens, *Angiostrongylus* antigens, *Ascaris* antigens, *Brugia* antigens, *Bunostomum* antigens, *Capillaria* antigens, *Chabertia* antigens, *Cooperia* antigens, *Crenosoma* antigens, *Dictyocaulus* antigens, *Diectophyme* antigens, *Dipetalonema* antigens, *Diphyllbothrium* antigens, *Diplydium* antigens, *Dirofilaria* antigens, *Dracunculus* antigens, *Enterobius* antigens, *Filaroides* antigens, *Haemonchus* antigens, *Lagochilascaris* antigens, *Loa* antigens, *Mansonella* antigens, *Muellerius* antigens, *Nanophyetus* antigens, *Necator* antigens, *Nematodirus* antigens, *Oesophagostomum* antigens, *Onchocerca* antigens, *Opisthorchis* antigens, *Ostertagia* antigens, *Parafilaria* antigens, *Paragonimus* antigens, *Parascaris* antigens, *Physaloptera* antigens, *Protostrongylus* antigens, *Setaria* antigens, *Spirocerca* antigens, *Spirometra* antigens, *Stephanofilaria* antigens, *Strongyloides* antigens, *Strongylus* antigens, *Thelazia* antigens, *Toxascaris* antigens, *Toxocara* antigens, *Trichinella* antigens, *Trichostrongylus* antigens, *Trichuris* antigens, *Uncinaria* antigens, and *Wuchereria* antigens.

In certain selection and screening schemes in which immunoglobulin molecules are expressed on the surface of host cells, the host cells of the present invention are "contacted" with antigen by a method which will allow an antigen, which specifically recognizes a CDR of an immunoglobulin molecule expressed on the surface of the host cell, to bind to the CDR, thereby allowing the host cells which specifically bind the antigen to be distinguished from those host cells which do not bind the antigen. Any method which allows host cells expressing an antigen-specific antibody to interact with the antigen is included. For example, if the host cells are in suspension, and the antigen is attached to a solid substrate, cells which specifically bind to the antigen will be trapped on the solid substrate, allowing those cells which do not bind the antigen to be washed away, and the bound cells to be subsequently recovered. Alternatively, if the host cells are attached to a solid substrate, and by specifically binding antigen cells are caused to be released from the substrate (*e.g.*, by cell death), they can be recovered from the cell supernatant. Preferred methods by which to allow host

cells of the invention to contact antigen, especially using libraries constructed in vaccinia virus vectors by trimolecular recombination, are disclosed herein.

In a preferred screening method for the detection of antigen-specific immunoglobulin molecules expressed on the surface of host cells, the host cells of the present invention are incubated with a selecting antigen that has been labeled directly with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) or indirectly with biotin then detected with FITC-labeled streptavidin. Other fluorescent probes can be employed which will be familiar to those practiced in the art. During the incubation period, the labeled selecting antigen binds the antigen-specific immunoglobulin molecules. Cells expressing an antibody receptor for a specific fluorescence tagged antigen can be selected by fluorescence activated cell sorting, thereby permitting the host cells which specifically bind the antigen to be distinguished from those host cells which do not bind the antigen. With the advent of cell sorters capable of sorting more than 1×10^8 cells per hour, it is feasible to screen large numbers of cells infected with recombinant vaccinia libraries of immunoglobulin genes to select the subset of cells that express specific antibody receptors to the selecting antigen.

After recovery of host cells which specifically bind antigen, polynucleotides of the first library are recovered from those host cells. By "recovery" is meant a crude separation of a desired component from those components which are not desired. For example, host cells which bind antigen are "recovered" based on their detachment from a solid substrate, and polynucleotides of the first library are recovered from those cells by crude separation from other cellular components. It is to be noted that the term "recovery" does not imply any sort of purification or isolation away from viral and other components. Recovery of polynucleotides may be accomplished by any standard method known to those of ordinary skill in the art. In a preferred aspect, the polynucleotides are recovered by harvesting infectious virus particles, for example, particles of a vaccinia virus vector into which the first library has been constructed, which were contained in those host cells which bound antigen.

In certain screening schemes in which immunoglobulin molecules are fully secreted from the surface of host cells, the cell medium in which pools of host cells are cultured, *i.e.*, "conditioned medium," may be "contacted" with antigen by a method which will allow an antigen which specifically recognizes a CDR of an immunoglobulin molecule to bind to the CDR, and which further allows detection of the antigen-antibody interaction. Such methods include, but are not limited to, immunoblots, ELISA assays, RIA assays, RAST assays, and immunofluorescence assays. Alternatively, the conditioned medium is subjected to a functional assay for specific antibodies. Examples of such assays include, but are not limited to, virus neutralization assays (for antibodies directed to specific viruses), bacterial opsonization/phagocytosis assays (for antibodies directed to specific bacteria), antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) assays, assays to detect inhibition or facilitation of certain cellular functions, assays to detect IgE-mediated histamine release from mast cells, hemagglutination assays, and hemagglutination inhibition assays. Such assays will allow detection of antigen-specific antibodies with desired functional characteristics.

After the identification of conditioned medium pools containing immunoglobulin molecules which specifically bind antigen, or which have desired functional characteristics, further screening steps are carried out until host cells which produce the desired immunoglobulin molecules are recovered, and then polynucleotides of the first library are recovered from those host cells.

As will be readily appreciated by those of ordinary skill in the art, identification of polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides may require two or more rounds of selection as described above, and will necessarily require two or more rounds of screening as described above. A single round of selection may not necessarily result in isolation of a pure set of polynucleotides encoding the desired first immunoglobulin subunit polypeptides; the mixture obtained after a first round may be enriched for the desired polynucleotides but may also be contaminated with non-target insert sequences. Screening assays described herein identify pools containing the reactive host cells, and/or immunoglobulin molecules, but such pools will also contain non-

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-44-

reactive species. Therefore, the reactive pools are further fractionated and subjected to further rounds of screening. Thus, identification of polynucleotides encoding a first immunoglobulin subunit polypeptide which, in association with a second immunoglobulin subunit polypeptide, is capable of forming a desired immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, may require or benefit from several rounds of selection and/or screening, which thus increases the proportion of cells containing the desired polynucleotides. Accordingly, this embodiment further provides that the polynucleotides recovered after the first round be introduced into a second population of cells and be subjected to a second round of selection.

Accordingly, the first selection step, as described, may, or must be repeated one or more times, thereby enriching for the polynucleotides encoding the desired immunoglobulin subunit polypeptides. In order to repeat the first step of this embodiment, those polynucleotides, or pools of polynucleotides, recovered as described above are introduced into a population of host cells capable of expressing the immunoglobulin molecules encoded by the polynucleotides in the library. The host cells may be of the same type used in the first round of selection, or may be a different host cell, as long as they are capable of expressing the immunoglobulin molecules. The second library of polynucleotides are also introduced into these host cells, and expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, on the membrane surface of said host cells, or in the cell medium, is permitted. The cells or condition medium are similarly contacted with antigen, or the medium is tested in a functional assay, and polynucleotides of the first library are again recovered from those cells or pools of host cells which express an immunoglobulin molecule that specifically binds antigen, and/or has a desired functional characteristic. These steps may be repeated one or more times, resulting in enrichment for polynucleotides derived from the first library which encode an immunoglobulin subunit polypeptide which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, specifically binds the antigen and/or has a desired functional characteristic.

Following suitable enrichment for the desired polynucleotides from the first library as described above, those polynucleotides which have been recovered are "isolated," *i.e.*, they are substantially removed from their native environment and are largely separated from polynucleotides in the library which do not encode antigen-specific immunoglobulin subunit polypeptides. For example, cloned polynucleotides contained in a vector are considered isolated for the purposes of the present invention. It is understood that two or more different immunoglobulin subunit polypeptides which specifically bind the same antigen can be recovered by the methods described herein. Accordingly, a mixture of polynucleotides which encode polypeptides binding to the same antigen is also considered to be "isolated." Further examples of isolated polynucleotides include those maintained in heterologous host cells or purified (partially or substantially) DNA molecules in solution. However, a polynucleotide contained in a clone that is a member of a mixed library and that has not been isolated from other clones of the library, *e.g.*, by virtue of encoding an antigen-specific immunoglobulin subunit polypeptide, is not "isolated" for the purposes of this invention. For example, a polynucleotide contained in a virus vector is "isolated" after it has been recovered, and plaque purified, and a polynucleotide contained in a plasmid vector is isolated after it has been expanded from a single bacterial colony.

Given that an antigen may comprise two or more epitopes, and several different immunoglobulin molecules may bind to any given epitope, it is contemplated that several suitable polynucleotides, *e.g.*, two, three, four, five, ten, 100 or more polynucleotides, may be recovered from the first step of this embodiment, all of which may encode an immunoglobulin subunit polypeptide which, when combined with a suitable immunoglobulin subunit polypeptide encoded by a polynucleotide of the second library, will form an immunoglobulin molecule, or antigen binding fragment thereof, capable of specifically binding the antigen of interest. It is contemplated that each different polynucleotide recovered from the first library would be separately isolated. However, these polynucleotides may be isolated as a group of polynucleotides which encode polypeptides with the same antigen specificity, and these polynucleotides may be "isolated" together. Such mixtures of polynucleotides, whether separately

isolated or collectively isolated, may be introduced into host cells in the second step, as explained below, either individually, or with two, three, four, five, ten, 100 or more of the polynucleotides pooled together.

5 Once one or more suitable polynucleotides from the first library are isolated, in the second step of this embodiment, one or more polynucleotides are identified in the second library which encode immunoglobulin subunit polypeptides which are capable of associating with the immunoglobulin subunit polypeptide(s) encoded by the polynucleotides isolated from the first library to form an immunoglobulin molecule, or antigen-binding fragment thereof, which specifically binds an antigen of interest, or has a desired functional characteristic.

10 Accordingly, the second step comprises introducing into a population of host cells capable of expressing an immunoglobulin molecule the second library of polynucleotides encoding a second immunoglobulin subunit polypeptide, introducing into the same population of host cells at least one of the polynucleotides isolated from the first library as described above, permitting expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, on the surface of the host cells, or fully secreted into the cell medium, contacting those host cells, or conditioned medium in which the host cells were grown, with the specific antigen of interest, or subjecting the conditioned medium to a functional assay, and recovering polynucleotides of the second library from those host cells which bind the antigen of interest, or those host cells which were grown in the conditioned medium which exhibits a desired reactivity. The second step is thus carried out very similarly to the first step, except that the second immunoglobulin subunit polypeptides encoded by the polynucleotides of the second library are combined in the host cells with just those polynucleotides isolated from the first library. As mentioned above, a single cloned polynucleotide isolated from the first library may be used, or alternatively a pool of several polynucleotides isolated from the first library may be introduced simultaneously. As with the first step described above, one or more rounds of enrichment are carried out, *i.e.*, either selection or screening of successively smaller pools, thereby enriching for polynucleotides of the second library which

encode a second immunoglobulin subunit polypeptide which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, specifically binds the antigen of interest, or exhibits a desired functional characteristic. Also as with the first step, one or more desired polynucleotides from the second library are then isolated. If a pool of isolated polynucleotides is used in the earlier rounds of enrichment during the second step, preferred subsequent enrichment steps may utilize smaller pools of polynucleotides isolated from the first library, or even more preferably individual cloned polynucleotides isolated from the first library. For any individual polynucleotide isolated from the first library which is then used in the selection process for polynucleotides of the second library, it is possible that several, *i.e.* two, three, four, five, ten, 100, or more polynucleotides may be isolated from the second library which encode a second immunoglobulin subunit polypeptide capable of associating with a first immunoglobulin subunit polypeptide encoded by a polynucleotide isolated from the first library to form an immunoglobulin molecule, or antigen binding fragment thereof, which specifically binds the antigen of interest, or exhibits a desired functional characteristic.

The selection/screening methods for libraries encoding single-chain fragments require only one library rather than first and second libraries, and only one selection/screening step is necessary. Similar to each of the two-steps for the immunoglobulins this one-step selection/screening method may also benefit from two or more rounds of enrichment.

Vectors. In constructing antibody libraries in eukaryotic cells, any standard vector which allows expression in eukaryotic cells may be used. For example, the library could be constructed in a virus, plasmid, phage, or phagemid vector as long as the particular vector chosen comprises transcription and translation regulatory regions capable of functioning in eukaryotic cells. However, antibody libraries as described above are preferably constructed in eukaryotic virus vectors.

Eukaryotic virus vectors may be of any type, *e.g.*, animal virus vectors or plant virus vectors. The naturally-occurring genome of the virus vector may be

RNA, either positive strand, negative strand, or double stranded, or DNA, and the naturally-occurring genomes may be either circular or linear. Of the animal virus vectors, those that infect either invertebrates, *e.g.*, insects, protozoans, or helminth parasites; or vertebrates, *e.g.*, mammals, birds, fish, reptiles, and amphibians are included. The choice of virus vector is limited only by the maximum insert size, and the level of protein expression achieved. Suitable virus vectors are those that infect yeast and other fungal cells, insect cells, protozoan cells, plant cells, bird cells, fish cells, reptilian cells, amphibian cells, or mammalian cells, with mammalian virus vectors being particularly preferred. Any standard virus vector could be used in the present invention, including, but not limited to poxvirus vectors (*e.g.*, vaccinia virus), herpesvirus vectors (*e.g.*, herpes simplex virus), adenovirus vectors, baculovirus vectors, retrovirus vectors, picorna virus vectors (*e.g.*, poliovirus), alphavirus vectors (*e.g.*, sindbis virus), and enterovirus vectors (*e.g.*, mengovirus). DNA virus vectors, *e.g.*, poxvirus, herpes virus, baculovirus, and adenovirus are preferred. As described in more detail below, the poxviruses, particularly orthopoxviruses, and especially vaccinia virus, are particularly preferred. In a preferred embodiment, host cells are utilized which are permissive for the production of infectious viral particles of whichever virus vector is chosen. Many standard virus vectors, such as vaccinia virus, have a very broad host range, thereby allowing the use of a large variety of host cells.

As mentioned *supra*, the first and second libraries of the invention may be constructed in the same vector, or may be constructed in different vectors. However, in preferred embodiments, the first and second libraries are prepared such that polynucleotides of the first library can be conveniently recovered, *e.g.*, separated, from the polynucleotides of the second library in the first step, and the polynucleotides of the second library can be conveniently recovered from the polynucleotides of the first library in the second step. For example, in the first step, if the first library is constructed in a virus vector, and the second library is constructed in a plasmid vector, the polynucleotides of the first library are easily recovered as infectious virus particles, while the polynucleotides of the second library are left behind with cellular debris. Similarly, in the second step, if the

second library is constructed in a virus vector, while the polynucleotides of the first library isolated in the first step are introduced in a plasmid vector, infectious virus particles containing polynucleotides of the second library are easily recovered.

5 When the second library of polynucleotides, or the polynucleotides isolated from the first library are introduced into host cells in a plasmid vector, it is preferred that the immunoglobulin subunit polypeptides encoded by polynucleotides comprised in such plasmid vectors be operably associated with transcriptional regulatory regions which are driven by proteins encoded by virus
10 vector which contains the other library. For example, if the first library is constructed in a poxvirus vector, and the second library is constructed in a plasmid vector, it is preferred that the polynucleotides encoding the second immunoglobulin subunit polypeptides constructed in the plasmid library be operably associated with a transcriptional control region, preferably a promoter,
15 which functions in the cytoplasm of poxvirus-infected cells. Similarly in the second step, if it is desired to insert the polynucleotides isolated from the first library into a plasmid vector, and the second library is constructed in a poxvirus vector, it is preferred that polynucleotides isolated from the first library and inserted into plasmids be operably associated with a transcriptional regulatory
20 region, preferably a promoter, which functions in the cytoplasm of poxvirus-infected cells. Suitable and preferred examples of such transcriptional control regions are disclosed herein. In this way, the polynucleotides of the second library are only expressed in those cells which have also been infected by a poxvirus.

25 However, it is convenient to be able to maintain both the first and second libraries, as well as those polynucleotides isolated from the first library, in just a virus vector rather than having to maintain one or both of the libraries in two different vector systems. Accordingly, the present invention provides that samples of the first or second libraries, maintained in a virus vector, are
30 inactivated such that the virus vector infects cells and the genome of virus vector is transcribed, but the vector is not replicated, *i.e.*, when the virus vector is

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-50-

introduced into cells, gene products carried on the virus genome, *e.g.*, immunoglobulin subunit polypeptides, are expressed, but infectious virus particles are not produced.

In a preferred aspect, inactivation of either the first or second library constructed in a eukaryotic virus vector is carried out by treating a sample of the library constructed in a virus vector with 4'-aminomethyl-trioxsalen (psoralen) and then exposing the virus vector to ultraviolet (UV) light. Psoralen and UV inactivation of viruses is well known to those of ordinary skill in the art. *See, e.g.*, Tsung, K., *et al.*, *J. Virol.* 70:165-171 (1996), which is incorporated herein by reference in its entirety.

Psoralen treatment typically comprises incubating a cell-free sample of the virus vector with a concentration of psoralen ranging from about 0.1 $\mu\text{g/ml}$ to about 20 $\mu\text{g/ml}$, preferably about 1 $\mu\text{g/ml}$ to about 17.5 $\mu\text{g/ml}$, about 2.5 $\mu\text{g/ml}$ to about 15 $\mu\text{g/ml}$, about 5 $\mu\text{g/ml}$ to about 12.5 $\mu\text{g/ml}$, about 7.5 $\mu\text{g/ml}$ to about 12.5 $\mu\text{g/ml}$, or about 9 $\mu\text{g/ml}$ to about 11 $\mu\text{g/ml}$. Accordingly, the concentration of psoralen may be about 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 7 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 9 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 11 $\mu\text{g/ml}$, 12 $\mu\text{g/ml}$, 13 $\mu\text{g/ml}$, 14 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 17 $\mu\text{g/ml}$, 18 $\mu\text{g/ml}$, 19 $\mu\text{g/ml}$, or 20 $\mu\text{g/ml}$. Preferably, the concentration of psoralen is about 10 $\mu\text{g/ml}$. As used herein, the term "about" takes into account that measurements of time, chemical concentration, temperature, pH, and other factors typically measured in a laboratory or production facility are never exact, and may vary by a given amount based on the type of measurement and the instrumentation used to make the measurement.

The incubation with psoralen is typically carried out for a period of time prior to UV exposure. This time period preferably ranges from about one minute to about 20 minutes prior to the UV exposure. Preferably, the time period ranges from about 2 minutes to about 19 minutes, from about 3 minutes to about 18 minutes, from about 4 minutes to about 17 minutes, from about 5 minutes to about 16 minutes, from about 6 minutes to about 15 minutes, from about 7 minutes to about 14 minutes, from about 8 minutes to about 13 minutes, or from

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-51-

about 9 minutes to about 12 minutes. Accordingly, the incubation time may be about 1 minute, about 2 minutes, about three minutes, about 4 minutes, about 5 minutes, about 6 minutes, about 7 minutes, about 8 minutes, about 9 minutes, about 10 minutes, about 11 minutes, about 12 minutes, about 13 minutes, about 14 minutes, about 15 minutes, about 16 minutes, about 17 minutes, about 18 minutes, about 19 minutes, or about 20 minutes. More preferably, the incubation is carried out for 10 minutes prior to the UV exposure.

The psoralen-treated viruses are then exposed to UV light. The UV may be of any wavelength, but is preferably long-wave UV light, *e.g.*, about 365 nm. Exposure to UV is carried out for a time period ranging from about 0.1 minute to about 20 minutes. Preferably, the time period ranges from about 0.2 minute to about 19 minutes, from about 0.3 minute to about 18 minutes, from about 0.4 minute to about 17 minutes, from about 0.5 minute to about 16 minutes, from about 0.6 minute to about 15 minutes, from about 0.7 minute to about 14 minutes, from about 0.8 minute to about 13 minutes, from about 0.9 minute to about 12 minutes, from about 1 minute to about 11 minutes, from about 2 minutes to about 10 minutes, from about 2.5 minutes to about 9 minutes, from about 3 minutes to about 8 minutes, from about 4 minutes to about 7 minutes, or from about 4.5 minutes to about 6 minutes. Accordingly, the incubation time may be about 0.1 minute, about 0.5 minute, about 1 minute, about 2 minutes, about three minutes, about 4 minutes, about 5 minutes, about 6 minutes, about 7 minutes, about 8 minutes, about 9 minutes, about 10 minutes, about 11 minutes, about 12 minutes, about 13 minutes, about 14 minutes, about 15 minutes, about 16 minutes, about 17 minutes, about 18 minutes, about 19 minutes, or about 20 minutes. More preferably, the virus vector is exposed to UV light for a period of about 5 minutes.

The ability to assemble and express immunoglobulin molecules or antigen-specific fragments thereof in eukaryotic cells from two libraries of polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides provides a significant improvement over the methods of producing single-chain antibodies in bacterial systems, in that the two-step selection process can be the basis for

selection of immunoglobulin molecules or antigen-specific fragments thereof with a variety of specificities.

Examples of specific embodiments which further illustrate, but do not limit this embodiment, are provided in the Examples below. As described in detail, *supra*, selection of specific immunoglobulin subunit polypeptides, *e.g.*, immunoglobulin heavy and light chains, is accomplished in two phases. First, a library of diverse heavy chains from immunoglobulin producing cells of either naïve or immunized donors is constructed in a eukaryotic virus vector, for example, a poxvirus vector, and a similarly diverse library of immunoglobulin light chains is constructed either in a plasmid vector, in which expression of the recombinant gene is regulated by a virus promoter, or in a eukaryotic virus vector which has been inactivated, *e.g.*, through psoralen and UV treatment. Host cells capable of expressing immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, are infected with virus vector encoding the heavy chain library at a multiplicity of infection of about 1 (MOI=1). "Multiplicity of infection" refers to the average number of virus particles available to infect each host cell. For example, if an MOI of 1, *i.e.*, an infection where, on average, each cell is infected by one virus particle, is desired, the number of infectious virus particles to be used in the infection is adjusted to be equal to the number of cells to be infected.

According to this strategy, host cells are either transfected with the light chain plasmid library, or infected with the inactivated light chain virus library under conditions which allow, on average, 10 or more separate polynucleotides encoding light chain polypeptides to be taken up and expressed in each cell. Under these conditions, a single host cell can express multiple immunoglobulin molecules, or fragments thereof, with different light chains associated with the same heavy chains in characteristic H₂L₂ structures in each host cell.

It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that controlling the number of plasmids taken up by a cell is difficult, because successful transfection depends on inducing a competent state in cells which may not be uniform and could lead to taking up variable amounts of DNA. Accordingly, in those embodiments where it is desired to carefully control the number of

polynucleotides from the second library which are introduced into each infected host cell, the use of an inactivated virus vector is preferred, because the multiplicity of infection of viruses is more easily controlled.

The expression of multiple light chains in a single host cell, associated with a single heavy chain, has the effect of reducing the avidity of specific antigen immunoglobulin, but may be beneficial for selection of relatively high affinity binding sites. As used herein, the term "affinity" refers to a measure of the strength of the binding of an individual epitope with the CDR of an immunoglobulin molecule. *See, e.g.,* Harlow at pages 27-28. As used herein, the term "avidity" refers to the overall stability of the complex between a population of immunoglobulins and an antigen, that is, the functional combining strength of an immunoglobulin mixture with the antigen. *See, e.g.,* Harlow at pages 29-34. Avidity is related to both the affinity of individual immunoglobulin molecules in the population with specific epitopes, and also the valencies of the immunoglobulins and the antigen. For example, the interaction between a bivalent monoclonal antibody and an antigen with a highly repeating epitope structure, such as a polymer, would be one of high avidity. As will be appreciated by those of ordinary skill in the art, if a host cell expresses immunoglobulin molecules on its surface, each comprising a given heavy chain, but where different immunoglobulin molecules on the surface comprise different light chains, the "avidity" of that host cell for a given antigen will be reduced. However, the possibility of recovering a group of immunoglobulin molecules which are related in that they comprise a common heavy chain, but which, through association with different light chains, react with a particular antigen with a spectrum of affinities, is increased. Accordingly, by adjusting the number of different light chains, or fragments thereof, which are allowed to associate with a certain number of heavy chains, or fragments thereof in a given host cell, the present invention provides a method to select for and enrich for immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, with varied affinity levels.

In utilizing this strategy in the first step of the method for selecting immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof as described

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-54-

above, the first library is preferably constructed in a eukaryotic virus vector, and the host cells are infected with the first library at an MOI ranging from about 1 to about 10, preferably about 1, while the second library is introduced under conditions which allow up to 20 polynucleotides of said second library to be taken up by each infected host cell. For example, if the second library is constructed in an inactivated virus vector, the host cells are infected with the second library at an MOI ranging from about 1 to about 20, although MOIs higher or lower than this range may be desirable depending on the virus vector used and the characteristics of the immunoglobulin molecules desired. If the second library is constructed in a plasmid vector, transfection conditions are adjusted to allow anywhere from 0 plasmids to about 20 plasmids to enter each host cell. Selection for lower or higher affinity responses to antigen is controlled by increasing or decreasing the average number of polynucleotides of the second library allowed to enter each infected cell.

More preferably, where the first library is constructed in a virus vector, host cells are infected with the first library at an MOI ranging from about 1-9, about 1-8, about 1-7, about 1-6, about 1-5, about 1-4, or about 1-2. In other words, host cells are infected with the first library at an MOI of about 10, about 9, about 8, about 7, about 6, about 5, about 4, about 3, about 2, or about 1. Most preferably, host cells are infected with the first library at an MOI of about 1.

Where the second library is constructed in a plasmid vector, the plasmid vector is more preferably introduced into host cells under conditions which allow up to about 19, about 18, about 17, about 16, about 15, about 14, about 13, about 12, about 10, about 9, about 8, about 7, about 6, about 5, about 4, about 3, about 2, or about 1 polynucleotide(s) of the second library to be taken up by each infected host cell. Most preferably, where the second library is constructed in a plasmid vector, the plasmid vector is introduced into host cells under conditions which allow up to about 10 polynucleotides of the second library to be taken up by each infected host cell.

Similarly, where the second library is constructed in an inactivated virus vector, it is more preferred to introduce the second library into host cells at an

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-55-

MOI ranging from about 1-19, about 2-18, about 3-17, about 4-16, about 5-15, about 6-14, about 7-13, about 8-12, or about 9-11. In other words, host cells are infected with the second library at an MOI of about 20, about 19, about 18, about 17, about 16, about 15, about 14, about 13, about 12, about 11, about 10, about 9, about 8, about 7, about 6, about 5, about 4, about 3, about 2, or about 1. In a most preferred aspect, host cells are infected with the second library at an MOI of about 10. As will be understood by those of ordinary skill in the art, the titer, and thus the "MOI" of an inactivated virus cannot be directly measured, however, the titer may be inferred from the titer of the starting infectious virus stock which was subsequently inactivated.

In a most preferred aspect, the first library is constructed in a virus vector and the second library is constructed in a virus vector which has been inactivated, the host cells are infected with said first library at an MOI of about 1, and the host cells are infected with the second library at an MOI of about 10.

In the present invention, a preferred virus vector is derived from a poxvirus, *e.g.*, vaccinia virus. If the first library encoding the first immunoglobulin subunit polypeptide is constructed in a poxvirus vector and the expression of second immunoglobulin subunit polypeptides, encoded by the second library constructed either in a plasmid vector or an inactivated virus vector, are regulated by a poxvirus promoter, high levels of the second immunoglobulin subunit polypeptide are expressed in the cytoplasm of the poxvirus infected cells without a requirement for nuclear integration.

In the second step of the immunoglobulin selection as described above, the second library is preferably constructed in an infectious eukaryotic virus vector, and the host cells are infected with the second library at an MOI ranging from about 1 to about 10. More preferably, where the second library is constructed in a virus vector, host cells are infected with the second library at an MOI ranging from about 1-9, about 1-8, about 1-7, about 1-6, about 1-5, about 1-4, or about 1-2. In other words, host cells are infected with the second library at an MOI of about 10, about 9, about 8, about 7, about 6, about 5, about 4, about

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-56-

3, about 2, or about 1. Most preferably, host cells are infected with the second library at an MOI of about 1.

In the second step of the immunoglobulin selection, polynucleotides from the first library have been isolated. In certain embodiments, a single first library polynucleotide, *i.e.*, a clone, is introduced into the host cells used to isolate polynucleotides from the second library. In this situation, the polynucleotides isolated from the first library are introduced into host cells under conditions which allow at least about 1 polynucleotide per host cell. However, since all the polynucleotides being introduced from the first library will be the same, *i.e.*, copies of a cloned polynucleotide, the number of polynucleotides introduced into any given host cell is less important. For example, if a cloned polynucleotide isolated from the first library is contained in an inactivated virus vector, that vector would be introduced at an MOI of about 1, but an MOI greater than 1 would be acceptable. Similarly, if a cloned polynucleotide isolated from the first library is introduced in a plasmid vector, the number of plasmids which are introduced into any given host cell is of little importance, rather, transfection conditions should be adjusted to insure that at least one polynucleotide is introduced into each host cell. An alternative embodiment may be utilized if, for example, several different polynucleotides were isolated from the first library. In this embodiment, pools of two or more different polynucleotides isolated from the first library may be advantageously introduced into host cells infected with the second library of polynucleotides. In this situation, if the polynucleotides isolated from the first library are contained in an inactivated virus vector, an MOI of inactivated virus particles of greater than about 1, *e.g.*, about 2, about 3, about 4, about 5, or more may be preferred, of if the polynucleotides isolated from the first library are contained in a plasmid vector, conditions which allow at least about 2, 3, 4, 5, or more polynucleotides to enter each cell, may be preferred.

Poxvirus Vectors. As noted above, a preferred virus vector for use in the present invention is a poxvirus vector. "Poxvirus" includes any member of the family Poxviridae, including the subfamilies Chordopoxviridae (vertebrate poxviruses) and Entomopoxviridae (insect poxviruses). *See*, for example, B.

Moss in: *Virology, 2d Edition*, B.N. Fields, D.M. Knipe *et al.*, Eds., Raven Press, p. 2080 (1990). The chordopoxviruses comprise, *inter alia*, the following genera: Orthopoxvirus (*e.g.*, vaccinia, variola virus, raccoon poxvirus); Avipoxvirus (*e.g.*, fowlpox); Capripoxvirus (*e.g.*, sheeppox) Leporipoxvirus (*e.g.*, rabbit (Shope) fibroma, and myxoma); and Suipoxvirus (*e.g.*, swinepox). The entomopoxviruses comprise three genera: A, B and C. In the present invention, orthopoxviruses are preferred. Vaccinia virus is the prototype orthopoxvirus, and has been developed and is well-characterized as a vector for the expression of heterologous proteins. In the present invention, vaccinia virus vectors, particularly those that have been developed to perform trimolecular recombination, are preferred. However, other orthopoxviruses, in particular, raccoon poxvirus have also been developed as vectors and in some applications, have superior qualities.

Poxviruses are distinguished by their large size and complexity, and contain similarly large and complex genomes. Notably, poxviruses replication takes place entirely within the cytoplasm of a host cell. The central portions of poxvirus genomes are similar, while the terminal portions of the virus genomes are characterized by more variability. Accordingly, it is thought that the central portion of poxvirus genomes carry genes responsible for essential functions common to all poxviruses, such as replication. By contrast, the terminal portions of poxvirus genomes appear responsible for characteristics such as pathogenicity and host range, which vary among the different poxviruses, and may be more likely to be non-essential for virus replication in tissue culture. It follows that if a poxvirus genome is to be modified by the rearrangement or removal of DNA fragments or the introduction of exogenous DNA fragments, the portion of the naturally-occurring DNA which is rearranged, removed, or disrupted by the introduction of exogenous DNA is preferably in the more distal regions thought to be non-essential for replication of the virus and production of infectious virions in tissue culture.

The naturally-occurring vaccinia virus genome is a cross-linked, double stranded linear DNA molecule, of about 186,000 base pairs (bp), which is characterized by inverted terminal repeats. The genome of vaccinia virus has been

completely sequenced, but the functions of most gene products remain unknown. Goebel, S.J., *et al.*, *Virology* 179:247-266, 517-563 (1990); Johnson, G.P., *et al.*, *Virology* 196:381-401. A variety of non-essential regions have been identified in the vaccinia virus genome. *See, e.g.*, Perkus, M.E., *et al.*, *Virology* 152:285-97 (1986); and Kotwal, G.J. and Moss B., *Virology* 167:524-37.

In those embodiments where poxvirus vectors, in particular vaccinia virus vectors, are used to express immunoglobulin subunit polypeptides, any suitable poxvirus vector may be used. It is preferred that the libraries of immunoglobulin subunit polypeptides be carried in a region of the vector which is non-essential for growth and replication of the vector so that infectious viruses are produced. Although a variety of non-essential regions of the vaccinia virus genome have been characterized, the most widely used locus for insertion of foreign genes is the thymidine kinase locus, located in the HindIII J fragment in the genome. In certain preferred vaccinia virus vectors, the tk locus has been engineered to contain one or two unique restriction enzyme sites, allowing for convenient use of the trimolecular recombination method of library generation. *See infra*, and also Zauderer, PCT Publication No. WO 00/028016.

Libraries of polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides are inserted into poxvirus vectors, particularly vaccinia virus vectors, under operable association with a transcriptional control region which functions in the cytoplasm of a poxvirus-infected cell.

Poxvirus transcriptional control regions comprise a promoter and a transcription termination signal. Gene expression in poxviruses is temporally regulated, and promoters for early, intermediate, and late genes possess varying structures. Certain poxvirus genes are expressed constitutively, and promoters for these "early-late" genes bear hybrid structures. Synthetic early-late promoters have also been developed. *See* Hammond J.M., *et al.*, *J. Virol. Methods* 66:135-8 (1997); Chakrabarti S., *et al.*, *Biotechniques* 23:1094-7 (1997). In the present invention, any poxvirus promoter may be used, but use of early, late, or constitutive promoters may be desirable based on the host cell and/or selection scheme chosen. Typically, the use of constitutive promoters is preferred.

Examples of early promoters include the 7.5-kD promoter (also a late promoter), the DNA pol promoter, the tk promoter, the RNA pol promoter, the 19-kD promoter, the 22-kD promoter, the 42-kD promoter, the 37-kD promoter, the 87-kD promoter, the H3' promoter, the H6 promoter, the D1 promoter, the D4 promoter, the D5 promoter, the D9 promoter, the D12 promoter, the I3 promoter, the M1 promoter, and the N2 promoter. *See, e.g., Moss, B., "Poxviridae and their Replication" IN Virology, 2d Edition, B.N. Fields, D.M. Knipe et al., Eds., Raven Press, p. 2088 (1990).* Early genes transcribed in vaccinia virus and other poxviruses recognize the transcription termination signal TTTTNT, where N can be any nucleotide. Transcription normally terminates approximately 50 bp upstream of this signal. Accordingly, if heterologous genes are to be expressed from poxvirus early promoters, care must be taken to eliminate occurrences of this signal in the coding regions for those genes. *See, e.g., Earl, P.L., et al., J. Virol. 64:2448-51 (1990).*

Example of late promoters include the 7.5-kD promoter, the MIL promoter, the 37-kD promoter, the 11-kD promoter, the 11L promoter, the 12L promoter, the 13L promoter, the 15L promoter, the 17L promoter, the 28-kD promoter, the H1L promoter, the H3L promoter, the H5L promoter, the H6L promoter, the H8L promoter, the D11L promoter, the D12L promoter, the D13L promoter, the A1L promoter, the A2L promoter, the A3L promoter, and the P4b promoter. *See, e.g., Moss, B., "Poxviridae and their Replication" IN Virology, 2d Edition, B.N. Fields, D.M. Knipe et al., Eds., Raven Press, p. 2090 (1990).* The late promoters apparently do not recognize the transcription termination signal recognized by early promoters.

Preferred constitutive promoters for use in the present invention include the synthetic early-late promoters described by Hammond and Chakrabarti, the MH-5 early-late promoter, and the 7.5-kD or "p7.5" promoter. Examples utilizing these promoters are disclosed herein.

As will be discussed in more detail below, certain selection and screening methods based on host cell death require that the mechanisms leading to cell death occur prior to any cytopathic effect (CPE) caused by virus infection. The

kinetics of the onset of CPE in virus-infected cells is dependent on the virus used, the multiplicity of infection, and the type of host cell. For example, in many tissue culture lines infected with vaccinia virus at an MOI of about 1, CPE is not significant until well after 48 to 72 hours post-infection. This allows a 2 to 3 day time frame for high level expression of immunoglobulin molecules, and antigen-based selection independent of CPE caused by the vector. However, this time frame may not be sufficient for certain selection methods, especially where higher MOIs are used, and further, the time before the onset of CPE may be shorter in a desired cell line. There is, therefore, a need for virus vectors, particularly poxvirus vectors such as vaccinia virus, with attenuated cytopathic effects so that, wherever necessary, the time frame of selection can be extended.

For example, certain attenuations are achieved through genetic mutation. These may be fully defective mutants, *i.e.*, the production of infectious virus particles requires helper virus, or they may be conditional mutants, *e.g.*, temperature sensitive mutants. Conditional mutants are particularly preferred, in that the virus-infected host cells can be maintained in a non-permissive environment, *e.g.*, at a non-permissive temperature, during the period where host gene expression is required, and then shifted to a permissive environment, *e.g.*, a permissive temperature, to allow virus particles to be produced. Alternatively, a fully infectious virus may be "attenuated" by chemical inhibitors which reversibly block virus replication at defined points in the infection cycle. Chemical inhibitors include, but are not limited to hydroxyurea and 5-fluorodeoxyuridine. Virus-infected host cells are maintained in the chemical inhibitor during the period where host gene expression is required, and then the chemical inhibitor is removed to allow virus particles to be produced.

A number of attenuated poxviruses, in particular vaccinia viruses, have been developed. For example, modified vaccinia Ankara (MVA) is a highly attenuated strain of vaccinia virus that was derived during over 570 passages in primary chick embryo fibroblasts (Mayr, A. *et al.*, *Infection* 3:6-14 (1975)). The recovered virus deleted approximately 15% of the wild type vaccinia DNA which profoundly affects the host range restriction of the virus. MVA cannot replicate

or replicates very inefficiently in most mammalian cell lines. A unique feature of the host range restriction is that the block in non-permissive cells occurs at a relatively late stage of the replication cycle. Expression of viral late genes is relatively unimpaired but virion morphogenesis is interrupted (Suter, G. and Moss, B., *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10847-51 (1992); Carroll, M.W. and Moss, B., *Virology* 238:198-211 (1997)). The high levels of viral protein synthesis even in non-permissive host cells make MVA an especially safe and efficient expression vector. However, because MVA cannot complete the infectious cycle in most mammalian cells, in order to recover infectious virus for multiple cycles of selection it will be necessary to complement the MVA deficiency by coinfection or superinfection with a helper virus that is itself deficient and that can be subsequently separated from infectious MVA recombinants by differential expansion at low MOI in MVA permissive host cells.

Poxvirus infection can have a dramatic inhibitory effect on host cell protein and RNA synthesis. These effects on host gene expression could, under some conditions, interfere with the selection of specific poxvirus recombinants that have a defined physiological effect on the host cell. Some strains of vaccinia virus that are deficient in an essential early gene have been shown to have greatly reduced inhibitory effects on host cell protein synthesis. Attenuated poxviruses which lack defined essential early genes have also been described. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,766,882, and 5,770,212, by Falkner, *et al.* Examples of essential early genes which may be rendered defective include, but are not limited to the vaccinia virus 17L, F18R, D13L, D6R, A8L, J1R, E7L, F11L, E4L, I1L, J3R, J4R, H7R, and A6R genes. A preferred essential early gene to render defective is the D4R gene, which encodes a uracil DNA glycosylase enzyme. Vaccinia viruses defective in defined essential genes are easily propagated in complementing cell lines which provides the essential gene product.

As used herein, the term "complementation" refers to a restoration of a lost function in trans by another source, such as a host cell, transgenic animal or helper virus. The loss of function is caused by loss by the defective virus of the gene product responsible for the function. Thus, a defective poxvirus is a non-

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-62-

viable form of a parental poxvirus, and is a form that can become viable in the presence of complementation. The host cell, transgenic animal or helper virus contains the sequence encoding the lost gene product, or "complementation element." The complementation element should be expressible and stably integrated in the host cell, transgenic animal or helper virus, and preferably would be subject to little or no risk for recombination with the genome of the defective poxvirus.

Viruses produced in the complementing cell line are capable of infecting non-complementing cells, and further are capable of high-level expression of early gene products. However, in the absence of the essential gene product, host shut-off, DNA replication, packaging, and production of infectious virus particles does not take place.

In particularly preferred embodiments described herein, selection of desired target gene products expressed in a complex library constructed in vaccinia virus is accomplished through coupling induction of expression of the complementation element to expression of the desired target gene product. Since the complementation element is only expressed in those host cells expressing the desired gene product, only those host cells will produce infectious virus which is easily recovered.

The preferred embodiments relating to vaccinia virus may be modified in ways apparent to one of ordinary skill in the art for use with any poxvirus vector. In the direct selection method, vectors other than poxvirus or vaccinia virus may be used.

The Tri-Molecular Recombination Method. Traditionally, poxvirus vectors such as vaccinia virus have not been used to identify previously unknown genes of interest from a complex libraries because a high efficiency, high titer-producing method of constructing and screening libraries did not exist for vaccinia. The standard methods of heterologous protein expression in vaccinia virus involve *in vivo* homologous recombination and *in vitro* direct ligation. Using homologous recombination, the efficiency of recombinant virus production is in the range of approximately 0.1% or less. Although efficiency of

recombinant virus production using direct ligation is higher, the resulting titer is relatively low. Thus, the use of vaccinia virus vector has been limited to the cloning of previously isolated DNA for the purposes of protein expression and vaccine development.

5 Tri-molecular recombination, as disclosed in Zauderer, PCT Publication No. WO 00/028016, is a novel, high efficiency, high titer-producing method for cloning in vaccinia virus. Using the tri-molecular recombination method, the present inventor has achieved generation of recombinant viruses at efficiencies of at least 90%, and titers at least 2 orders of magnitude higher than those
10 obtained by direct ligation.

Thus, in a preferred embodiment, libraries of polynucleotides capable of expressing immunoglobulin subunit polypeptides are constructed in poxvirus vectors, preferably vaccinia virus vectors, by tri-molecular recombination.

By "tri-molecular recombination" or a "tri-molecular recombination
15 method" is meant a method of producing a virus genome, preferably a poxvirus genome, and even more preferably a vaccinia virus genome comprising a heterologous insert DNA, by introducing two nonhomologous fragments of a virus genome and a transfer vector or transfer DNA containing insert DNA into a recipient cell, and allowing the three DNA molecules to recombine *in vivo*. As
20 a result of the recombination, a viable virus genome molecule is produced which comprises each of the two genome fragments and the insert DNA. Thus, the tri-molecular recombination method as applied to the present invention comprises:
(a) cleaving an isolated virus genome, preferably a DNA virus genome, more preferably a linear DNA virus genome, and even more preferably a poxvirus or
25 vaccinia virus genome, to produce a first viral fragment and a second viral fragment, where the first viral fragment is nonhomologous with the second viral fragment; (b) providing a population of transfer plasmids comprising polynucleotides which encode immunoglobulin subunit polypeptides, *e.g.*, immunoglobulin light chains, immunoglobulin heavy chains, or antigen-specific
30 fragments of either, through operable association with a transcription control region, flanked by a 5' flanking region and a 3' flanking region, wherein the 5'

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-64-

flanking region is homologous to said the viral fragment described in (a), and the 3' flanking region is homologous to said second viral fragment described in (a); and where the transfer plasmids are capable of homologous recombination with the first and second viral fragments such that a viable virus genome is formed; (c) introducing the transfer plasmids described in (b) and the first and second viral fragments described in (a) into a host cell under conditions where a transfer plasmid and the two viral fragments undergo *in vivo* homologous recombination, *i.e.*, trimolecular recombination, thereby producing a viable modified virus genome comprising a polynucleotide which encodes an immunoglobulin subunit polypeptide; and (d) recovering modified virus genomes produced by this technique. Preferably, the recovered modified virus genome is packaged in an infectious viral particle.

By "recombination efficiency" or "efficiency of recombinant virus production" is meant the ratio of recombinant virus to total virus produced during the generation of virus libraries of the present invention. As shown in Example 5, the efficiency may be calculated by dividing the titer of recombinant virus by the titer of total virus and multiplying by 100%. For example, the titer is determined by plaque assay of crude virus stock on appropriate cells either with selection (*e.g.*, for recombinant virus) or without selection (*e.g.*, for recombinant virus plus wild type virus). Methods of selection, particularly if heterologous polynucleotides are inserted into the viral thymidine kinase (*tk*) locus, are well-known in the art and include resistance to bromodeoxyuridine (BDUR) or other nucleotide analogs due to disruption of the *tk* gene. Examples of selection methods are described herein.

By "high efficiency recombination" is meant a recombination efficiency of at least 1%, and more preferably a recombination efficiency of at least about 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, or 99%.

A number of selection systems may be used, including but not limited to the thymidine kinase such as herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, *et al.*, 1977, Cell 11:223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

(Szybalska & Szybalski, 1962, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, *et al.*, 1980, *Cell* 22:817) genes which can be employed in tk⁻, hgp^rt⁻ or ap^rt⁻ cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for the following genes: dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler, *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567; O'Hare, *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan & Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Colberre-Garapin, *et al.*, 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1); and hyg^r, which confers resistance to hygromycin (Santerre, *et al.*, 1984, *Gene* 30:147).

Together, the first and second viral fragments or "arms" of the virus genome, as described above, preferably contain all the genes necessary for viral replication and for production of infectious viral particles. Examples of suitable arms and methods for their production using vaccinia virus vectors are disclosed herein. See also Falkner *et al.*, U.S. Pat. No. 5,770,212 for guidance concerning essential regions for vaccinia replication.

However, naked poxvirus genomic DNAs such as vaccinia virus genomes cannot produce infectious progeny without virus-encoded protein protein(s)/function(s) associated with the incoming viral particle. The required virus-encoded functions, include an RNA polymerase that recognizes the transfected vaccinia DNA as a template, initiates transcription and, ultimately, replication of the transfected DNA. See Dorner, *et al.* U.S. Pat. No. 5,445,953.

Thus, to produce infectious progeny virus by trimolecular recombination using a poxvirus such as vaccinia virus, the recipient cell preferably contains packaging function. The packaging function may be provided by helper virus, *i.e.*, a virus that, together with the transfected naked genomic DNA, provides appropriate proteins and factors necessary for replication and assembly of progeny virus.

The helper virus may be a closely related virus, for instance, a poxvirus of the same poxvirus subfamily as vaccinia, whether from the same or a different genus. In such a case it is advantageous to select a helper virus which provides

an RNA polymerase that recognizes the transfected DNA as a template and thereby serves to initiate transcription and, ultimately, replication of the transfected DNA. If a closely related virus is used as a helper virus, it is advantageous that it be attenuated such that formation of infectious virus will be impaired. For example, a temperature sensitive helper virus may be used at the non-permissive temperature. Preferably, a heterologous helper virus is used. Examples include, but are not limited to an avipox virus such as fowlpox virus, or an ectromelia virus (mouse pox) virus. In particular, avipoxviruses are preferred, in that they provide the necessary helper functions, but do not replicate, or produce infectious virions in mammalian cells (Scheifflinger, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9977-9981 (1992)). Use of heterologous viruses minimizes recombination events between the helper virus genome and the transfected genome which take place when homologous sequences of closely related viruses are present in one cell. See Fenner & Comben, *Virology* 5:530 (1958); Fenner, *Virology* 8:499 (1959).

Alternatively, the necessary helper functions in the recipient cell is supplied by a genetic element other than a helper virus. For example, a host cell can be transformed to produce the helper functions constitutively, or the host cell can be transiently transfected with a plasmid expressing the helper functions, infected with a retrovirus expressing the helper functions, or provided with any other expression vector suitable for expressing the required helper virus function. See Dorner, *et al.* U.S. Pat. No. 5,445,953.

According to the trimolecular recombination method, the first and second viral genomic fragments are unable to ligate or recombine with each other, *i.e.*, they do not contain compatible cohesive ends or homologous regions, or alternatively, cohesive ends have been treated with a dephosphorylating enzyme. In a preferred embodiment, a virus genome comprises a first recognition site for a first restriction endonuclease and a second recognition site for a second restriction endonuclease, and the first and second viral fragments are produced by digesting the viral genome with the appropriate restriction endonucleases to produce the viral "arms," and the first and second viral fragments are isolated by

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-67-

standard methods. Ideally, the first and second restriction endonuclease recognition sites are unique in the viral genome, or alternatively, cleavage with the two restriction endonucleases results in viral "arms" which include the genes for all essential functions, *i.e.*, where the first and second recognition sites are physically arranged in the viral genome such that the region extending between the first and second viral fragments is not essential for virus infectivity.

In a preferred embodiment where a vaccinia virus vector is used in the trimolecular recombination method, a vaccinia virus vector comprising a virus genome with two unique restriction sites within the tk gene is used. In certain preferred vaccinia virus genomes, the first restriction enzyme is NotI, having the recognition site GCGGCCGC in the tk gene, and the second restriction enzyme is ApaI, having the recognition site GGGCCC in the tk gene. Even more preferred are vaccinia virus vectors comprising a v7.5/tk virus genome or a vEL/tk virus genome.

According to this embodiment, a transfer plasmid with flanking regions capable of homologous recombination with the region of the vaccinia virus genome containing the thymidine kinase gene is used. A fragment of the vaccinia virus genome comprising the HindIII-J fragment, which contains the tk gene, is conveniently used.

Where the virus vector is a poxvirus, the insert polynucleotides are preferably operably associated with poxvirus expression control sequences, more preferably, strong constitutive poxvirus promoters such as p7.5 or a synthetic early/late promoter.

Accordingly, a transfer plasmid of the present invention comprises a polynucleotide encoding an immunoglobulin subunit polypeptide, *e.g.*, an heavy chain, and immunoglobulin light chain, or an antigen-specific fragment of a heavy chain or a light chain, through operable association with a vaccinia virus p7.5 promoter, or a synthetic early/late promoter.

A preferred transfer plasmid of the present invention which comprises a polynucleotide encoding an immunoglobulin heavy chain polypeptide through

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-68-

operable association with a vaccinia virus p7.5 promoter is pVHE, which comprises the sequence:

5 GGCCAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGGGCGCCAAACCATGGGATGGAGCTG
TATCATCTCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACAGG**CGCGCATATGGTCACCG**CTCTCTCAGGGAG
TGCAATCCGCCCAACCCCTTTTCCCTCTCTCTCTCTGTGAGAAATCCCGTGGATACGAGCAG
CGTGCGCGCTGGCTGCCTCGCACAGGACTTCTTCCCGACTCCATCACTTCTCTCGAAATA
CAAGAACTCTGACATCAGCAGCACCGGGGCTTCCCATCAGTCTGAGAGGGGCAAGTA
CGCAGCCACCTCACAGGTGCTGCTGCCTTCCAAGGACGTCAITGAGGGCACAGACGAACACGT
10 GGTGTGCAAAAGTCCAGCACCCCAACGGCAAAAGAAAAGACGTGCTCTTCCAGTGATTGC
TGAGCTGCTTCCAAAGTGAGCGCTCTTCGTCCACCCCGGACGGCTTCTTCGGCAACCCCG
CAGCAAGTCCAAGCTCATCTGCCAGGCCACGGGTTTCAGTCCCGGACAGATTGAGGTGCTG
GCTGCGGAGGGGAAGCAGGTGGGCTTGGCGTCCACACGGACAGGTGCAGGCTGAGGCCAA
AGAGTCTGGGCCACGACCTACAAGGTGACTAGCACACTGACCATCAAGAGAGCGACTGGCT
CAGCCAGAGCATGTTACCTGCCGCTGGATCACAGGGCTGACCTTCCAGCAGAATGGCTC
15 CTCCATGTGTGTCCTCGATCAAGACACAGCCATCCGGTCTTCGCCATCCCCCATCTTTGC
CAGCATCTCTCTCACCAAGTCCACCAAGTTGACCTGCTGGTACAGACCTGACCACTATGA
CAGCGTGACCATCTCTCTGGACCCGCCAGAATGGCAAGCTGTGAAAACCCACCAACATCTC
CGAGAGCCACCCCAATGCCACTTTCAGCGCGTGGGTGAGGCCAGCATCTCGAGGATGACTG
GAATTCGGGGAGAGGTTACGTGCAACCGTGACCCACACAGACCTGCCCTGGCACTGAAGCA
20 GACCATCTTCCGGGCCAAGGGGTGGCCCTGCACAGGCCGATGTCTACTTGTCTGCCACAGC
CCGGAGCAGCTGAACCTCGGGAGTCGGCCACCATCACGTGCTGTTGACGGCTTCTCTCC
CGCGGACCTCTTCTGTGAGTGATGCAGAGGGGGCAGCCCTTGTCCCCGAGAGATGTGTGAC
CAGCGCCCCAATGCTGAGCCCCAGGCCCGGCTACTTCCGCCACAGCATCTGACCGT
GTCCGAAGAGGAATGGACACCGGGGAGACCTACACCTGCGTGGTGGCCATGAGGCCCTGCC
25 CAACAGGTCACCTGAGAGGACCGTGACAAAGTCCACCGAGGGGGAGGTGAGCGCCGACGAGGA
GGGCTTTGAGAACCTGTGGGCCACCGCTCCACCTTCACTGCTCTTCTCTCTGAGCCTCTT
CTACGTACACCGTCACCTTGTCAAGGTGAAATGAGTCGAC

designated herein as SEQ ID NO:14. PCR-amplified heavy chain variable regions may be inserted in-frame into unique BssHII (at nucleotides 96-100 of SEQ ID NO:15), and BstEII (nucleotides 106-112 of SEQ ID NO:16) sites, which are indicated above in bold.

Furthermore, pVHE may be used in those embodiments where it is desired to transfer polynucleotides isolated from the first library into a plasmid vector for subsequent selection of polynucleotides of the second library as described above.

Another preferred transfer plasmid of the present invention which comprises a polynucleotide encoding an immunoglobulin kappa light chain

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-69-

polypeptide through operable association with a vaccinia virus p7.5 promoter is pVKE, which comprises the sequence:

5 GGCCAAAAATTGAAAACTAGATCTATTATTGCACGCGCGCCCATGGGATGGAGCTGTAT
CATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGCG**GTGCAC**TTGACT**CTCGAG**ATCAACGAACTGTGG
CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTG
TTGTGTGCTTGTGAATAA**CTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACG**
CCCTCCAATCGGGTA**ACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA**
GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA**AGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCTGCG**
10 AAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGG
TCGAC

designated herein as SEQ ID NO:17. PCR-amplified kappa light chain variable regions may be inserted in-frame into unique ApaLI (nucleotides 95-100 of SEQ ID NO:18), and XhoI (nucleotides 105-110 of SEQ ID NO:19) sites, which are indicated above in bold.

15 Furthermore, pVKE may be used in those embodiments where it is desired to have polynucleotides of the second library in a plasmid vector during the selection of polynucleotides of the first library as described above.

Another preferred transfer plasmid of the present invention which comprises a polynucleotide encoding an immunoglobulin lambda light chain polypeptide through operable association with a vaccinia virus p7.5 promoter is pVLE, which comprises the sequence:

20 GGCCAAAAATTGAAAACTAGATCTATTATTGCACGCGCGCCCATGGGATGGAGCTGTAT
CATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGCG**GTGCAC**TTGACTCGAG**AAAGCTT**ACCGTCTTAC
GAAGTGTGGTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
25 CTGCCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAA**CTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGG**
TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA**ACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA**
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA**AGCAGACTACGAGAAACACAAGTCT**
ACGCCCTGCGAACTACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGTAGGTCGAC

30 designated herein as SEQ ID NO:20. PCR-amplified lambda light chain variable regions may be inserted in-frame into unique ApaLI (nucleotides 95-100 of SEQ ID NO:21) and HindIII (nucleotides 111-116 of SEQ ID NO:22) sites, which are indicated above in bold.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-70-

Furthermore, pVLE may be used in those embodiments where it is desired to have polynucleotides of the second library in a plasmid vector during the selection of polynucleotides of the first library as described above.

By "insert DNA" is meant one or more heterologous DNA segments to be expressed in the recombinant virus vector. According to the present invention, "insert DNAs" are polynucleotides which encode immunoglobulin subunit polypeptides. A DNA segment may be naturally occurring, non naturally occurring, synthetic, or a combination thereof. Methods of producing insert DNAs of the present invention are disclosed herein.

By "transfer plasmid" is meant a plasmid vector containing an insert DNA positioned between a 5' flanking region and a 3' flanking region as described above. The 5' flanking region shares homology with the first viral fragment, and the 3' flanking region shares homology with the second viral fragment. Preferably, the transfer plasmid contains a suitable promoter, such as a strong, constitutive vaccinia promoter where the virus vector is a poxvirus, upstream of the insert DNA. The term "vector" means a polynucleotide construct containing a heterologous polynucleotide segment, which is capable of effecting transfer of that polynucleotide segment into a suitable host cell. Preferably the polynucleotide contained in the vector is operably linked to a suitable control sequence capable of effecting the expression of the polynucleotide in a suitable host. Such control sequences include a promoter to effect transcription, an optional operator sequence to control such transcription, a sequence encoding suitable mRNA ribosome binding sites, and sequences which control the termination of transcription and translation. As used herein, a vector may be a plasmid, a phage particle, a virus, a messenger RNA, or simply a potential genomic insert. Once transformed into a suitable host, the vector may replicate and function independently of the host genome, or may in some instances, integrate into the genome itself. Typical plasmid expression vectors for mammalian cell culture expression, for example, are based on pRK5 (EP 307,247), pSV16B (WO 91/08291) and pVL1392 (Pharminogen).

However, "a transfer plasmid," as used herein, is not limited to a specific plasmid or vector. Any DNA segment in circular or linear or other suitable form may act as a vehicle for transferring the DNA insert into a host cell along with the first and second viral "arms" in the tri-molecular recombination method. Other suitable vectors include lambda phage, mRNA, DNA fragments, etc., as described herein or otherwise known in the art. A plurality of plasmids may be a "primary library" such as those described herein for lambda.

Modifications of Trimolecular Recombination. Trimolecular recombination can be used to construct cDNA libraries in vaccinia virus with titers of the order of about 10^7 pfu. There are several factors that limit the complexity of these cDNA libraries or other libraries. These include: the size of the primary cDNA library or other library, such as a library of polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides, that can be constructed in a plasmid vector, and the labor involved in the purification of large quantities (hundreds of micrograms) of virus "arms," preferably vaccinia virus "arms" or other poxvirus "arms." Modifications of trimolecular recombination that would allow for vaccinia or other virus DNA recombination with primary cDNA libraries or other libraries, such as polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides, constructed in bacteriophage lambda or DNA or phagemids derived therefrom, or that would allow separate virus DNA arms to be generated *in vivo* following infection with a modified viral vector could greatly increase the quality and titer of the eukaryotic virus cDNA libraries or other libraries that are constructed using these methods.

Transfer of cDNA inserts from a Bacteriophage Lambda Library to Vaccinia Virus. Lambda phage vectors have several advantages over plasmid vectors for construction of cDNA libraries or other libraries, such as polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides. Plasmid cDNA (or other DNA insert) libraries or linear DNA libraries are introduced into bacteria cells by chemical/heat shock transformation, or by electroporation. Bacteria cells are preferentially transformed by smaller plasmids, resulting in a potential loss of representation of longer cDNAs or other insert DNA, such as

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-72-

polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides, in a library. In addition, transformation is a relatively inefficient process for introducing foreign DNA or other DNA into a cell requiring the use of expensive commercially prepared competent bacteria in order to construct a cDNA library or other library, such as polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides. In contrast, lambda phage vectors can tolerate cDNA inserts of 12 kilobases or more without any size bias. Lambda vectors are packaged into virions *in vitro* using high efficiency commercially available packaging extracts so that the recombinant lambda genomes can be introduced into bacterial cells by infection. This results in primary libraries with higher titers and better representation of large cDNAs or other insert DNA, such as polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides, than is commonly obtained in plasmid libraries.

To enable transfer of cDNA inserts or other insert DNA, such as polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides, from a library constructed in a lambda vector to a eukaryotic virus vector such as vaccinia virus, the lambda vector must be modified to include vaccinia virus DNA sequences that allow for homologous recombination with the vaccinia virus DNA. The following example uses vaccinia virus homologous sequences, but other viruses may be similarly used. For example, the vaccinia virus HindIII J fragment (comprising the vaccinia tk gene) contained in plasmid p7.5/ATG0/tk (as described in Example 5, *infra*) can be excised using HindIII and SnaBI (3 kb of vaccinia DNA sequence), and subcloned into the HindIII/SnaBI sites of pT7Blue3 (Novagen cat no. 70025-3) creating pT7B3.Vtk. The vaccinia tk gene can be excised from this vector with SacI and SnaBI and inserted into the SacI/SmaI sites of Lambda Zap Express (Stratagene) to create lambda.Vtk. The lambda.Vtk vector will contain unique NotI, BamHI, SmaI, and SalI sites for insertion of cDNA downstream of the vaccinia 7.5k promoter. cDNA libraries can be constructed in lambda.Vtk employing methods that are well known in the art.

DNA from a cDNA library or other library, such as polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides, constructed in lambda.Vtk, or any similar bacteriophage that includes cDNA inserts or other insert DNA with

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-73-

flanking vaccinia DNA sequences to promote homologous recombination, can be employed to generate cDNA or other insert DNA recombinant vaccinia virus. Methods are well known in the art for excising a plasmid from the lambda genome by coinfection with a helper phage (ExAssist phage, Stratagene cat no. 211203). Mass excision from a lambda based library creates an equivalent cDNA library or other library in a plasmid vector. Plasmids excised from, for example, the lambda.Vtk cDNA library will contain the vaccinia tk sequences flanking the cDNA inserts or other insert DNAs, such as polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides. This plasmid DNA can then be used to construct vaccinia recombinants by trimolecular recombination. Another embodiment of this method is to purify the lambda DNA directly from the initial lambda.Vtk library, and to transfect this recombinant viral (lambda) DNA or fragments thereof together with the two large vaccinia virus DNA fragments for trimolecular recombination.

Generation of vaccinia arms *in vivo*. Purification and transfection of vaccinia DNA or other virus DNA "arms" or fragments is a limiting factor in the construction of polynucleotide libraries by trimolecular recombination. Modifications to the method to allow for the requisite generation of virus arms, in particular vaccinia virus arms, *in vivo* would allow for more efficient construction of libraries in eukaryotic viruses.

Host cells can be modified to express a restriction endonuclease that recognizes a unique site introduced into a virus vector genome. For example, when a vaccinia virus infects these host cells, the restriction endonuclease will digest the vaccinia DNA, generating "arms" that can only be repaired, *i.e.*, rejoined, by trimolecular recombination. Examples of restriction endonucleases include the bacterial enzymes NotI and ApaI, the Yeast endonuclease VDE (R. Hirata, Y. Ohsumi, A. Nakano, H. Kawasaki, K. Suzuki, Y. Anraku. 1990 *J. Biological Chemistry* 265: 6726-6733), the *Chlamydomonas eugametos* endonuclease I-CeuI and others well-known in the art. For example, a vaccinia strain containing unique NotI and ApaI sites in the *tk* gene has already been

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-74-

constructed, and a strain containing unique VDE and/or I-CeuI sites in the *tk* gene could be readily constructed by methods known in the art.

Constitutive expression of a restriction endonuclease would be lethal to a cell, due to the fragmentation of the chromosomal DNA by that enzyme. To avoid this complication, in one embodiment host cells are modified to express the gene(s) for the restriction endonuclease(s) under the control of an inducible promoter.

A preferred method for inducible expression utilizes the Tet-On Gene Expression System (Clontech). In this system expression of the gene encoding the endonuclease is silent in the absence of an inducer (tetracycline). This makes it possible to isolate a stably transfected cell line that can be induced to express a toxic gene, *i.e.*, the endonuclease (Gossen, M. *et al.*, *Science* 268: 1766-1769 (1995)). The addition of the tetracycline derivative doxycycline induces expression of the endonuclease. In a preferred embodiment, BSC1 host cells will be stably transfected with the Tet-On vector controlling expression of the NotI gene. Confluent monolayers of these cells will be induced with doxycycline and then infected with ν 7.5/*tk* (unique NotI site in *tk* gene), and transfected with cDNA or insert DNA recombinant transfer plasmids or transfer DNA or lambda phage or phagemid DNA. Digestion of exposed vaccinia DNA at the unique NotI site, for example, in the *tk* gene or other sequence by the NotI endonuclease encoded in the host cells produces two large vaccinia DNA fragments which can give rise to full-length viral DNA only by undergoing trimolecular recombination with the transfer plasmid or phage DNA. Digestion of host cell chromosomal DNA by NotI is not expected to prevent production of modified infectious viruses because the host cells are not required to proliferate during viral replication and virion assembly.

In another embodiment of this method to generate virus arms such as vaccinia arms *in vivo*, a modified vaccinia strain is constructed that contains a unique endonuclease site in the *tk* gene or other non-essential gene, and also contains a heterologous polynucleotide encoding the endonuclease under the control of the T7 bacteriophage promoter at another non-essential site in the

vaccinia genome. Infection of cells that express the T7 RNA polymerase would result in expression of the endonuclease, and subsequent digestion of the vaccinia DNA by this enzyme. In a preferred embodiment, the v7.5/tk strain of vaccinia is modified by insertion of a cassette containing the cDNA encoding NotI with expression controlled by the T7 promoter into the HindIII C or F region (Coupar, E.H.B. *et al.*, *Gene* 68: 1-10 (1988); Flexner, C. *et al.*, *Nature* 330: 259-262 (1987)), generating v7.5/tk/T7NotI. A cell line is stably transfected with the cDNA encoding the T7 RNA polymerase under the control of a mammalian promoter as described (O. Elroy-Stein, B. Moss. 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6743-6747). Infection of this packaging cell line with v7.5/tk/T7NotI will result in T7 RNA polymerase dependent expression of NotI, and subsequent digestion of the vaccinia DNA into arms. Infectious full-length viral DNA can only be reconstituted and packaged from the digested vaccinia DNA arms following trimolecular recombination with a transfer plasmid or phage DNA. In yet another embodiment of this method, the T7 RNA polymerase can be provided by co-infection with a T7 RNA polymerase recombinant helper virus, such as fowlpox virus (P. Britton, P. Green, S. Kottier, K.L. Mawditt, Z. Penzes, D. Cavanagh, M.A. Skinner. 1996 *J. General Virology* 77: 963-967).

A unique feature of trimolecular recombination employing these various strategies for generation of large virus DNA fragments, preferably vaccinia DNA fragments *in vivo* is that digestion of the vaccinia DNA may, but does not need to precede recombination. It suffices that only recombinant virus escapes destruction by digestion. This contrasts with trimolecular recombination employing transfection of vaccinia DNA digested *in vitro* where, of necessity, vaccinia DNA fragments are created prior to recombination. It is possible that the opportunity for bimolecular recombination prior to digestion will yield a greater frequency of recombinants than can be obtained through trimolecular recombination following digestion.

Selection and Screening Strategies for Isolation of Recombinant Immunoglobulin Molecules Using Virus Vectors, Especially Poxviruses. In certain embodiments of the present invention, the trimolecular recombination

method is used in the production of libraries of polynucleotides expressing immunoglobulin subunit polypeptides. In this embodiment, libraries comprising full-length immunoglobulin subunit polypeptides, or fragments thereof, are prepared by first inserting cassettes encoding immunoglobulin constant regions and signal peptides into a transfer plasmid which contains 5' and 3' regions homologous to vaccinia virus. Rearranged immunoglobulin variable regions are isolated by PCR from pre-B cells from unimmunized animals or from B cells or plasma cells from immunized animals. These PCR fragments are cloned between, and in frame with the immunoglobulin signal peptide and constant region, to produce a coding region for an immunoglobulin subunit polypeptide. These transfer plasmids are introduced into host cells with poxvirus "arms," and the tri-molecular recombination method is used to produce the libraries.

The present invention provides a variety of methods for identifying, *i.e.*, selecting or screening for immunoglobulin molecules with a desired specificity, where the immunoglobulin molecules are produced *in vitro* in eukaryotic cells. These include selecting for host cell effects such as antigen-induced cell death and antigen-induced signaling, screening pools of host cells for antigen-specific binding, and screening the medium in which pools of host cells are grown for the presence of soluble immunoglobulin molecules with a desired antigenic specificity or a desired functional characteristic.

As disclosed in detail herein, methods are provided to identify immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof expressed in eukaryotic cells on the basis of either antigen-induced cell death, antigen-induced signaling, antigen-specific binding, or other antigen-specific functions. The selection and screening techniques of the present invention eliminate the bias imposed by selection of antibodies in rodents or the limitations of synthesis and assembly in bacteria.

Many of the identification methods described herein depend on expression of host cell genes or host cell transcriptional regulatory regions, which directly or indirectly induce cell death or produce a detectable signal in response to antigen binding to immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments

thereof, expressed on the surface of the host cells. It is important to note that most preferred embodiments of the present invention require that host cells be infected with a eukaryotic virus vector, preferably a poxvirus vector, and even more preferably a vaccinia virus vector. It is well understood by those of ordinary skill in the art that some host cell protein synthesis is rapidly shut down upon poxvirus infection in some cell lines, even in the absence of viral gene expression. This is problematic if upregulation of host cell genes or host cell transcriptional regulatory regions is required in order to induce antigen-induced cell death or cell signaling. This problem is not intractable, however, because in certain cell lines, inhibition of host protein synthesis remains incomplete until after viral DNA replication. See Moss, B., "Poxviridae and their Replication" IN *Virology*, 2d Edition, B.N. Fields, D.M. Knipe *et al.*, Eds., Raven Press, p. 2096 (1990). There is a need, however, to rapidly screen a variety of host cells for their ability to express gene products which are upregulated upon cross linking of surface-expressed immunoglobulin molecules upon infection by a eukaryotic virus vector, preferably a poxvirus vector, and even more preferably a vaccinia virus vector; and to screen desired host cells for differential expression of cellular genes upon virus infection with various mutant and attenuated viruses.

Accordingly, a method is provided for screening a variety of host cells for the expression of host cell genes and/or the operability of host cell transcriptional regulatory regions effecting antigen-induced cell death or cell signaling, upon infection by a virus vector, through expression profiling of particular host cells in microarrays of ordered cDNA libraries. Expression profiling in microarrays is described in Duggan, D.J., *et al.*, *Nature Genet.* 21(1 Suppl):10-14 (1999), which is incorporated herein by reference in its entirety.

According to this method, expression profiling is used to compare host cell gene expression patterns in uninfected host cells and host cells infected with a eukaryotic virus expression vector, preferably a poxvirus vector, even more preferably a vaccinia virus vector, where the particular eukaryotic virus vector is the vector used to construct said first and said second libraries of polynucleotides of the present invention. In this way, suitable host cells capable of expressing

immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof on their surface, and which further continue to undergo expression of the necessary inducible proteins upon infection with a given virus, can be identified.

Expression profiling is also used to compare host cell gene expression patterns in a given host cell, for example, comparing expression patterns when the host cell is infected with a fully infectious virus vector, and when the host cell is infected with a corresponding attenuated virus vector. Expression profiling in microarrays allows large-scale screening of host cells infected with a variety of attenuated viruses, where the attenuation is achieved in a variety of different ways. For example, certain attenuations are achieved through genetic mutation. Many vaccinia virus mutants have been characterized. These may be fully defective mutants, *i.e.*, the production of infectious virus particles requires helper virus, or they may be conditional mutants, *e.g.*, temperature sensitive mutants. Conditional mutants are particularly preferred, in that the virus-infected host cells can be maintained in a non-permissive environment, *e.g.*, at a non-permissive temperature, during the period where host gene expression is required, and then shifted to a permissive environment, *e.g.*, a permissive temperature, to allow virus particles to be produced. Alternatively, a fully infectious virus may be "attenuated" by chemical inhibitors which reversibly block virus replication at defined points in the infection cycle. Chemical inhibitors include, but are not limited to hydroxyurea and 5-fluorodeoxyuridine. Virus-infected host cells are maintained in the chemical inhibitor during the period where host gene expression is required, and then the chemical inhibitor is removed to allow virus particles to be produced.

Using this method, expression profiling in microarrays may be used to identify suitable host cells, suitable transcription regulatory regions, and/or suitable attenuated viruses in any of the selection methods described herein.

In one embodiment, a selection method is provided to select polynucleotides encoding immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, based on direct antigen-induced apoptosis. According to this method, a host cell is selected for infection and/or transfection that is an early B

cell lymphoma. Suitable early B cell lymphoma cell lines include, but are not limited to CH33 cells, CH31 cells (Pennell, C.A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3799-3803 (1985)), or WEHI-231 cells (Boyd, A.W. and Schrader, J.W. *J. Immunol.* 126:2466-2469 (1981)). Early B cell lymphoma cell lines respond to crosslinking of antigen-specific immunoglobulin by induction of spontaneous growth inhibition and apoptotic cell death (Pennell, C.A., and Scott, D.W. *Eur. J. Immunol.* 16:1577-1581 (1986); Tisch, R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:69114-6918 (1988); Ales-Martinez, J.E., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:69119-6923 (1988); Warner, G.L., and Scott, D.W. *Cell. Immunol.* 115:195-203 (1988)). Following infection and/or transfection with the first and second polynucleotide libraries as described above, synthesis and assembly of antibody molecules is allowed to proceed for a time period ranging from about 5 hours to about 48 hours, preferably for about 6 hours, about 10 hours, about 12 hours, about 16 hours about 20 hours, about 24 hours about 30 hours, about 36 hours, about 40 hours, or about 48 hours, even more preferably for about 12 hours or for about 24 hours; at which time the host cells are contacted with specific antigen, in order to cross-link any specific immunoglobulin receptors (*i.e.*, membrane-bound immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof) and induce apoptosis in those immunoglobulin expressing host cells which directly respond to cross-linking of antigen-specific immunoglobulin by induction of growth inhibition and apoptotic cell death. Host cells which have undergone apoptosis, or their contents, including the polynucleotides encoding an immunoglobulin subunit polypeptide which are contained therein, are recovered, thereby enriching for polynucleotides of the first library which encode a first immunoglobulin subunit polypeptide which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, specifically binds the antigen of interest.

Upon further selection and enrichment steps for polynucleotides of the first library, and isolation of those polynucleotides, a similar process is carried out to recover polynucleotides of the second library which, as part of an

immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, bind the desired specific antigen.

An example of this method is shown in Fig. 1. A "first library" of polynucleotides encoding diverse heavy chains from antibody producing cells of either naïve or immunized donors is constructed in a poxvirus vector, preferably a vaccinia virus vector, and a similarly diverse "second library" of polynucleotides encoding immunoglobulin light chains is constructed in a plasmid vector in which expression of the polynucleotides is regulated by a vaccinia promoter, preferably a synthetic early/late promoter, for example the p11 promoter, or the p7.5 promoter. Preferably for this embodiment, the immunoglobulin heavy chain constant region encoded by the poxvirus constructs is designed to retain the transmembrane region that results in expression of immunoglobulin receptor on the surface membrane. Eukaryotic cells, preferably early B cell lymphoma cells, are infected with the pox virus heavy chain library at a multiplicity of infection of about 1 (MOI=1). Two hours later the infected cells are transfected with the light chain plasmid library under conditions which allow, on average, 10 or more separate light chain recombinant plasmids to be taken up and expressed in each cell. Because expression of the recombinant gene in this plasmid is regulated by a vaccinia virus promoter, high levels of the recombinant gene product are expressed in the cytoplasm of vaccinia virus infected cells without a requirement for nuclear integration. In addition, a sequence independent mechanism for amplification of circular DNA in the cytoplasm of vaccinia virus infected cell results in even higher concentrations of the transfected light chain recombinant plasmids (Merchlinsky, M., and Moss, B. *Cancer Cells* 6:87-93 (1988)). These two factors contribute to the high levels of expression that result in excess light chain synthesis.

Another preferred embodiment utilizes a T7 phage promoter, which is active in cells in which T7 RNA polymerase is expressed, for the regulation of the expression of polynucleotides encoding a "first library" of polynucleotides encoding diverse heavy chains from antibody producing cells of either naïve or immunized donors constructed in a poxvirus vector, preferably a vaccinia virus

vector, and a similarly diverse "second library" of polynucleotides encoding immunoglobulin light chains is constructed in a plasmid vector (Eckert D. and Merchlinsky M. *J Gen Virol.* 80 (Pt 6):1463-9 (1999); Elroy-Stein O., Fuerst T.R. and Moss B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(16):6126-30 (1989); Fuerst T.R., Earl P.L. and Moss B. *Mol Cell Biol.* 7(7):2538-44 (1987); Elroy-Stein O. and Moss B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(17):6743-7 (1990); Cottet S. and Corthesy B. *Eur J Biochem* 246(1):23-31.).

As will be readily appreciated by those of ordinary skill in the art, kinetic considerations are very important in the design of this experiment as the pox virus derived expression vector is itself cytopathic in a time frame of about 1 to 10 days, more usually about 2 to 8 days, 2 to 6 days, or 2 to 4 days, depending on the virus vector used, the particular host cell, and the multiplicity of infection. In a preferred embodiment, a B cell lymphoma is selected for which the apoptotic response to surface immunoglobulin crosslinking is rapid relative to the natural cytopathic effects of pox virus infection in that cell. Accordingly, it is preferred that apoptosis in response to antigen-induced cross-linking of immunoglobulin molecules on the surface of the host cells occurs within a period between about 1 hour to about 4 days after contacting the host cells with antigen, so as to precede induction of CPE. More preferably, apoptosis occurs within about 1 hour about 2 hours, about 3 hours about 4 hours, about 5 hours, about 6 hours, about 7 hours, about 8 hours, about 9 hours, about 10 hours, about 11 hours, about 12 hours, about 14 hours, about 16 hours, about 18 hours, about 20 hours, about 22 hours, about 24 hours, about 28 hours, about 32 hours, about 36 hours, about 40 hours, about 44 hours, or about 48 hours after contacting the host cells with antigen. Even more preferably apoptosis is induced within about 12 hours of contacting the host cells with antigen. Alternatively, an attenuated poxvirus vector is employed with a much slower kinetics of induction of cytopathic effects. Attenuated poxvirus vectors are disclosed herein.

According to this method, host cells which express antigen-specific immunoglobulins on their surface are selected upon undergoing apoptosis. For example, if the host cells are attached to a solid substrate, those cells which

undergo apoptosis are released from the substrate and are recovered by harvesting the liquid medium in which the host cells are cultured. Alternatively, the host cells are attached to a solid substrate, and those cells which undergo apoptosis undergo a lytic event, thereby releasing their cytoplasmic contents into the liquid medium in which the host cells are cultured. Virus particles released from these cells can then be harvested in the liquid medium.

A host cell containing a polynucleotide encoding an immunoglobulin subunit polypeptide may become "nonadherent" or "nonviable" by any mechanism, which may include lysis, inability to adhere, loss of viability, loss of membrane integrity, loss of structural stability, disruption of cytoskeletal elements, inability to maintain membrane potential, arrest of cell cycle, inability to generate energy, etc. Thus, host cells containing target polynucleotides may be recovered, *i.e.*, separated from remaining cells, by any physical means such as aspiration, washing, filtration, centrifugation, cell sorting, fluorescence activated cell sorting (FACS), etc.

For example, host cells containing polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides may lyse and thereby release recombinant virus particles, preferably poxvirus particles even more preferably vaccinia virus particles into the culture media or may become nonadherent and therefore lift away from the solid support. Thus, in a preferred embodiment, released recombinant viruses and/or nonadherent cells are separated from adherent cells by aspiration or washing.

Where the host cells are an early B cell lymphoma cell line, the cells may be attached to a solid substrate through interaction with a B cell-specific antibody which has been bound to the substrate. Suitable B cell-specific antibodies include, but are not limited to an anti-CD 19 antibody and an anti-CD 20 antibody.

In other preferred embodiments, antigen-induced cell death is effected directly or indirectly by employing a host cell transfected with a construct in which a foreign polynucleotide, the expression of which indirectly results in cell

death, is operably associated with a transcriptional regulatory region which is induced upon cross-linking of surface immunoglobulin molecules.

By a "transcriptional regulatory region induced upon cross-linking of surface immunoglobulin molecules" is meant a region, for example, a host cell promoter, which normally regulates a gene that is upregulated in the host cell upon cross linking of surface-expressed immunoglobulin molecules. A preferred example of such a transcriptional regulatory region is the BAX promoter, which is upregulated in early B cell lymphoma cells upon cross linking of surface immunoglobulin molecules.

In one embodiment, illustrated in Fig. 2A and Fig. 2B, a method is provided to induce cell death upon expression of a foreign polynucleotide encoding a cytotoxic T cell (CTL) epitope. The foreign polynucleotide encoding the CTL epitope is placed in operable association with a transcriptional regulatory region which is induced upon cross-linking of surface immunoglobulin molecules. Upon antigen-induced cross-linking of immunoglobulin molecules of the surface of host cells, the CTL epitope is expressed on the surface of the host cell in the context of a defined MHC molecule, also expressed on the surface of the host cell. The cells are contacted with epitope-specific CTLs which recognize the CTL epitope in the context of the defined MHC molecule, and the cells expressing the CTL epitope rapidly undergo a lytic event. Methods of selecting and recovering host cells expressing specific CTL epitopes are further disclosed in Zauderer, PCT Publication No. WO 00/028016.

Selection of the host cells is accomplished through recovering those cells, or the contents thereof, which have succumbed to cell death and/or have undergone a lytic event. For example, if host cells are chosen which grow attached to a solid support, those host cells which succumb to cell death and/or undergo a lytic event will be released from the support and can be recovered in the cell supernatant. Alternatively virus particles released from host cells which have succumbed to cell death and/or undergone a lytic event may be recovered from the cell supernatant.

According to this embodiment, the MHC molecule expressed on the surface of the host cells may be either a class I MHC molecule or a class II MHC molecule. In a particularly preferred embodiment, the MHC molecule expressed on the host cells is an H-2K^d molecule, and the CTL epitope which is expressed upon antigen-induced cross linking is the peptide GYKAGMIHI, designated herein as SEQ ID NO:23.

In utilizing this method, any host cell which is capable of expressing immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, on its surface may be used. Suitable host cells include immunoglobulin-negative plasmacytoma cell lines. Examples of such cell lines include, but are not limited to, an NS1 cell line, an Sp2/0 cell line, and a P3 cell line. Other suitable cell lines will be apparent to those of ordinary skill in the art.

In another preferred embodiment, also illustrated in Fig. 2A and Fig. 2B, a method is provided wherein cell death is induced indirectly by employing a host cell transfected with a construct in which the a heterologous polynucleotide comprising a "suicide" gene is operably associated with a transcriptional regulatory region which is induced upon cross-linking of surface immunoglobulin molecules. By "suicide gene" is meant a nucleic acid molecule which causes cell death when expressed. Polynucleotides useful as suicide genes include many cell death-inducing sequences which are known in the art. Preferred suicide genes are those which encode toxins such as *Pseudomonas* exotoxin A chain, diphtheria A chain, ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, and alpha-sarcin. A preferred suicide gene encodes the diphtheria A toxin subunit. Upon antigen-induced cross-linking of immunoglobulin molecules of the surface of host cells, the promoter of the apoptosis induced gene is induced, thereby allowing expression of the suicide gene, and thereby promoting cell death.

In utilizing this method, any host cell may be used which is capable of expressing immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, on its surface, and in which a transcriptional regulatory region can be identified by expression profiling, which is induced upon cross-linking of surface immunoglobulin molecules. Suitable host cells include early B cell lymphoma

cell lines and immunoglobulin-negative plasmacytoma cell lines. Examples of such cell lines include, but are not limited to, a CH33 cell line, a CH 31 cell line, a WEHI-231 cell line, an NS1 cell line, an Sp2/0 cell line, and a P3 cell line. Other suitable cell lines will be apparent to those of ordinary skill in the art.

5 Where the host cells are an Ig-negative plasmacytoma cell line, the cells may be attached to a solid substrate through interaction with a plasmacytoma-specific antibody which has been bound to the substrate. Suitable plasmacytoma-specific antibodies include, but are not limited to an anti-CD38 antibody (Yi, Q., *et al.*, *Blood* 90:1960-1967 (1997)), an anti-CD31 antibody (Medina, F., *et al.*, *Cytometry* 39:231-234 (2000)), an anti-CD20 antibody (Haghighi, B., *et al.*, *Am. J. Hematol.* 59:302-308 (1998)), and an anti-CD10 antibody (Dunphy, C.H., *Acta. Cytol.* 40:358-362 (1996)).

15 Direct and indirect antigen-induced cell death methods as described herein may also be combined. For example, in those embodiments where the host cell is an early B cell lymphoma, and antigen cross-linking directly induces apoptosis, antigen-induced cell death may be accelerated by transfecting the early B cell lymphoma host cell with a construct in which the a polynucleotide encoding a foreign cytotoxic T cell epitope is operably associated with a transcriptional regulatory region which is induced upon cross-linking of surface immunoglobulin molecules. Upon contacting antigen cross-linked cells with specific cytotoxic T cells as described, cell death is accelerated. Similarly, in those embodiments where the host cell is an early B cell lymphoma, and antigen cross-linking directly effects apoptosis as described above, antigen-induced cell death may be accelerated by transfecting the early B cell lymphoma host cell with a construct

20 in which a suicide gene is operably associated with a transcriptional regulatory region which is induced upon cross-linking of surface immunoglobulin molecules.

25 Immunoglobulin heavy chains can be modified so that a specific antigen will induce a readily detectable signal in cells in which the receptor is crosslinked by specific antigen. A preferred embodiment is to use an apoptosis induction system to select for cell killing as a consequence of expression of an antigen-

30

specific receptor. An example of an apoptosis induction system involves the human FAS (CD95, APO-1) receptor, which is a member of the tumor necrosis-
nerve growth factor receptor superfamily recognized for its role in regulating
apoptosis through recruitment and assembly of a death-inducing signaling
5 complex that activates a cascade of proteolytic caspases. Several reports have
described a FAS-based inducible cell death system whereby apoptosis could be
induced through chimeric proteins containing the cytoplasmic "death domain" of
FAS coupled to various receptors allowing for induction of apoptosis through a
variety of cell modulators. Ishiwatari-Hayasaka *et al.* have successfully used the
10 extracellular domain of mouse CD44 with human FAS to induce apoptosis upon
cross-linking with polyvalent anti-CD44 antibodies (Ishiwatari-Hayasaka H. *et al.* *J Immunol* 163:1258-64 (1999)). In addition, Takahashi *et al.* have
demonstrated that a chimeric human G-CSFR/FAS (extracellular/cytoplasmic)
protein is capable of inducing apoptosis upon cross-linking with anti-G-CSFR
15 antibodies (Takahashi T. *et al.* *J Biol Chem* 271:17555-60 (1996)). These
authors also demonstrate that the chimeric protein is incapable of inducing
apoptosis as a dimer. The complex must be in at least a trimeric form.

In a preferred embodiment, a chimeric gene is constructed in which the
transmembrane domain and cytoplasmic death domain of FAS is fused to the
20 carboxyl terminus of the CH1 domain of the human IgM heavy chain (CH1-Fas,
Fig. 13 (a)). Diverse VH genes are inserted into this construct as described herein
to create a library of VH-CH1-Fas recombinant vaccinia virus. Membrane
receptors with VH-CH1-Fas are assembled in host cells which are infected with
the VH-CH1-Fas constructs and which are transfected with DNA encoding
25 diverse immunoglobulin light chains or which are infected with psoralin treated
recombinant vaccinia virus encoding diverse immunoglobulin light chains. Those
cells that express a combination of heavy and light chain variable region genes
with a desired specificity will have some of their membrane receptors crosslinked
in the presence of the specific immobilized antigen of interest. Apoptosis will be
30 induced as a result of formation of functional complexes of VHCH1/FAS
oligomers. Trimer formation can occur through crosslinking with polyvalent

antigens or through immobilization of more than one antigen to tissue culture plates or beads.

In an alternative embodiment, the VH library is expressed in fusion proteins in which a polypeptide comprising the transmembrane domain and cytoplasmic death domain of FAS is fused to the carboxyl terminus of the IgM heavy chain CH4 domain (Fig. 13 (b)). In yet another embodiment, the cytoplasmic death domain of FAS is fused to the carboxyl terminus of the IgM heavy chain transmembrane domain following the CH4 domain (Fig. 13 (c)).

The latter two embodiments (Fig. 13 (b and c)) result in synthesis of an already dimeric Fas death domain which facilitates formation of trimeric complexes required for induction of the apoptotic signal and thereby increases the number of antigen-specific receptors selected. Use of the monomeric construct (Fig. 13(a)), however, results in selection of fewer but higher affinity antigen receptors, and also reduces the background of non-antigen specific cell death. The two receptors with dimeric Fas domains differ in terms of whether the transmembrane region encoded in the fusion protein is Fas-derived or IgM-derived. An IgM-derived transmembrane region may function more efficiently for membrane receptor expression in cells of the B lymphocyte lineage. An advantage of this embodiment, however, is that it is not limited to B cells. In particular, the monomeric Fas construct is synthesized and expressed as a membrane receptor in a wide variety of cell types including epithelial cell lines, HeLa cells and BSC-1 cells in which high titers of vaccinia virus can be generated.

In another embodiment, a screening method is provided to recover polynucleotides encoding immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, based on antigen-induced cell signaling. According to this method, host cells are transfected with an easily detected reporter construct, for example luciferase, operably associated with a transcriptional regulatory region which is upregulated as a result of surface immunoglobulin crosslinking. Pools of host cells expressing immunoglobulins or fragments thereof on their surface are contacted with antigen, and upon cross linking, the signal is detected in that pool. Referring to the first step in the immunoglobulin identification method as

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-88-

described above, the signaling method may be carried out as follows. The first library of polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides is divided into a plurality of pools, *e.g.*, about 2, 5, 10, 25, 15, 75, 100, or more pools, each pool containing about 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , or 10^9 different polynucleotides encoding immunoglobulin subunit polypeptides with different variable regions. Preferred pools initially contain about 10^3 polynucleotides each. Each pool is expanded and a replicate aliquot is set aside for later recovery. Where the pools of polynucleotides are constructed in virus vectors, preferably poxvirus vectors, and even more preferably vaccinia virus vectors, the pools are prepared, *e.g.*, by diluting a high-titer stock of the virus library and using the portions to infect microcultures of tissue culture cells at a low MOI, *e.g.*, MOI < 0.1. Typically a greater than 1,000 fold expansion in the viral titer is obtained after 48 hrs infection. Expanding viral titers in multiple individual pools mitigates the risk that a subset of recombinants will be lost due to relatively rapid growth of a competing subset.

The virus pools are then used to infect pools of host cells equal to the number of virus pools prepared. These host cells have been engineered to express a reporter molecule as a result of surface immunoglobulin crosslinking. The number of host cells infected with each pool depends on the number of polynucleotides contained in the pool, and the MOI desired. The second library of polynucleotides is also introduced into the host cell pools, and expression of immunoglobulin molecules or fragments thereof on the surface of the host cells is permitted.

The host cell pools are then contacted with a desired antigen under conditions wherein host cells expressing antigen-specific immunoglobulin molecules on their surface express the detectable reporter molecule upon crosslinking of said immunoglobulin molecules, and the various pools of host cells are screened for expression of the reporter molecule. Those pools of host cells in which reporter expression is detected are harvested, and the polynucleotides of the first library contained therein are recovered from the aliquot previously set aside following initial expansion of that pool of polynucleotides.

To further enrich for polynucleotides of the first library which encode antigen-specific immunoglobulin subunit polypeptides, the polynucleotides recovered above are divided into a plurality of sub-pools. The sub-pools are set to contain fewer different members than the pools utilized above. For example, if each of the first pools contained 10^3 different polynucleotides, the sub-pools are set up so as to contain, on average, about 10 or 100 different polynucleotides each. The sub-pools are introduced into host cells with the second library as above, and expression of immunoglobulin molecules, or fragments thereof, on the membrane surface of the host cells is permitted. The host cells are then contacted with antigen as above, and those sub-pools of host cells in which expression of the reporter molecule is detected are identified, and the polynucleotides of the first library contained therein are recovered from the replicate pools previously set aside as described above. It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that this process may be repeated one or more additional times in order to adequately enrich for polynucleotides encoding antigen-specific immunoglobulin subunit polypeptides.

Upon further selection and enrichment steps for polynucleotides of the first library, and isolation of those polynucleotides, a similar process is carried out to recover polynucleotides of the second library which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, bind the desired specific antigen.

Any suitable reporter molecule may be used in this method, the choice depending upon the host cells used, the detection instruments available, and the ease of detection desired. Suitable reporter molecules include, but are not limited to luciferase, green fluorescent protein, and beta-galactosidase.

Any host cell capable of expressing immunoglobulin molecules on its surface may be used in this method. Preferred host cells include immunoglobulin-negative plasmacytoma cells, e.g., NS1 cells, Sp2/0 cells, or P3 cells, and early B-cell lymphoma cells.

Similar to the cell death methods described above, kinetic considerations dictate that expression of the reporter construct take place prior to the induction

of CPE. Nonetheless, it is preferred that expression of a detectable reporter molecule in response to antigen-induced cross-linking of immunoglobulin molecules on the surface of the host cells occurs within a period between about 1 hour to about 4 days after contacting the host cells with antigen, so as to precede induction of CPE. More preferably, reporter molecule expression occurs within about 1 hour about 2 hours, about 3 hours about 4 hours, about 5 hours, about 6 hours, about 7 hours, about 8 hours, about 9 hours, about 10 hours, about 11 hours, about 12 hours, about 14 hours, about 16 hours, about 18 hours, about 20 hours, about 22 hours, about 24 hours, about 28 hours, about 32 hours, about 36 hours, about 40 hours, about 44 hours, or about 48 hours after contacting the host cells with antigen. Even more preferably reporter molecule expression occurs within about 12 hours of contacting the host cells with antigen.

By a "transcriptional regulatory region induced upon cross-linking of surface immunoglobulin molecules" is meant a region, for example, a host cell promoter, which normally regulates a gene that is upregulated in the host cell upon cross linking of surface-expressed immunoglobulin molecules. A preferred example of such a transcriptional regulatory region is the BAX promoter, which is upregulated in early B cell lymphoma cells upon cross linking of surface immunoglobulin molecules.

In yet another embodiment, a selection or screening method is provided to select polynucleotides encoding immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, based on antigen-specific binding. This embodiment is illustrated in Fig. 5. According to this method, host cells which express antigen-specific immunoglobulin molecules, or fragments thereof on their surface are recovered based solely on the detection of antigen binding. Antigen binding may be utilized as a selection method, *i.e.*, where host cells expressing antigen-specific immunoglobulin molecules are directly selected by virtue of binding antigen, by methods similar to those described for selection based on cell death as described above. For example, if an antigen is bound to a solid substrate, host cells in suspension which bind the antigen may be recovered by binding, through the antigen, to the solid substrate. Alternatively, antigen binding may be used as

a screening process, *i.e.*, where pools of host cells are screened for detectable antigen binding by methods similar to that described above for antigen-induced cell signaling. For example, pools of host cells expressing immunoglobulins or fragments thereof on their surface are contacted with antigen, and antigen binding in a given pool is detected through an immunoassay, for example, through detection of an enzyme-antibody conjugate which binds to the antigen.

Referring to the first step in the immunoglobulin identification methods as described above, selection via the antigen-specific binding method may be carried out as follows. A host cell is selected for infection and/or transfection that is capable of high level expression of immunoglobulin molecules on its surface. Preferably, the host cell grows in suspension. Following infection with the first and second polynucleotide libraries as described above, synthesis and assembly of antibody molecules is allowed to proceed. The host cells are then transferred into microtiter wells which have antigen bound to their surface. Host cells which bind antigen thereby become attached to the surface of the well, and those cells that remain unbound are removed by gentle washing. Alternatively, host cells which bind antigen may be recovered, for example, by fluorescence-activated cell sorting (FACS). FACS, also called flow cytometry, is used to sort individual cells on the basis of optical properties, including fluorescence. It is useful for screening large populations of cells in a relatively short period of time. Finally the host cells which bound to the antigen are recovered, thereby enriching for polynucleotides of the first library which encode a first immunoglobulin subunit polypeptide which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, specifically binds the antigen of interest.

Upon further selection and enrichment steps for polynucleotides of the first library, and isolation of those polynucleotides, a similar process is carried out to recover polynucleotides of the second library which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, bind the desired specific antigen.

Any host cell capable of expressing immunoglobulin molecules on its surface may be used in this selection method. Preferred host cells include

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-92-

immunoglobulin-negative plasmacytoma cells, *e.g.*, NS1 cells, Sp2/0 cells, or P3 cells, and early B-cell lymphoma cells. It is preferred that the cells are capable of growth in suspension.

Referring to the first step in the immunoglobulin identification methods as described above, screening via the antigen-specific binding method may be carried out as follows. The first library of polynucleotides, constructed in a virus vector encoding immunoglobulin subunit polypeptides, is divided into a plurality of pools by the method described above. The virus pools are then used to infect pools of host cells equal to the number of virus pools prepared. In this screening method, it is preferred that the host cells are adherent to a solid substrate. The second library of polynucleotides is also introduced into the host cell pools, and expression of immunoglobulin molecules or fragments thereof on the surface of the host cells is permitted.

The host cell pools are then contacted with a desired antigen. Following incubation with the antigen, excess unbound antigen is washed away. Finally the pools of cells are screened for antigen binding. Antigen binding may be detected by a variety of methods. For example, an antigen may be conjugated to an enzyme. Following the removal of unbound antigen, substrate is added, and enzyme reaction products are detected. This method may be enhanced by use of a secondary antibody conjugate, or a streptavidin/biotin system. Such screening methods are well known to those of ordinary skill in the art, and are readily available in kit form from standard vendors. Also, if the antigen is bound to microscopic particles, for example, gold beads, binding of the antigen to the host cells may be detected microscopically. As with the cell signaling methods described above, those pools of host cells in which antigen binding is detected are harvested, and the polynucleotides of the first library contained therein are recovered. Alternatively, pools of host cells in which antigen-binding is detected are identified, and polynucleotides of the first library contained therein are recovered from a replicate aliquot of that pool of polynucleotides set aside following initial expansion of the library.

To further enrich for polynucleotides of the first library which encode antigen-specific immunoglobulin subunit polypeptides, the polynucleotides recovered above are divided into a plurality of sub-pools. The sub-pools are set to contain fewer different members than the pools utilized in the first round. For example, if each of the first pools contained 10^3 different polynucleotides, the sub-pools are set up so as to contain, on average, about 10 or 100 different polynucleotides each. The sub-pools are introduced into host cells with the second library as above, and expression of immunoglobulin molecules, or fragments thereof, on the membrane surface of the host cells is permitted. The host cells are then contacted with antigen as above, and those sub-pools of host cells in which antigen binding is detected are harvested or simply identified, and the polynucleotides of the first library contained therein, or in a replicate aliquot, are recovered. It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that this process may be repeated one or more additional times in order to adequately enrich for polynucleotides encoding antigen-specific immunoglobulin subunit polypeptide.

Upon further selection and enrichment steps for polynucleotides of the first library, and isolation of those polynucleotides, a similar process is carried out to recover polynucleotides of the second library which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, bind the desired specific antigen.

Any host cell capable of expressing immunoglobulin molecules on its surface may be used in this method. Preferred host cells include immunoglobulin-negative plasmacytoma cells, *e.g.*, NS1 cells, Sp2/0 cells, or P3 cells, and early B-cell lymphoma cells.

An antigen of interest may be contacted with host cells by any convenient method when practicing the direct and indirect antigen-induced cell death methods as described herein. For example, in certain embodiments, antigen, for example a peptide or a polypeptide, is attached to a solid substrate. As used herein, a "solid support" or a "solid substrate" is any support capable of binding a cell or antigen, which may be in any of various forms, as is known in the art.

Well-known supports include tissue culture plastic, glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, gabbros, and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually any possible structural configuration as long as the coupled molecule is capable of binding to a cell. Thus, the support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc. Preferred supports include polystyrene beads. The support configuration may include a tube, bead, microbead, well, plate, tissue culture plate, petri plate, microplate, microtiter plate, flask, stick, strip, vial, paddle, etc., etc. A solid support may be magnetic or non-magnetic. Those skilled in the art will know many other suitable carriers for binding cells or antigens, or will be able to readily ascertain the same.

Alternatively, an antigen is expressed on the surface of an antigen-expressing presenting cell. As used herein an "antigen-expressing presenting cell" refers to a cell which expresses an antigen of interest on its surface in a manner such that the antigen may interact with immunoglobulin molecules attached to the surface of host cells of the present invention. An preferred antigen-expressing presenting cell is engineered such that it expresses the antigen of interest as a recombinant protein, but the antigen may be a native antigen of that cell. Recombinant antigen-expressing presenting cells may be constructed by any suitable method using molecular biology and protein expression techniques well-known to those of ordinary skill in the art. Typically, a plasmid vector which encodes the antigen of interest is transfected into a suitable cell, and the cell is screened for expression of the desired polypeptide antigen. Preferred recombinant antigen-expressing presenting cells stably express the antigen of interest. A cell of the same type as the antigen-expressing presenting cell except that it has not been engineered to express the antigen of interest is referred to herein as an "antigen-free presenting cell." Any suitable cell line may be used to prepare antigen-expressing presenting cells. Examples of cell lines include, but

are not limited to: monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 165 1); human embryonic kidney line (293, Graham *et al.* *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10); chinese hamster ovary-cells-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:4216, (1980); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); african green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI cells (Mather *et al.*, *Annals N. Y. Acad. Sci* 383:44-68 (1982)); NIH/3T3 cells (ATCC CRL-1658); and mouse L cells (ATCC CCL-1). Additional cell lines will become apparent to those of ordinary skill in the art. A wide variety of cell lines are available from the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

As will be appreciated by those of ordinary skill in the art, antigen-expressing presenting cells will comprise many naturally-occurring antigenic determinants on their surface in addition to the antigen of interest. Certain of the host cells of the present invention which express a broad spectrum of different immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof on their surface would be expected to bind to these additional antigenic determinants. Accordingly, when an antigen-expressing presenting cell is used to contact host cells of the invention with the antigen of interest, it is necessary to first deplete the host cell population of those host cells which express immunoglobulins reactive for these additional antigenic determinants. The present invention provides methods to deplete the host cell population of host cells expressing immunoglobulin molecules specific for naturally-occurring surface antigens of the antigen-free presenting cell. This is illustrated in Fig. 5. Essentially, these methods comprise contacting the host cell population with antigen-free presenting cells prior to contacting the population of host cells with antigen-expressing presenting cells.

In one embodiment, this method comprises adsorbing the population of host cells to antigen-free presenting cells which are bound to a solid substrate. The unbound cells and/or the polynucleotides contained therein are recovered, and the recovered host cells, or new host cells into which the recovered polynucleotides have been introduced, are then contacted with antigen-expressing presenting cells. In those selection methods where pools of host cells are contacted with antigen, the pools of host cells are adsorbed to antigen-free presenting cells bound to a solid substrate. The unbound cells in the pool and/or the polynucleotides contained therein, are recovered, and the recovered host cells, or host cells into which the recovered polynucleotides have been introduced, are then contacted with antigen-expressing presenting cells.

In another embodiment, the method comprises contacting the population of host cells with antigen-free presenting cells under conditions wherein host cells expressing surface immunoglobulin molecules which react with surface antigens of antigenic determinants on the antigen-free presenting cells undergo either programmed cell death, *e.g.*, apoptosis, direct or indirect cell death, or cell signaling, *i.e.*, expression of a reporter molecule, all as described above, upon cross-linking of immunoglobulin molecules on the surface of the host cells. Those host cells, and more specifically, polynucleotides from either the first library or second library, from those host cells which have not succumbed to cell death or do not express a reporter molecule, are then recovered. For example, if the host cell population expressing immunoglobulin molecules is maintained attached to a solid substrate, and those cells which undergo cell death are released from the substrate, the contents of the culture fluid are removed and discarded, and the cells which remain attached, and the polynucleotides contained therein, are recovered.

As will be appreciated by those of ordinary skill in the art, depleting the host cell population of those host cells which express immunoglobulins reactive with determinants carried on the antigen-free presenting cells may require more than one round of depletion. It is further contemplated that successive rounds of depletion may be alternated with successive rounds of enrichment for host cells

expressing immunoglobulin molecules which specifically bind to the antigen of interest expressed on the antigen-expressing presenting cells.

In yet another embodiment, a screening method is provided to recover polynucleotides encoding immunoglobulin molecules, or antigen-specific functional fragments thereof, based on a desired antigen-specific function of the immunoglobulin molecule. According to this method, pools of host cells are prepared which express fully-soluble immunoglobulin molecules. Expression is permitted, and the resulting cell medium is tested in various functional assays which require certain desired antigenic specificities. According to this method, the "function" being tested may be a standard effector function carried out by an immunoglobulin molecule, *e.g.*, virus neutralization, opsonization, ADCC, antagonist/agonist activity, histamine release, hemagglutination, or hemagglutination inhibition. Alternatively, the "function" may simply refer to binding an antigen.

In a related embodiment, a screening method is provided to select immunoglobulin molecules of a known antigenic specificity, but with altered effector functions. According to these embodiments, libraries of immunoglobulin subunit polypeptides with a known antigenic specificity, but with alterations in constant domain regions known to be involved in a given effector function, are constructed. According to this method, pools of host cells are prepared which express fully-soluble immunoglobulin molecules. Expression is permitted, and the resulting cell medium is tested in various functional assays for improved or suppressed activity. According to this method, the "function" being tested may be a standard effector function carried out by an immunoglobulin molecule, *e.g.*, virus neutralization, opsonization, complement binding, ADCC, antagonist/agonist activity, histamine release, hemagglutination, or hemagglutination inhibition.

Referring to the first step in the immunoglobulin identification method as described above, the screening for effector function may be carried out as follows. The first library of polynucleotides encoding fully secreted immunoglobulin subunit polypeptides is divided into a plurality of pools, as described above, each

pool containing about 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , or 10^9 different polynucleotides encoding fully-secreted immunoglobulin subunit polypeptides with different variable regions. Preferred pools initially contain about 10^3 polynucleotides each. Each pool is expanded and a replicate aliquot is set aside for later recovery. Where the pools of polynucleotides are constructed in virus vectors, preferably poxvirus vectors, and even more preferably vaccinia virus vectors, the pools are prepared, *e.g.*, by diluting a high-titer stock of the virus library and using the portions to infect microcultures of tissue culture cells at a low MOI, *e.g.*, MOI < 0.1. Typically a greater than 1,000 fold expansion in the viral titer is obtained after 48 hrs infection. Expanding viral titers in multiple individual pools mitigates the risk that a subset of recombinants will be lost due to relatively rapid growth of a competing subset.

The virus pools are then used to infect pools of host cells equal to the number of virus pools prepared. The number of host cells infected with each pool depends on the number of polynucleotides contained in the pool, and the MOI desired. Virtually any host cell which is permissive for infection with the virus vector used, and which is capable of expressing fully-secreted immunoglobulin molecules may be used in this method. Preferred host cells include immunoglobulin-negative plasmacytoma cells, *e.g.*, NS1 cells, Sp2/0 cells, or P3 cells, and early B-cell lymphoma cells. The cells may be cultured in suspension or attached to a solid surface. The second library of polynucleotides is also introduced into the host cell pools, and expression of fully secreted immunoglobulin molecules or fragments thereof is permitted.

The conditioned medium in which the host cell pools were cultured is then recovered and tested in a standardized functional assay for effector function in response to a specific target antigen.

Any suitable functional assay may be used in this method. For example, the harvested cell supernatants may be tested in a virus neutralization assay to detect immunoglobulin molecules with the ability to neutralize a target virus, for example, HIV. Alternatively, the harvested cell supernatants may be tested for the ability to block or facilitate, *i.e.*, act as an antagonist or an agonist of, a target

cellular function, for example, apoptosis. Exemplary suitable functional assays are described in the Examples, *infra*. As used herein, a "functional assay" also included simple detection of antigen binding, for example, through use of a standard ELISA assay, which is well known to those of ordinary skill in the art.

5 Where the conditioned medium in which a given host cell pool was grown exerts the desired function, the polynucleotides of the first library contained in host cells of that pool are recovered from the aliquot previously set aside following initial expansion of that pool of polynucleotide.

10 To further enrich for polynucleotides of the first library which encode antigen-specific immunoglobulin subunit polypeptides, the polynucleotides recovered above are divided into a plurality of sub-pools. The sub-pools are set to contain fewer different members than the pools utilized above. For example, if each of the first pools contained 10^3 different polynucleotides, the sub-pools are set up so as to contain, on average, about 10 or 100 different polynucleotides
15 each. The sub-pools are introduced into host cells with the second library as above, and expression of fully secreted immunoglobulin molecules, or fragments thereof, is permitted. The conditioned medium in which the host cell pools are cultured is recovered and tested in a standardized functional assay for effector function in response to a specific target antigen as described above, conditioned
20 media samples which possess the desired functional characteristic are identified, and the polynucleotides of the first library contained in host cells of that sub-pool are recovered from the aliquot previously set aside as described above. It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that this process may be repeated one or more additional times in order to adequately enrich for polynucleotides
25 encoding antigen-specific immunoglobulin subunit polypeptides.

30 Upon further selection and enrichment steps for polynucleotides of the first library, and isolation of those polynucleotides, a similar process is carried out to recover polynucleotides of the second library which, as part of an fully secreted immunoglobulin molecule, or fragment thereof, exhibits the desired antigen-specific function.

Kits. The present invention further provides a kit for the selection of antigen-specific recombinant immunoglobulins expressed in a eukaryotic host cell. The kit comprises one or more containers filled with one or more of the ingredients required to carry out the methods described herein. In one

5 embodiment, the kit comprises: (a) a first library of polynucleotides encoding, through operable association with a transcriptional control region, a plurality of first immunoglobulin subunit polypeptides, where each first immunoglobulin subunit polypeptide comprises (i) a first immunoglobulin constant region selected from the group consisting of a heavy chain constant region and a light

10 chain constant region, (ii) an immunoglobulin variable region corresponding to said first constant region, and (iii) a signal peptide capable of directing cell surface expression or secretion of said first immunoglobulin subunit polypeptide, wherein said first library is constructed in a eukaryotic virus vector; (b) a second library of polynucleotides encoding, through operable association with a

15 transcriptional control region, a plurality of second immunoglobulin subunit polypeptides, where each comprises: (i) a second immunoglobulin constant region selected from the group consisting of a heavy chain constant region and a light chain constant region, wherein said second immunoglobulin constant region is not the same as the first immunoglobulin constant region, (ii) an

20 immunoglobulin variable region corresponding to said second constant region, and (iii) a signal peptide capable of directing cell surface expression or secretion of said second immunoglobulin subunit polypeptide, where the second immunoglobulin subunit polypeptide is capable of combining with the first immunoglobulin subunit polypeptide to form a surface immunoglobulin

25 molecule, or antigen-specific fragment thereof, attached to the membrane of a host cell, and where the second library is constructed in a eukaryotic virus vector; and (c) a population of host cells capable of expressing said immunoglobulin molecules. In this kit, the first and second libraries are provided both as infectious virus particles and as inactivated virus particles, where the inactivated

30 virus particles are capable of infecting the host cells and allowing expression of the polynucleotides contained therein, but the inactivated viruses do not undergo virus replication. In addition, the host cells provided with the kit are capable of

expressing an antigen-specific immunoglobulin molecule which can be selected through interaction with an antigen. Use of the kit is in accordance to the methods described herein. In certain embodiments the kit will include control antigens and reagents to standardize the validate the selection of particular antigens of interest.

Isolated immunoglobulins. The present invention further provides an isolated antigen-specific immunoglobulin, or fragment thereof, produced by any of the methods disclosed herein. Such isolated immunoglobulins may be useful as diagnostic or therapeutic reagents. Further provided is a composition comprising an isolated immunoglobulin of the present invention, and a pharmaceutically acceptable carrier.

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of cell biology, cell culture, molecular biology, transgenic biology, microbiology, recombinant DNA, and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, for example, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Sambrook *et al.*, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, ed., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1992), *DNA Cloning*, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis *et al.* U.S. Pat. No. 4,683,195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu *et al.* eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); and in Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

5 General principles of antibody engineering are set forth in *Antibody Engineering*, 2nd edition, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995). General principles of protein engineering are set forth in *Protein Engineering, A Practical Approach*, Rickwood, D., *et al.*, Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995). General principles of antibodies and antibody-hapten binding are set forth in: Nisonoff, A., *Molecular Immunology*, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); and Steward, M.W., *Antibodies, Their Structure and Function*, Chapman and Hall, New York, NY (1984). Additionally, standard methods in immunology known in the art and not specifically described are generally followed as in *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites *et al.* (eds), *Basic and Clinical Immunology* (8th ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) and 15 Mishell and Shiigi (eds), *Selected Methods in Cellular Immunology*, W.H. Freeman and Co., New York (1980).

Standard reference works setting forth general principles of immunology include *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein, 20 J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, New York (1982); Kennett, R., *et al.*, eds., *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" in Burden, R., *et al.*, eds., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, 25 Elsevier, Amsterdam (1984).

EXAMPLES

EXAMPLE 1

Construction of Human Immunoglobulin Libraries of Diverse Specificity

5 Libraries of polynucleotides encoding diverse immunoglobulin subunit polypeptides are produced as follows. Genes for human VH (variable region of heavy chain), VK (variable region of kappa light chain) and VL (variable region of lambda light chains) are amplified by PCR. For each of the three variable gene families, both a recombinant plasmid library and a vaccinia virus library is
10 constructed. The variable region genes are inserted into a p7.5/tk-based transfer/expression plasmid between immunoglobulin leader and constant region sequences of the corresponding heavy chain or light chain. This plasmid is employed to generate the corresponding vaccinia virus recombinants by trimolecular recombination and can also be used directly for high level expression
15 of immunoglobulin chains following transfection into vaccinia virus infected cells. Lymphoma cells are first infected with the vaccinia heavy chain library, followed by transient transfection with a plasmid light chain library. The co-expression of IgM and light chain results in the assembly and surface expression of antibody molecules.

20 **1.1 pVHE.** An expression vector comprising the human μ membrane immunoglobulin constant region, designated herein as pVHE is constructed as follows. The strategy is depicted in Fig.3. A cDNA coding for the membrane-bound human IgM heavy chain is isolated from bone marrow RNA using SMART™ RACE cDNA Amplification Kit available from Clontech, Palo Alto,
25 CA. The PCR is carried out using the 5' primer (huC μ 5B) 5'-ATTAGGATCCGGTCACCGTC TCCTCAGGG-3' (SEQ ID NO:24), and 3' primer (huC μ 3S) 5'-ATTAGTCGACTCATTTCACCTTGAACAAGGTGAC-3' (SEQ ID NO:25). The PCR product then is inserted into the pBluescript II/KS at BamHI and SalI sites for site-directed mutagenesis to eliminate two BstEII sites located in the

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-104-

CH2 and CH4 domains. Nucleotide substitutions are selected that do not alter the amino acids encoded at these sites.

Plasmid p7.5/tk, produced as described in Zauderer, PCT Publication No. WO 00/028016, and in Example 5, *infra*, is converted into pVHE by the following method. The multiple cloning site (MCS) of p7.5/tk is replaced with a cassette containing the following restriction sites: NotI-NcoI-BssHII-BstEII-SalI to generate p7.5/tk2. This cassette, having the sequence 5'-GCGGCCGCAA ACCATGGAAA GCGCGCATATGGTCACCAAA AGTCGAC-3', is referred to herein as SEQ ID NO:26. A cassette encoding the signal peptide sequence corresponding to amino acids -19 to -3 of the IgM heavy chain is cloned into p7.5/tk2 between the NcoI and BssHII sites to produce p7.5/tk2L. The BstEII-mutagenized IgM heavy chain, produced as described above, is then cloned into p7.5/tk2L between the BstEII and SalI sites to generate pVHE. Heavy chain variable region (VH) cassettes comprising nucleotides encoding amino acids -4 to 110, produced by PCR as described below, are then cloned between the BssHII and BstEII sites of pVHE to generate a library of polynucleotides encoding membrane-bound heavy chains. Because of the overlap between the μ heavy chain sequence and the restriction enzyme sites selected, this results in expression of contiguous membrane-bound heavy chain immunoglobulin subunit polypeptides in the correct translational reading frame.

1.2 pVHEs. An expression vector comprising the human μ secretory immunoglobulin constant region, designated herein as pVHEs is constructed as follows. The strategy is depicted in Fig.8. A cDNA coding for the secretory human IgM heavy chain is isolated from bone marrow RNA using SMART™ RACE cDNA Amplification Kit. The upstream primer huC μ 5B contains an appended BamHI and a BstEII site at the 5' end, followed by amino acids 111-113 of VH and the first amino acid of C μ H1. The downstream primer shuC μ 3S contains the last 6 amino acids of the secreted C μ , followed by a stop codon and a SalI site. These primers have the following sequences:

huCμ5B: 5'-ATTAGGATCC GGTACCGTC TCCTCAGGG-3' (SEQ ID NO:27); and

shuCμ3S: 5'-ATTAGTCGAC TCAGTAGCAG GTGCCAGCTG T-3' (SEQ ID NO:28).

5 The PCR product then is inserted into the pBluescript II/KS at BamHI and SalI sites for site-directed mutagenesis to eliminate two BstEII sites located in the CH2 and CH4 domains. Nucleotide substitutions are selected that do not alter the amino acids encoded at these sites.

10 Plasmid p7.5/tk2L, produced as in section 1.1, is converted into pVHEs by the following method. The BstEII-mutagenized secretory IgM heavy chain, produced as described above, is then cloned into p7.5/tk2L between the BstEII and SalI sites to generate pVHEs. Heavy chain variable region (VH) cassettes comprising nucleotides encoding amino acids -4 to 110, produced by PCR as described below, are then cloned between the BssHII and BstEII sites of pVHEs

15 to generate a library of polynucleotides encoding secreted heavy chains. Because of the overlap between the μ heavy chain sequence and the restriction enzyme sites selected, this results in expression of contiguous secretory heavy chain immunoglobulin subunit polypeptides in the correct translational reading frame.

1.3 pVKE and pVLE. Expression vectors comprising the human κ and λ immunoglobulin light chain constant regions, designated herein as pVKE and pVLE, are constructed as follows. The strategy is depicted in Fig.4.

(a) Plasmid p7.5/tk is converted into pVKE by the following method. The two XhoI sites and two HindIII sites of p7.5/tk are removed by fill-in ligation, the 3 ApaLI sites (one at the backbone, one at ColE1 ori, and the other at Amp) are removed by standard methods, and the multiple cloning site (MCS) of p7.5/tk is replaced with a cassette containing the following restriction sites: NotI-NcoI-ApaLI-XhoI-HindIII-SalI to generate p7.5/tk3. This cassette, having the sequence 5'-GCGGCCGCC ATGGATACGT GCACTTGACT CGAGAAGCTT AGTAGTCGAC-3', is referred to herein as SEQ ID NO:29.

25 A cassette encoding the signal peptide sequence corresponding to amino acids -19

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-106-

to-2 of the kappa light chain is cloned into p7.5/tk3L between the NcoI and ApaLI sites to generate p7.5/tk3L. A cDNA coding for the Cκ region is isolated from bone marrow RNA using SMART™ RACE cDNA Amplification Kit as described above, with primers to include an XhoI site at the 5' end of the region encoding amino acids 104-107+Cκ, a stop codon, and a SalI site at its 3' end. These primers have the following sequences: huCκ5: 5'-CAGGACTCGA GATCAAACGA ACTGTGGCTG -3' (SEQ ID NO:30); huCκ3: 5'-AATATGTCGA CCTAACACTC TCCCCTGTG AAGCTCTTT-3' (SEQ ID NO:31); and huCκ3: 5'-AATATGTCGA CCTAACACTC TCCCCTGTG AAGCTCTT-3' (SEQ ID NO:32). The Cκ cassette is then cloned into p7.5/tk3L between the XhoI and SalI sites to generate pVKE. Kappa light chain variable region cassettes (VK) comprising nucleotides encoding amino acids -3 to 105, produced by PCR as described below, are then cloned into pVKE between the ApaLI and XhoI sites. Because of the overlap between the κ light chain sequence and the restriction enzyme sites selected, this results in expression of contiguous κ light chain immunoglobulin subunit polypeptides in the correct translational reading frame.

(b) Plasmid p7.5/tk3L is converted into pVLE by the following method. A cDNA coding for the Cκ region is isolated from bone marrow RNA using SMART™ RACE cDNA Amplification Kit as described above, with primers to include a HindIII site and the region encoding amino acids 105 to 107 of V_κ at its 5' end and a stop codon and a SalI site at its 3' end. These primers have the following sequences: huCλ5: 5'-ATTTAAGCTT ACCGTCCTAC GAACTGTGGC TGCACCATCT -3' (SEQ ID NO:33); and huCλ3 (SEQ ID NO:31). The Cκ cassette is then cloned into p7.5/tk3L between the HindIII and SalI sites to generate pVLE. Lambda light chain variable region cassettes (VL) comprising nucleotides encoding amino acids -3 to 104, produced by PCR as described below, are then cloned into pVLE between the ApaLI and HindIII sites. Because of the overlap between the λ light chain sequence and the restriction enzyme sites selected, this results in expression of contiguous λ light chain immunoglobulin subunit polypeptides in the correct translational reading frame.

1.4 Variable Regions. Heavy chain, kappa light chain, and lambda light chain variable regions are isolated by PCR for cloning in the expression vectors produced as described above, by the following method. RNA isolated from normal human bone marrow pooled from multiple donors (available from Clontech) is used for cDNA synthesis. Aliquots of the cDNA preparations are used in PCR amplifications with primer pairs selected from the following sets of primers: VH/JH, VK/JK or VL/JL. The primers used to amplify variable regions are listed in Tables 1 and 2.

(a) **Heavy chain variable regions.** Due to the way the plasmid expression vectors were designed, VH primers, *i.e.*, the forward primer in the pairs used to amplify heavy chain V regions, have the following generic configuration, with the BssHII restriction site in bold:

VH primers: **GCGCGCACTCC**-start of VH FR1 primer.

The primers are designed to include codons encoding the last 4 amino acids in the leader, with the BssHII site coding for amino acids -4 and -3, followed by the VH family-specific FR1 sequence. Tables 1 and 2 lists the sequences of the different family-specific VH primers. Since the last 5 amino acids of the heavy chain variable region, *i.e.*, amino acids 109-113, which are identical among the six human heavy chain J regions, are embedded in plasmid pVHE, JH primers, *i.e.*, the reverse primers used to amplify the heavy chain variable regions, exhibit the following configuration to include a BstEII site, which codes for amino acids 109 and 110 (shown in bold):

JH primers:

-nucleotide sequence for amino acids 103-108 of VH (ending with a G)-

GTCACC

Using these sets of primers, the VH PCR products start with the codons coding for amino acids -4 to 110 with BssHII being amino acids -4 and -3, and end at the BstEII site at the codons for amino acids 109 and 110. Upon digestion with the appropriate restriction enzymes, these PCR products are cloned into pVHE digested with BssHII and BstEII.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-108-

In order to achieve amplification of most of the possible rearranged heavy chain variable regions, families of VH and JH primers, as shown in Tables 1 and 2, are used. The VH1, 3, and 4 families account for 44 out of the 51 V regions present in the human genome. The embedding of codons coding for amino acids 109-113 in the expression vector precludes the use of a single common JH primer. However, the 5 JH primers shown in Tables 1 and 2 can be pooled for each VH primer used to reduce the number of PCR reactions required.

(b) **Kappa light chain variable regions.** The VK primers, *i.e.*, the forward primer in the pairs used to amplify kappa light chain variable regions, have the following generic configuration, with the ApaLI restriction site in bold:

VK primer: **GTGCACTCC**-start of VK FR1 primer

The VK primers contain codons coding for the last 3 amino acids of the kappa light chain leader with the ApaLI site coding for amino acids -3 and -2, followed by the VK family-specific FR1 sequences. Since the codons encoding the last 4 amino acids of the kappa chain variable region (amino acids 104-107) are embedded in the expression vector pVKE, the JK primers, *i.e.*, the reverse primer in the pairs used to amplify kappa light chain variable regions, exhibit the following configuration:

JK primer:

-nucleotide sequence coding for amino acids 98-103 of VK-**CTCGAG**

The XhoI site (shown in bold) comprises the codons coding for amino acids 104-105 of the kappa light chain variable region. The PCR products encoding kappa light chain variable regions start at the codon for amino acid -3 and end at the codon for amino acid 105, with the ApaLI site comprising the codons for amino acids -3 and -2 and the XhoI site comprising the codons for amino acids 104 and 105. VK1/4 and VK3/6 primers each have two degenerate nucleotide positions. Employing these JK primers (see Tables 1 and 2), JK1, 3 and 4 will have a Val to Leu mutation at amino acid 104, and JK3 will have an Asp to Glu mutation at amino acid 105.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-109-

(c) *Lambda light chain variable regions.* The VL primers, *i.e.*, the forward primer in the pairs used to amplify lambda light chain variable regions, have the following generic configuration, with the ApaLI restriction site in bold:

VL primer: **GTGCACTCC**-start of VL

5 The ApaLI site comprises the codons for amino acids -3 and -2, followed by the VL family-specific FR1 sequences. Since the codons encoding the last 5 amino acids of VL (amino acids 103-107) are embedded in the expression vector pVLE, the JL primers exhibit the following configuration to include a HindIII site (shown in bold) comprising the codons encoding amino acids 103-104:

10 JL primer: -nucleotide sequence for amino acids 97-102 of VL-**AAGCTT**

The PCR products encoding lambda light chain variable regions start at the codon for amino acid -3 and end at the codon for amino acid 104 with the ApaLI site comprising the codons for amino acids -3 and -2, and HindIII site comprising the codons for amino acids 103 and 104.

15 Table 1. Oligonucleotide primers for PCR amplification of human immunoglobulin variable regions. Recognition sites for restriction enzymes used in cloning are indicated in bold type. Primer sequences are from 5' to 3'.

VH1 (SEQ ID NO:34)	TTT TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
VH2 (SEQ ID NO:144)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT GG
20 VH3 (SEQ ID NO:35)	TTT TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
VH4 (SEQ ID NO:36)	TTT TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG
VH5 (SEQ ID NO:145)	AATA TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT G

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-110-

5	JH1 (SEQ ID NO:37)	GAC GGT GAC CAG GGT GCC CTG GCC CCA
	JH2 (SEQ ID NO:38)	GAC GGT GAC CAG GGT GCC ACG GCC CCA
	JH3 (SEQ ID NO:39)	GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC CCA
	JH4/5 (SEQ ID NO:40)	GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA
	JH6 (SEQ ID NO:41)	GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA
10	VK1 (SEQ ID NO:42)	TTT GTG CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
	VK2 (SEQ ID NO:43)	TTT GTG CAC TCC GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC
	VK3 (SEQ ID NO:44)	TTT GTG CAC TCC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC
	VK4 (SEQ ID NO:45)	TTT GTG CAC TCC GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC
	VK5 (SEQ ID NO:46)	TTT GTG CAC TCC GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC
	VK6 (SEQ ID NO:47)	TTT GTG CAC TCC GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC
15		
	JK1 (SEQ ID NO:48)	GAT CTC GAG CTT GGT CCC TTG GCC GAA
	JK2 (SEQ ID NO:49)	GAT CTC GAG CTT GGT CCC CTG GCC AAA
	JK3 (SEQ ID NO:50)	GAT CTC GAG TTT GGT CCC AGG GCC GAA

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-111-

5

JK4 (SEQ ID NO:51)	GAT CTC GAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA
JK5 (SEQ ID NO:52)	AAT CTC GAG TCG TGT CCC TTG GCC GAA
VL1 (SEQ ID NO:53)	TTT GTG CAC TCC CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC
VL2 (SEQ ID NO:54)	TTT GTG CAC TCC CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GC
VL3A (SEQ ID NO:55)	TTT GTG CAC TCC TCC TAT GTG CTG ACT CAG CCA CC
VL3B (SEQ ID NO:56)	TTT GTG CAC TCC TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC
VL4 (SEQ ID NO:57)	TTT GTG CAC TCC CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC
VL5 (SEQ ID NO:58)	TTT GTG CAC TCC CAG GCT GTG CTC ACT CAG CCG TC
VL6 (SEQ ID NO:59)	TTT GTG CAC TCC AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA
VL7 (SEQ ID NO:60)	TTT GTG CAC TCC CAG GCT GTG GTG ACT CAG GAG CC
JL1 (SEQ ID NO:61)	GGT AAG CTT GGT CCC AGT TCC GAA GAC
JL2/3 (SEQ ID NO:62)	GGT AAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA T

10

15

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-112-

Table 2. Oligonucleotide primers for PCR amplification of human immunoglobulin variable regions. Recognition sites for restriction enzymes used in cloning are indicated in bold type. Primer sequences are from 5' to 3'.

5	VH1a (SEQ ID NO:63)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
	VH2a (SEQ ID NO:64)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT GG
	VH3a (SEQ ID NO:65)	AATA TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
	VH4a (SEQ ID NO:66)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG
	VH5a (SEQ ID NO:67)	AATA TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT G
10	JH1a (SEQ ID NO:68)	GA GAC GGT GAC CAG GGT GCC CTG GCC CCA
	JH2a (SEQ ID NO:69)	GA GAC GGT GAC CAG GGT GCC ACG GCC CCA
	JH3a (SEQ ID NO:70)	GA GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC CCA
	JH4/5a (SEQ ID NO:71)	GA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA
	JH6a (SEQ ID NO:72)	GA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA
15	VK1a (SEQ ID NO:73)	CAGGA GTG CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
	VK2a (SEQ ID NO:74)	CAGGA GTG CAC TCC GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-113-

5

VK3a (SEQ ID NO:75)	CAGGA GTG CAC TCC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC
VK4a (SEQ ID NO:76)	CAGGA GTG CAC TCC GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC
VK5a (SEQ ID NO:77)	CAGGA GTG CAC TCC GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC
VK6a (SEQ ID NO:78)	CAGGA GTG CAC TCC GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC
JK1a (SEQ ID NO:79)	TT GAT CTC GAG CTT GGT CCC TTG GCC GAA
JK2a (SEQ ID NO:80)	TT GAT CTC GAG CTT GGT CCC CTG GCC AAA
JK3a (SEQ ID NO:81)	TT GAT CTC GAG TTT GGT CCC AGG GCC GAA
JK4a (SEQ ID NO:82)	TT GAT CTC GAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA
JK5a (SEQ ID NO:83)	TT AAT CTC GAG TCG TGT CCC TTG GCC GAA
VL1a (SEQ ID NO:84)	CAGAT GTG CAC TCC CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC
VL2a (SEQ ID NO:85)	CAGAT GTG CAC TCC CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GC
VL3Aa (SEQ ID NO:86)	CAGAT GTG CAC TCC TCC TAT GTG CTG ACT CAG CCA CC
VL3Ba (SEQ ID NO:87)	CAGAT GTG CAC TCC TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC
VL4a (SEQ ID NO:88)	CAGAT GTG CAC TCC CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC

10

15

VL5a (SEQ ID NO:89)	CAGAT GTG CAC TCC CAG GCT GTG CTC ACT CAG CCG TC
VL6a (SEQ ID NO:90)	CAGAT GTG CAC TCC AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA
VL7a (SEQ ID NO:91)	CAGAT GTG CAC TCC CAG GCT GTG GTG ACT CAG GAG CC
JL1a (SEQ ID NO:92)	AC GGT AAG CTT GGT CCC AGT TCC GAA GAC
JL2/3a (SEQ ID NO:93)	AC GGT AAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA TAC

EXAMPLE 2

Strategies for Selection of Human Immunoglobulins Which Bind a Specific Antigen

Vaccinia virus expression vectors comprising polynucleotides encoding recombinant heavy chain immunoglobulin subunit polypeptides which, in combination with some unidentified light chain, confer specificity for a defined antigen, are selected as follows, and as shown in Fig. 1. Selection of specific immunoglobulin heavy and light chains is accomplished in two phases. First, a library of diverse heavy chains from antibody producing cells of either naïve or immunized donors is constructed in a pox virus based vector by trimolecular recombination (see Example 5) using as a transfer plasmid pVHE, constructed as described in Example 1, and a similarly diverse library of immunoglobulin light chains is constructed in a plasmid vector such as pVKE and pVLE, constructed as described in Example 1, in which expression of the recombinant gene is regulated by the p7.5 vaccinia promoter. The immunoglobulin heavy chain constant region in the pox virus constructs is designed to retain the transmembrane region that results in expression of immunoglobulin receptor on the surface membrane. Host cells, *e.g.*, early B cell lymphoma cells, are infected

with the pox virus heavy chain library at a multiplicity of infection of 1 (MOI=1). Two hours later the infected cells are transfected with the light chain plasmid library under conditions which allow, on average, 10 or more separate light chain plasmids to be taken up and expressed in each cell. Because expression of the recombinant gene in this plasmid is regulated by a vaccinia virus promoter, high levels of the recombinant gene product are expressed in the cytoplasm of vaccinia virus infected cells without a requirement for nuclear integration. Under these conditions a single cell can express multiple antibodies with different light chains associated with the same heavy chains in characteristic H₂L₂ structures in each infected cell.

2.1 Direct antigen-induced apoptosis. An early B cell lymphoma host cell is infected with recombinant vaccinia viruses encoding recombinant heavy chain immunoglobulin subunit polypeptides and transfected with plasmids encoding recombinant light chain immunoglobulin subunit polypeptides as described. The host cells respond to crosslinking of antigen-specific immunoglobulin receptors by induction of spontaneous growth inhibition and apoptotic cell death. As outlined in Figure 1, synthesis and assembly of antibody molecules is allowed to proceed for 12 hours or more at which time specific antigen is presented on a synthetic particle or polymer, or on the surface of an antigen expressing cell, in order to crosslink any specific immunoglobulin receptors and induce apoptosis of selected antibody expressing indicator cells. The genomes of recombinant vaccinia viruses extracted from cells in which apoptosis has been induced are enriched for polynucleotides encoding immunoglobulin heavy chain genes that confer the desired specificity.

2.2 Indirect antigen-induced cell death. As shown in Fig. 2A (bottom) and Fig. 2B (top), an early B cell lymphoma host cell is transfected with a construct in which the promoter of an apoptosis induced gene, here, a BAX promoter, drives expression of a foreign cytotoxic T cell epitope. The host cells express the CTL epitope in response to crosslinking of antigen-specific immunoglobulin receptors, and these cross-linked cells will undergo a lytic event upon the addition of specific CTL. The stably transfected host cells are then

infected with recombinant vaccinia viruses encoding recombinant heavy chain immunoglobulin subunit polypeptides and transfected with plasmids encoding recombinant light chain immunoglobulin subunit polypeptides as described. As outlined in Figure 1, synthesis and assembly of antibody molecules is allowed to proceed for 12 hours or more at which time specific antigen is presented on a synthetic particle or polymer, or on the surface of an antigen expressing cell, in order to cross-link any specific immunoglobulin receptors. Upon addition of epitope-specific CTL, those cells in which surface immunoglobulin molecules are cross linked undergo a lytic event, thereby indirectly inducing cell death.

2.3 Direct antigen-induced cell death. As shown in Fig. 2A (top) and Fig. 2B (bottom), an early B cell lymphoma host cell is transfected with a construct in which the promoter of an apoptosis induced gene, here, a BAX promoter, drives expression of the cytotoxic A subunit of diphtheria toxin. The host cells express the toxin subunit in response to cross linking of antigen-specific immunoglobulin receptors, and these cross-linked cells will succumb to cell death. The stably transfected host cells are then infected with recombinant vaccinia viruses encoding recombinant heavy chain immunoglobulin subunit polypeptides and transfected with plasmids encoding recombinant light chain immunoglobulin subunit polypeptides as described. As outlined in Figure 1, synthesis and assembly of antibody molecules is allowed to proceed for 12 hours or more at which time specific antigen is presented on a synthetic particle or polymer, or on the surface of an antigen expressing cell, in order to cross-link any specific immunoglobulin receptors. Those cells in which surface immunoglobulin molecules are cross linked rapidly and directly succumb to cell death.

2.4 Discussion. The reason expression of these recombinant genes is upregulated by crosslinking surface Ig receptors is that expression of each of the two constructs is regulated by the promoter for a gene whose expression is naturally upregulated in early B cell lymphoma cells following Ig crosslinking. This is illustrated by use of the BAX promoter. BAX being an example of a proapoptotic gene that is normally upregulated in early B cell lymphoma cells

under these conditions. Regulatory regions (the "promoter") for other genes may serve equally well or better. Such genes are identified, for example, by comparing the gene expression profile of early B cell lymphoma cells on microarrays before and after crosslinking of membrane Ig.

5 Cells are transfected with a construct leading to expression of the diphtheria A chain (dipA), undergo more rapid apoptosis than is induced by Ig crosslinking alone. An even more rapid cell death is induced by addition of cytotoxic T cells specific for some target peptide that associates with a native MHC molecule expressed in that cell and that is encoded by a minigene whose
10 expression is regulated by a BAX or BAX-like promoter. In addition, host cells other than early B cell lymphoma cells are likewise engineered to express genes which either directly or indirectly induce cell death upon antigen cross linking of surface immunoglobulin molecules, independent of the programmed apoptosis which occurs in early B cell lymphoma cell lines upon antigen cross linking.

15 A variety of substrates are employed to present antigen and cross-link specific membrane immunoglobulin receptors in the above selection process. These include, but are not limited to, magnetic beads, protein coated tissue culture plates, and cells transfected with a gene encoding the target antigen. Examples of cells that may be transfected for efficient expression of the target
20 antigen include, but are not limited to, L cells and NIH 3T3 cells. However, if a transfected cell is employed to express and present a recombinant antigen, then is necessary to first deplete the immunoglobulin-expressing host cell population of any host cells that express antibodies reactive with membrane antigens of the non-transfected cell. Such depletion could be accomplished in one or more
25 rounds of absorption to non-transfected cells bound to a solid substrate. It would then be possible to employ the antigen expressing transfectant for positive selection of cells expressing specific recombinant antibodies. In a preferred embodiment, alternating cycles of negative and positive selection are repeated as often as necessary to achieve a desired enrichment.

30 In one example of a positive selection step, antibody expressing B lymphoma cells are allowed to adhere to a solid substrate to which B cell specific

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-118-

anti-CD19 and/or anti-CD20 antibody has been bound. Adherent indicator cells that undergo a lytic event are induced to release their cytoplasmic contents including any viral immunoglobulin heavy chain recombinants into the culture fluid. Recombinant viruses harvested from cells and cell fragments recovered in the culture fluid are enriched for those recombinant viruses that encode an immunoglobulin heavy chain which confers specificity for the selecting antigen when associated with some as yet unidentified light chains. Additional cycles of antigen driven selection in cells freshly infected with this enriched population of recombinant viruses and subsequently transfected with the same initial population of unselected plasmids encoding diverse light chains leads to further enrichment of the desired heavy chains. Following multiple reiterations of this selection process, a small number of heavy chains are isolated which possess optimal specificity for a defined antigen when associated with some unidentified light chains.

In order to select light chains that confer the desired specificity in association with the previously selected heavy chains, the entire selection process as described above is repeated by infecting host cells at MOI=1 with a library of diverse light chain recombinants in the vaccinia based vector followed by transfection with a plasmid recombinant for one of the previously selected heavy chains. The optimal light chain partners for that heavy chain are isolated following multiple cycles of antigen driven selection as described above.

In another preferred embodiment, a similar strategy is implemented by exploiting the binding properties conferred on a cell that expresses specific antibody on its surface membrane. Instead of employing early B cell lymphomas that undergo apoptosis in response to receptor crosslinking as indicator cells, this strategy, depicted in Figure 5, allows host cells expressing a desired immunoglobulin specificity to be selected by binding to synthetic particles or polymers to which antigen is coupled or to the surface of a specific antigen expressing transfected cell. In this case the indicator cells are chosen for the ability to express high levels of membrane immunoglobulin receptors rather than for an apoptotic response to crosslinking of membrane immunoglobulin receptors.

Preferred cell lines include immunoglobulin negative plasmacytomas. Other issues related to the specificity, background and efficiency of the selection process are treated as described above.

5

EXAMPLE 3

Selection of an Antibody with Defined Specificity from a Library of 10^9 Combinations of Immunoglobulin Heavy and Light Chains

10

The affinity of specific antibodies that can be selected from a library is a function of the size of that library. In general, the larger the number of heavy and light chain combinations represented in the library, the greater the likelihood that a high affinity antibody is present and can be selected. Previous work employing phage display methods has suggested that for many antigens a library that includes 10^9 immunoglobulin heavy and light chain combinations is of a sufficient size to select a relatively high affinity specific antibody. In principle, it is possible to construct a library with 10^9 recombinants each of which expresses a unique heavy chain and a unique light chain or a single chain construct with a combining site comprising variable regions of heavy and light chains. The most preferred method, however, is to generate this number of antibody combinations by constructing two libraries of 10^5 immunoglobulin heavy chains and 10^4 immunoglobulin light chains that can be co-expressed in all 10^9 possible combinations. In this example greater diversity is represented in the heavy chain pool because heavy chains have often been found to make a greater contribution than the associated light chain to a specific antigen combining site.

15

20

25

3.1 Heavy Chain Genes. A library of vaccinia recombinants at a titer of approximately 10^6 is constructed from a minimum of 10^5 immunoglobulin heavy chain cDNA transfer plasmid recombinants synthesized by the methods previously described (Example 1) from RNA derived from a pool of 100 bone marrow donors. As described below, this library must be further expanded to a titer of at least 10^9 heavy chain recombinants. A preferred method to expand the library is to infect microcultures of approximately 5×10^4 BSC1 cells with

30

individual pools of 10^3 vaccinia heavy chain recombinants. Typically a greater than 1,000 fold expansion in the viral titer is obtained after 48 hrs infection. Expanding viral titers in multiple individual pools mitigates the risk that a subset of recombinants will be lost due to relatively rapid growth of a competing subset.

5 **3.2 Light Chain Genes.** A library of vaccinia recombinants at a titer of approximately 10^5 is constructed from a minimum of 10^4 immunoglobulin light chain cDNA transfer plasmid recombinants synthesized from RNA derived from a pool of bone marrow donors as described in Example 1. For use in multiple cycles of heavy chain selection as described below, this library must be further
10 expanded to a titer of 10^{10} to 10^{11} light chain recombinants. A preferred method to expand the library is to infect 100 microcultures of approximately 5×10^4 BSC1 cells with individual pools of 10^3 vaccinia light chain recombinants. Viral recombinants recovered from each of the 100 infected cultures are further expanded as a separate pool to a titer of between 10^8 and 10^9 viral recombinants.
15 It is convenient to label these light chain pools L1 to L100.

3.3 Selection of Immunoglobulin Heavy Chain Recombinants. 100 cultures of 10^7 cells of a non-producing myeloma, preferably Sp2/0, or early B cell lymphoma, preferably CH33, are infected with viable vaccinia heavy chain recombinants at MOI=1 and simultaneously with psoralen (4'-aminomethyl-Trioxsalen) inactivated vaccinia light chain recombinants at MOI=1 to 10 (see
20 below). For psoralen inactivation, cell-free virus at 10^8 to 10^9 pfu/ml is treated with 10 μ g/ml psoralen for 10 minutes at 25°C and then exposed to long-wave (365-nm) UV light for 2 minutes (Tsung, K., J.H. Yim, W. Marti, R.M.L. Buller, and J.A. Norton. *J. Virol.* 70:165-171 (1996)) The psoralen treated virus is
25 unable to replicate but allows expression of early viral genes including recombinant genes under the control of early but not late viral promoters. Under these conditions, light chains synthesized from psoralen treated recombinants will be assembled into immunoglobulin molecules in association with the single heavy chain that is, on average, expressed in each infected cell.

30 The choice of infection with psoralen inactivated light chain recombinants at MOI=1 or at MOI=10 will influence the relative concentration in a single

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-121-

positive cell of a particular H+L chain combination which will be high at MOI=1 and low (because of dilution by multiple light chains) at MOI=10. A low concentration and correspondingly reduced density of specific immunoglobulin at the cell surface is expected to select for antibodies with higher affinity for the ligand of interest. On the other hand, a high concentration of specific receptor is expected to facilitate binding or signaling through the immunoglobulin receptor.

Following a first cycle of antigen-specific selection by binding or signaling as described in Example 2, an enriched population of recombinant virus is recovered from each culture with a titer which, during this initial selection and depending on background levels of non-specific binding or spontaneous release of virus, may be between 1% and 10% of the titer of input virus. It is convenient to label as H1a to H100a the heavy chain recombinant pools recovered from cultures in the first cycle of selection that received psoralen treated virus from the original light chain recombinant pools L1 to L100 respectively.

To carry out a second cycle of selection under the same conditions as the first cycle, it is again necessary to expand the titer of recovered heavy chain recombinants by 10 to 100 fold. For the second cycle of selection non-producing myeloma or early B cell lymphoma are again infected with viable viral heavy chain recombinants and psoralen treated light chain recombinants such that, for example, the same culture of 10^7 cells is infected with heavy chain recombinants recovered in pool H37a and psoralen treated light chain recombinants from the original L37 pool employed to select H37a. Heavy chain recombinants recovered from the H37a pool in the second cycle of selection are conveniently labeled H37b and so on.

Following the second cycle of selection, specific viral recombinants are likely, in general, to be enriched by a factor of 10 or more relative to the initial virus population. In this case, it is not necessary for the third cycle of selection to be carried out under the same conditions as the first or second cycle since specific clones are likely to be well-represented even at a 10 fold lower titer. For the third cycle of selection, therefore, 100 cultures of only 10^6 non-producing myeloma or early B cell lymphoma are again infected with viable viral heavy

chain recombinants and psoralen treated light chain recombinants from cognate pools. Another reduction by a factor of 10 in the number of infected cells is effected after the 5th cycle of selection.

3.4 Identification of Antigen-specific Heavy Chain Recombinants.

- 5 (a) Following any given cycle of selection it is possible to determine whether antigen-specific heavy chains have been enriched to a level of 10% or more in a particular pool, for example H37f, by picking 10 individual viral pfu from that heavy chain pool to test for antigen-specificity in association with light chains of the original L37 pool. Since the light chain population comprises 10^4 diverse cDNA distributed among 100 individual pools, the average pool has approximately 10^2 different light chains. Even if a selected heavy chain confers a desired antigenic specificity only in association with a single type of light chain in the available light chain pool, 1% of cells infected with the selected heavy chain recombinant and the random light chain pool at MOI=1 will express the desired specificity. This frequency can be increased to 10% on average if cells are infected with light chains at MOI=10. A preferred method to confirm specificity is to infect with immunoglobulin heavy chain and a pool of light chains a line of CH33 early B cell lymphoma transfected with an easily detected reporter construct, for example luciferase, driven by the promoter for BAX or another CH33 gene that is activated as a result of membrane receptor crosslinking. Infection of this transfectant with the plaque purified heavy chain recombinant and the relevant light chain pool will result in an easily detected signal if the selected heavy chain confers the desired antigenic specificity in association with any of the 100 or more light chains represented in that pool. Note that this same method is applicable to analysis of heavy chains whether they are selected by specific-binding or by specific-signaling through immunoglobulin receptors of infected cells.
- 20
- 25
- 30 (b) An alternative method to identify the most promising antigen-specific heavy chains is to screen for those that are most highly represented in the selected population. Inserts can be isolated by PCR amplification with vector specific primers flanking the insertion site and these inserts can be sequenced to

determine the frequency of any observed sequence. In this case, however, it remains necessary to identify a relevant light chain as described below.

3.5 Selection of Immunoglobulin Light Chain Recombinants. Once an antigen-specific heavy chain has been isolated, a light chain that confers antigen-specificity in association with that heavy chain can be isolated from the pool that was employed to select that heavy chain as described in 3.4(a). Alternatively, it may be possible to select yet another light chain from a larger library that, in association with the same heavy chain, could further enhance affinity. For this purpose a library of vaccinia recombinants at a titer of approximately 10^6 is constructed from a minimum of 10^5 immunoglobulin light chain cDNA transfer plasmid recombinants synthesized by the methods previously described (Example 1). The procedure described in 3.3 is reversed such that non-producing myeloma or early B cell lymphoma are now infected with viable viral light chain recombinants at MOI=1 and a single selected psoralen treated specific heavy chain recombinant. To promote selection of higher affinity immunoglobulin, it may be preferable to dilute the concentration of each specific H+L chain pair by infection with light chains at MOI= 10.

3.6 Selection of Immunoglobulin Heavy Chain Recombinants in the Presence of a Single Immunoglobulin Light Chain. The selection of an immunoglobulin heavy chain that can contribute to a particular antibody specificity is simplified if a candidate light chain has already been identified. This may be the case if, for example a murine monoclonal antibody has been previously selected. The murine light chain variable region can be grafted to a human light chain constant region to optimize pairing with human heavy chains, a process previously described by others employing phage display methods as "Guided Selection" (Jespers, L.S., A. Roberts, S.M. Mahler, G. Winter, H.R. and Hoogenboom. Bio/Technology 12:899-903, 1994; Figini, M., L. Obici, D. Mezzanzanica, A. Griffiths, M.I. Colnaghi, G. Winters, and S. Canevari. Cancer Res. 58:991-996, 1998). This molecular matching can, in principle, be taken even further if human variable gene framework regions are also grafted into the murine light chain variable region sequence (Rader, C., D.A. Cheresch, and C.F.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-124-

Barbas III. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8910-8915). Any human heavy chains selected to pair with this modified antigen-specific light chain can themselves become the basis for selection of an optimal human light chain from a more diverse pool as described in 3.5.

5

EXAMPLE 4

Selection of Specific Human Antibodies from a cDNA Library constructed in Adenovirus, Herpesvirus, or Retrovirus vectors

10 4.1 Herpesvirus. A method has been described for the generation of helper virus free stocks of recombinant, infectious Herpes Simplex Virus Amplicons (T.A. Stavropoulos, C.A. Strathdee. 1998 J. Virology 72:7137-7143). It is possible that a cDNA Library of human Immunoglobulin Heavy and/or Light chain genes or fragments thereof, including single chain fragments, constructed
15 in the plasmid Amplicon vector could be packaged into a library of infectious amplicon particles using this method. An Amplicon library constructed using immunoglobulin heavy chain genes, and another Amplicon library constructed using immunoglobulin light chain genes could be used to coinfect a non-producing myeloma cell line. The myeloma cells expressing an immunoglobulin
20 gene combination with the desired specificity can be enriched by selection for binding to the antigen of interest. The Herpes Amplicons are capable of stable transgene expression in infected cells. Cells selected for binding in a first cycle will retain their immunoglobulin gene combination, and will stably express antibody with this specificity. This allows for the reiteration of selection cycles
25 until immunoglobulin genes with the desired specificity can be isolated. Selection strategies that result in cell death could also be attempted. The amplicon vector recovered from these dead selected cells cannot be used to infect fresh target cells, because in the absence of helper virus the amplicons are replication defective and will not be packaged into infectious form. The amplicon vectors
30 contain a plasmid origin of replication and an antibiotic resistance gene. This makes it possible to recover the selected amplicon vector by transforming DNA

purified from the selected cells into bacteria. Selection with the appropriate antibiotic would allow for the isolation of bacterial cells that had been transformed by the amplicon vector. The use of different antibiotic resistance genes on the heavy and light chain Amplicon vectors, for example ampicillin and kanamycin, would allow for the separate selection of heavy and light chain genes from the same population of selected cells. Amplicon plasmid DNA can be extracted from the bacteria and packaged into infectious viral particles by cotransfection of the amplicon DNA and packaging defective HSV genomic DNA into packaging cells. Infectious amplicon particles can then be harvested and used to infect a fresh population of target cells for another round of selection

4.2 Adenovirus. Methods have been described for the production of recombinant Adenovirus (S. Miyake, M. Makimura, Y. Kanegae, S. Harada, Y. Sato, K. Takamori, C. Tokuda, I. Saito. 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1320-1324; T.C. He, S. Zhou, L.T. Da Costa, J. Yu, K.W. Kinzler, B. Vogelstein. 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2509-2514). It is possible that a cDNA library could be constructed in an Adenovirus vector using either of these methods. Insertion of cDNA into the E3 or E4 region of Adenovirus results in a replication competent recombinant virus. This library could be used for similar applications as the vaccinia cDNA libraries constructed by trimolecular recombination. For example a heavy chain cDNA library can be inserted into the E3 or E4 region of Adenovirus. This results in a replication competent heavy chain library. A light chain cDNA library could be inserted into the E1 gene of Adenovirus, generating a replication defective library. This replication defective light chain library can be amplified by infection of cells that provide Adenovirus E1 in trans, such as 293 cells. These two libraries can be used in similar selection strategies as those described using replication competent vaccinia heavy chain library and Psoralen inactivated vaccinia light chain library.

4.3 Advantages of vaccinia virus. Vaccinia virus possesses several advantages over Herpes or Adenovirus for construction of cDNA Libraries. First, vaccinia virus replicates in the cytoplasm of the host cell, while HSV and Adenovirus replicate in the nucleus. A higher frequency of cDNA recombinant

transfer plasmid may be available for recombination in the cytoplasm with vaccinia than is able to translocate into the nucleus for packaging/recombination in HSV or Adenovirus. Second, vaccinia virus, but not Adenovirus or Herpes virus, is able to replicate plasmids in a sequence independent manner (M. Merchlinsky, B. Moss. 1988 *Cancer Cells* 6: 87-93). Vaccinia replication of cDNA recombinant transfer plasmids may result in a higher frequency of recombinant virus being produced. Although we have described the potential construction of cDNA Libraries in Herpes or Adenovirus vectors, it should be emphasized that there has been no reported use of these methods to construct a cDNA Library in either of these viral vectors.

4.4 Retrovirus. Construction of cDNA Libraries in replication defective retroviral vectors have been described (T. Kitamura, M. Onishi, S. Kinoshita, A. Shibuya, A. Miyajima, and G.P. Nolan. 1995 *PNAS* 92:9146-9150; I. Whitehead, H. Kirk, and R. Kay. 1995 *Molecular and Cellular Biology* 15:704-710.). Retroviral vectors integrate upon infection of target cells, and have gained widespread use for their ability to efficiently transduce target cells, and for their ability to induce stable transgene expression. A Retroviral cDNA library constructed using immunoglobulin heavy chain genes, and another Retroviral library constructed using immunoglobulin light chain genes could be used to coinfect a non-producing myeloma cell line. The myeloma cells expressing an immunoglobulin gene combination with the desired specificity can be enriched for by selection for binding to the antigen of interest. Cells selected for binding in a first cycle will retain their immunoglobulin gene combination, and will stably express immunoglobulins with this specificity. This allows for the reiteration of selection cycles until immunoglobulin genes with the desired specificity can be isolated.

EXAMPLE 5

Trimolecular Recombination

5 **5.1 Production of an Expression Library.** This example describes a tri-molecular recombination method employing modified vaccinia virus vectors and related transfer plasmids that generates close to 100% recombinant vaccinia virus and, for the first time, allows efficient construction of a representative DNA library in vaccinia virus. The trimolecular recombination method is illustrated in FIG. 6.

10 **5.2 Construction of the Vectors.** The previously described vaccinia virus transfer plasmid pJ/K, a pUC 13 derived plasmid with a vaccinia virus thymidine kinase gene containing an in-frame Not I site (Merchlinsky, M. *et al.*, Virology 190:522-526), was further modified to incorporate a strong vaccinia virus promoter followed by Not I and Apa I restriction sites. Two different vectors, 15 p7.5/tk and pEL/tk, included, respectively, either the 7.5K vaccinia virus promoter or a strong synthetic early/late (E/L) promoter (FIG. 7). The Apa I site was preceded by a strong translational initiation sequence including the ATG codon. This modification was introduced within the vaccinia virus thymidine kinase (*tk*) gene so that it was flanked by regulatory and coding sequences of the 20 viral *tk* gene. The modifications within the *tk* gene of these two new plasmid vectors were transferred by homologous recombination in the flanking *tk* sequences into the genome of the Vaccinia Virus WR strain derived vNotI' vector to generate new viral vectors v7.5/tk and vEL/tk. Importantly, following Not I and Apa I restriction endonuclease digestion of these viral vectors, two large viral 25 DNA fragments were isolated each including a separate non-homologous segment of the vaccinia *tk* gene and together comprising all the genes required for assembly of infectious viral particles. Further details regarding the construction and characterization of these vectors and their alternative use for direct ligation of DNA fragments in vaccinia virus are described in Example 1.

5.3 Generation of an Increased Frequency of Vaccinia Virus Recombinants. Standard methods for generation of recombinants in vaccinia virus exploit homologous recombination between a recombinant vaccinia transfer plasmid and the viral genome. Table 3 shows the results of a model experiment in which the frequency of homologous recombination following transfection of a recombinant transfer plasmid into vaccinia virus infected cells was assayed under standard conditions. To facilitate functional assays, a minigene encoding the immunodominant 257-264 peptide epitope of ovalbumin in association with H-2K^b was inserted at the Not I site in the transfer plasmid tk gene. As a result of homologous recombination, the disrupted tk gene is substituted for the wild type viral tk+ gene in any recombinant virus. This serves as a marker for recombination since tk- human 143B cells infected with tk- virus are, in contrast to cells infected with wild type tk+ virus, resistant to the toxic effect of BrdU. Recombinant virus can be scored by the viral pfu on 143B cells cultured in the presence of 125 mM BrdU.

The frequency of recombinants derived in this fashion is of the order of 0.1% (Table 3).

Table 3: Generation of Recombinant Vaccinia Virus by Standard Homologous Recombination				
Virus*	DNA	Titer w/o BrdU	Titer w/ BrdU	% Recombinant**
vaccinia	---	4.6×10^7	3.0×10^3	0.006
vaccinia	30 ng pE/Lova	3.7×10^7	3.2×10^4	0.086
vaccinia	300 ng pE/Lova	2.7×10^7	1.5×10^4	0.056

* vaccinia virus strain vNotI

** % Recombinant = (Titer with BrdU/Titer without BrdU) x 100

This recombination frequency is too low to permit efficient construction of a cDNA library in a vaccinia vector. The following two procedures were used to generate an increased frequency of vaccinia virus recombinants.

(1) One factor limiting the frequency of viral recombinants generated by homologous recombination following transfection of a plasmid transfer vector into vaccinia virus infected cells is that viral infection is highly efficient whereas plasmid DNA transfection is relatively inefficient. As a result many infected cells do not take up recombinant plasmids and are, therefore, capable of producing only wild type virus. In order to reduce this dilution of recombinant efficiency, a mixture of naked viral DNA and recombinant plasmid DNA was transfected into Fowl Pox Virus (FPV) infected mammalian cells. As previously described by others (Scheifflinger, F., *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9977-9981), FPV does not replicate in mammalian cells but provides necessary helper functions required for packaging mature vaccinia virus particles in cells transfected with non-infectious naked vaccinia DNA. This modification of the homologous recombination technique alone increased the frequency of viral recombinants approximately 35 fold to 3.5% (Table 4).

Table 4: Generation of Recombinant Vaccinia Virus
by Modified Homologous Recombination

Virus	DNA	Titer w/o BrdU	Titer w/ BrdU	% Recombinant*
PFV	None	0	0	0
None	vaccinia WR	0	0	0
PFV	vaccinia WR	8.9×10^6	2.0×10^2	0.002
PFV	vaccinia WR + pE/Lova (1:1)	5.3×10^6	1.2×10^5	2.264
PFV	vaccinia WR + pE/Lova (1:10)	8.4×10^5	3.0×10^4	3.571

* % Recombinant = (Titer with BrdU/Titer without BrdU) x 100

Table 4. Confluent monolayers of BSC1 cells (5×10^5 cells/well) were infected with moi=1.0 of fowlpox virus strain HP1. Two hours later supernatant was removed, cells were washed 2X with Opti-Mem I media, and transfected using lipofectamine with 600ng vaccinia strain WR genomic DNA either alone,

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-130-

or with 1:1 or 1:10 (vaccinia:plasmid) molar ratios of plasmid pE/Lova. This plasmid contains a fragment of the ovalbumin cDNA, which encodes the SIINFEKL epitope, known to bind with high affinity to the mouse class I MHC molecule K^b. Expression of this minigene is controlled by a strong, synthetic Early/Late vaccinia promoter. This insert is flanked by vaccinia tk DNA. Three days later cells were harvested, and virus extracted by three cycles of freeze/thaw in dry ice isopropanol/ 37°C water bath. Crude virus stocks were titered by plaque assay on human TK- 143B cells with and without BrdU.

(2) A further significant increase in the frequency of viral recombinants was obtained by transfection of FPV infected cells with a mixture of recombinant plasmids and the two large approximately 80 kilobases and 100 kilobases fragments of vaccinia virus v7.5/tk DNA produced by digestion with Not I and Apa I restriction endonucleases. Because the Not I and Apa I sites have been introduced into the *tk* gene, each of these large vaccinia DNA arms includes a fragment of the *tk* gene. Since there is no homology between the two *tk* gene fragments, the only way the two vaccinia arms can be linked is by bridging through the homologous tk sequences that flank the inserts in the recombinant transfer plasmid. The results in Table 5 show that >99% of infectious vaccinia virus produced in triply transfected cells is recombinant for a DNA insert as determined by BrdU resistance of infected tk- cells.

Table 5: Generation of 100% Recombinant Vaccinia Virus
Using Tri-Molecular Recombination

Virus	DNA	Titer w/o BrdU	Titer w/ BrdU	% Recombinant*
PFV	Uncut v7.5/tk	2.5×10^6	6.0×10^3	0.24
PFV	NotI/Apal v7.5/tk arms	2.0×10^2	0	0
PFV	NotI/Apal v7.5/tk arms + pE/Lova (1:1)	6.8×10^4	7.4×10^4	100

* % Recombinant = (Titer with BrdU/Titer without BrdU) x 100

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-131-

Table 5. Genomic DNA from vaccinia strain V7.5/tk (1.2 micrograms) was digested with *ApaI* and *NotI* restriction endonucleases. The digested DNA was divided in half. One of the pools was mixed with a 1:1 (vaccinia:plasmid) molar ratio of pE/Lova. This plasmid contains a fragment of the ovalbumin cDNA, which encodes the SIINFEKL epitope, known to bind with high affinity to the mouse class I MHC molecule K^b. Expression of this minigene is controlled by a strong, synthetic Early/Late vaccinia promoter. This insert is flanked by vaccinia tk DNA. DNA was transfected using lipofectamine into confluent monolayers (5 X 10⁵ cells/well) of BSC1 cells, which had been infected 2 hours previously with moi=1.0 FPV. One sample was transfected with 600ng untreated genomic V7.5/tk DNA. Three days later cells were harvested, and the virus was extracted by three cycles of freeze/thaw in dry ice isopropanol/ 37^o C water bath. Crude viral stocks were plaqued on TK- 143 B cells with and without BrdU selection.

5.4 Construction of a Representative cDNA Library in Vaccinia Virus. A cDNA library is constructed in the vaccinia vector to demonstrate representative expression of known cellular mRNA sequences. Additional modifications have been introduced into the p7.5/tk transfer plasmid and v7.5/tk viral vector to enhance the efficiency of recombinant expression in infected cells. These include introduction of translation initiation sites in three different reading frames and of both translational and transcriptional stop signals as well as additional restriction sites for DNA insertion.

First, the *HindIII* J fragment (vaccinia tk gene) of p7.5/tk was subcloned from this plasmid into the *HindIII* site of pBS phagemid (Stratagene) creating pBS.Vtk.

Second, a portion of the original multiple cloning site of pBS.Vtk was removed by digesting the plasmid with *SmaI* and *PstI*, treating with Mung Bean Nuclease, and ligating back to itself, generating pBS.Vtk.MCS-. This treatment removed the unique *SmaI*, *BamHI*, *Sall*, and *PstI* sites from pBS.Vtk.

Third, the object at this point was to introduce a new multiple cloning site downstream of the 7.5k promoter in pBS.Vtk.MCS-. The new multiple cloning

site was generated by PCR using 4 different upstream primers, and a common downstream primer. Together, these 4 PCR products would contain either no ATG start codon, or an ATG start codon in each of the three possible reading frames. In addition, each PCR product contains at its 3 prime end, translation stop codons in all three reading frames, and a vaccinia virus transcription double stop signal. These 4 PCR products were ligated separately into the NotI/ ApaI sites of pBS.Vtk.MCS-, generating the 4 vectors, p7.5/ATG0/tk, p7.5/ATG1/tk, p7.5/ATG2/tk, and p7.5/ATG3/tk whose sequence modifications relative to the p7.5/tk vector are shown in Fig. 12. Each vector includes unique BamHI, SmaI, PstI, and SalI sites for cloning DNA inserts that employ either their own endogenous translation initiation site (in vector p7.5/ATG0/tk) or make use of a vector translation initiation site in any one of the three possible reading frames (p7.5/ATG1/tk, p7.5/ATG3/tk, and p7.5/ATG4/tk).

In a model experiment cDNA was synthesized from poly-A+ mRNA of a murine tumor cell line (BCA39) and ligated into each of the four modified p7.5/tk transfer plasmids. The transfer plasmid is amplified by passage through procaryotic host cells such as *E. coli* as described herein or as otherwise known in the art. Twenty micrograms of Not I and Apa I digested v/tk vaccinia virus DNA arms and an equimolar mixture of the four recombinant plasmid cDNA libraries was transfected into FPV helper virus infected BSC-1 cells for tri-molecular recombination. The virus harvested had a total titer of 6×10^6 pfu of which greater than 90% were BrdU resistant.

In order to characterize the size distribution of cDNA inserts in the recombinant vaccinia library, individual isolated plaques were picked using a sterile pasteur pipette and transferred to 1.5ml tubes containing 100 μ l Phosphate Buffered Saline (PBS). Virus was released from the cells by three cycles of freeze/thaw in dry ice/isopropanol and in a 37°C water bath. Approximately one third of each virus plaque was used to infect one well of a 12 well plate containing tk- human 143B cells in 250 μ l final volume. At the end of the two hour infection period each well was overlaid with 1 ml DMEM with 2.5% fetal bovine serum (DMEM-2.5) and with BUdR sufficient to bring the final

concentration to 125 $\mu\text{g/ml}$. Cells were incubated in a CO_2 incubator at 37°C for three days. On the third day the cells were harvested, pelleted by centrifugation, and resuspended in 500 μl PBS. Virus was released from the cells by three cycles of freeze/ thaw as described above. Twenty percent of each virus stock was used to infect a confluent monolayer of BSC-1 cells in a 50mm tissue culture dish in a final volume of 3 ml DMEM-2.5. At the end of the two hour infection period the cells were overlaid with 3 ml of DMEM-2.5. Cells were incubated in a CO_2 incubator at 37°C for three days. On the third day the cells were harvested, pelleted by centrifugation, and resuspended in 300 μl PBS. Virus was released from the cells by three cycles of freeze/ thaw as described above. One hundred microliters of crude virus stock was transferred to a 1.5 ml tube, an equal volume of melted 2% low melting point agarose was added, and the virus/agarose mixture was transferred into a pulsed field gel sample block. When the agar worms were solidified they were removed from the sample block and cut into three equal sections. All three sections were transferred to the same 1.5 ml tube, and 250 μl of 0.5M EDTA, 1% Sarkosyl, 0.5mg/ml Proteinase K was added. The worms were incubated in this solution at 37°C for 24 hours. The worms were washed several times in 500 μl 0.5X TBE buffer, and one section of each worm was transferred to a well of a 1% low melting point agarose gel. After the worms were added the wells were sealed by adding additional melted 1% low melting point agarose. This gel was then electrophoresed in a Bio-Rad pulsed field gel electrophoresis apparatus at 200volts, 8 second pulse times, in 0.5X TBE for 16 hours. The gel was stained in ethidium bromide, and portions of agarose containing vaccinia genomic DNA were excised from the gel and transferred to a 1.5 ml tube. Vaccinia DNA was purified from the agarose using β -Agarase (Gibco) following the recommendations of the manufacturer. Purified vaccinia DNA was resuspended in 50 μl ddH₂O. One microliter of each DNA stock was used as the template for a Polymerase Chain Reaction (PCR) using vaccinia TK specific primers MM428 and MM430 (which flank the site of insertion) and Klentaq Polymerase (Clontech) following the recommendations of the manufacturer in a 20 μl final volume. Reaction conditions included an initial denaturation step at 95°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of: 94°C 30

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-134-

seconds, 55°C 30 seconds, 68°C 3 minutes. Two and a half microliters of each PCR reaction was resolved on a 1% agarose gel, and stained with ethidium bromide. Amplified fragments of diverse sizes were observed. When corrected for flanking vector sequences amplified in PCR the inserts range in size between 300 and 2500 bp.

Representative expression of gene products in this library was established by demonstrating that the frequency of specific cDNA recombinants in the vaccinia library was indistinguishable from the frequency with which recombinants of the same cDNA occur in a standard plasmid library. This is illustrated in Table 6 for an IAP sequence that was previously shown to be upregulated in murine tumors. Twenty separate pools with an average of either 800 or 200 viral pfu from the vaccinia library were amplified by infecting microcultures of 143B tk- cells in the presence of BDUR. DNA was extracted from each infected culture after three days and assayed by PCR with sequence specific primers for the presence of a previously characterized endogenous retrovirus (IAP, intracisternal A particle) sequence. Poisson analysis of the frequency of positive pools indicates a frequency of one IAP recombinant for approximately every 500 viral pfu (Table 6). Similarly, twenty separate pools with an average of either 1,400 or 275 bacterial cfu from the plasmid library were amplified by transformation of DH5 a bacteria. Plasmid DNA from each pool was assayed for the presence of the same IAP sequence. Poisson analysis of the frequency of positive pools indicates a frequency of one IAP recombinant for every 450 plasmids (Table 6).

Table 6. Limiting dilution analysis of IAP sequences in a recombinant vaccinia library and a conventional plasmid cDNA library

	#Wells Positive by PCR	F_0	μ	Frequency
#PFU/well		Vaccinia Library		
800	18/20	0.05	2.3	1/350
200	6/20	0.7	0.36	1/560

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-135-

#CFU/well		Plasmid Library		
1400	20/20	0	-	-
275	9/20	0.55	0.6	1/450

5 F_0 = fraction negative wells; μ = DNA precursors / well = $-\ln F_0$

Similar analysis was carried out with similar results for representation of an alpha tubulin sequence in the vaccinia library. The comparable frequency of arbitrarily chosen sequences in the two libraries constructed from the same tumor cDNA suggests that although construction of the Vaccinia library is somewhat more complex and is certainly less conventional than construction of a plasmid library, it is equally representative of tumor cDNA sequences.

10

Discussion

15 The above-described tri-molecular recombination strategy yields close to 100% viral recombinants. This is a highly significant improvement over current methods for generating viral recombinants by transfection of a plasmid transfer vector into vaccinia virus infected cells. This latter procedure yields viral recombinants at a frequency of the order of only 0.1%. The high yield of viral recombinants in tri-molecular recombination makes it possible, for the first time, to efficiently construct genomic or cDNA libraries in a vaccinia virus derived vector. In the first series of experiments a titer of 6×10^6 recombinant virus was obtained following transfection with a mix of 20 micrograms of Not I and Apa I digested vaccinia vector arms together with an equimolar concentration of tumor cell cDNA. This technological advance creates the possibility of new and efficient screening and selection strategies for isolation of specific genomic and cDNA clones.

20

25

The tri-molecular recombination method as herein disclosed may be used with other viruses such as mammalian viruses including vaccinia and herpes viruses. Typically, two viral arms which have no homology are produced. The

30

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-136-

only way that the viral arms can be linked is by bridging through homologous sequences that flank the insert in a transfer vector such as a plasmid. When the two viral arms and the transfer vector are present in the same cell the only infectious virus produced is recombinant for a DNA insert in the transfer vector.

5 Libraries constructed in vaccinia and other mammalian viruses by the tri-molecular recombination method of the present invention may have similar advantages to those described here for vaccinia virus and its use in identifying target antigens in the CTL screening system of the invention. Similar advantages are expected for DNA libraries constructed in vaccinia or other mammalian
10 viruses when carrying out more complex assays in eukaryotic cells. Such assays include but are not limited to screening for DNA encoding receptors and ligands of eukaryotic cells.

EXAMPLE 6

15 Preparation of Transfer Plasmids

The transfer vectors may be prepared for cloning by known means. A preferred method involves cutting 1-5 micrograms of vector with the appropriate restriction endonucleases (for example SmaI and SalI or BamHI and SalI) in the appropriate buffers, at the appropriate temperatures for at least 2 hours. Linear
20 digested vector is isolated by electrophoresis of the digested vector through a 0.8% agarose gel. The linear plasmid is excised from the gel and purified from agarose using methods that are well known.

Ligation. The cDNA and digested transfer vector are ligated together using well known methods. In a preferred method 50-100ng of transfer vector is
25 ligated with varying concentrations of cDNA using T4 DNA Ligase, using the appropriate buffer, at 14°C for 18 to 24 hours.

Transformation. Aliquots of the ligation reactions are transformed by electroporation into *E. coli* bacteria such as DH10B or DH5 alpha using methods
30 that are well known. The transformation reactions are plated onto LB agar plates

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-137-

containing a selective antibiotic (ampicillin) and grown for 14 – 18 hours at 37°C. All of the transformed bacteria are pooled together, and plasmid DNA is isolated using well known methods.

Preparation of buffers mentioned in the above description of preferred methods according to the present invention will be evident to those of skill.

EXAMPLE 7

Introduction of Vaccinia Virus DNA Fragments and Transfer Plasmids into Tissue Culture Cells for Trimolecular Recombination

10

A cDNA or other library is constructed in the 4 transfer plasmids as described in Example 5, or by other art-known techniques. Trimolecular recombination is employed to transfer this cDNA library into vaccinia virus. Confluent monolayers of BSC1 cells are infected with fowlpox virus HP1 at a moi of 1-1.5. Infection is done in serum free media supplemented with 0.1% Bovine Serum Albumin. The BSC1 cells may be in 12 well or 6 well plates, 60 mm or 100mm tissue culture plates, or 25cm², 75 cm², or 150 cm² flasks. Purified DNA from v7.5/tk or vEL/tk is digested with restriction endonucleases Apal and NotI. Following these digestions the enzymes are heat inactivated, and the digested vaccinia arms are purified using a centricon 100 column. Transfection complexes are then formed between the digested vaccinia DNA and the transfer plasmid cDNA library. A preferred method uses Lipofectamine or Lipofectamine Plus (Life Technologies, Inc.) to form these transfection complexes. Transfections in 12 well plates usually require 0.5 micrograms of digested vaccinia DNA and 10ng to 200 ng of plasmid DNA from the library. Transfection into cells in larger culture vessels requires a proportional increase in the amounts of vaccinia DNA and transfer plasmid. Following a two hour infection at 37°C the fowlpox is removed, and the vaccinia DNA, transfer plasmid transfection complexes are added. The cells are incubated with the transfection complexes for 3 to 5 hours, after which the transfection complexes are removed and replaced with 1 ml DMEM supplemented with 2.5% Fetal

15

20

25

30

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-138-

Bovine Serum. Cells are incubated in a CO₂ incubated at 37°C for 3 days. After 3 days the cells are harvested, and virus is released by three cycles of freeze/thaw in dry ice/ isopropanol / 37°C water bath.

5

EXAMPLE 8

Transfection of Mammalian Cells

This example describes alternative methods to transfect cells with vaccinia DNA and transfer plasmid. Trimolecular recombination can be performed by transfection of digested vaccinia DNA and transfer plasmid into host cells using for example, calcium-phosphate precipitation (F.L. Graham, A.J. Van der Eb (1973) *Virology* 52: 456-467, C. Chen, H. Okayama (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745-2752), DEAE-Dextran (D.J. Sussman, G. Milman (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4: 1641-1643), or electroporation (T.K. Wong, E. Neumann (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 584-587, E. Neumann, M. Schafer-Ridder, Y. Wang, P.H. Hofschneider (1982) *EMBO J.* 1: 841-845).

EXAMPLE 9

Construction of MVA Trimolecular Recombination Vectors

20

In order to construct a Modified Vaccinia Ankara (MVA) vector suitable for trimolecular recombination, two unique restriction endonuclease sites must be inserted into the MVA tk gene. The complete MVA genome sequence is known (GenBank U94848). A search of this sequence revealed that restriction endonucleases *AscI*, *RsrII*, *SfiI*, and *XmaI* do not cut the MVA genome. Restriction endonucleases *AscI* and *XmaI* have been selected due to the commercial availability of the enzymes, and the size of the recognition sequences, 8 bp and 6 bp for *AscI* and *XmaI* respectively. In order to introduce these sites into the MVA tk gene a construct will be made that contains a reporter

25

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-139-

gene (*E. coli gusA*) flanked by XmaI and AscI sites. The Gus gene is available in pCRII.Gus (M. Merchlinsky, D. Eckert, E. Smith, M. Zauderer. 1997 *Virology* 238: 444-451). This reporter gene construct will be cloned into a transfer plasmid containing vaccinia tk DNA flanks and the early/late 7.5k promoter to control expression of the reporter gene. The Gus gene will be PCR amplified from this construct using Gus specific primers. Gus sense 5' ATGTTACGTCCTGTAGAAACC 3' (SEQ ID NO:94), and Gus Antisense 5'TCATTGTTTGCCCTCCCTGCTG 3'(SEQ ID NO:95). The Gus PCR product will then be PCR amplified with Gus specific primers that have been modified to include NotI and XmaI sites on the sense primer, and AscI and ApaI sites on the antisense primer. The sequence of these primers is:

NX-Gus Sense 5' AAAGCGCCGCCCGGGATGTTACGTCC
3' (SEQ ID NO:96); and

A A - G u s a n t i s e n s e 5 '
AAAGGGCCCGCGCGCTCATTGTTTGCC 3' (SEQ ID
NO:97).

This PCR product will be digested with NotI and ApaI and cloned into the NotI and ApaI sites of p7.5/tk (M. Merchlinsky, D. Eckert, E. Smith, M. Zauderer. 1997 *Virology* 238:444-451). The 7.5k-XmaI-gusA-AscI construct will be introduced into MVA by conventional homologous recombination in permissive QT35 or BHK cells. Recombinant plaques will be selected by staining with the Gus substrate X-Glu (5-bromo-3 indoyl- β -D-glucuronic acid; Clontech) (M.W. Carroll, B. Moss. 1995 *Biotechniques* 19:352-355). MVA-Gus clones, which will also contain the unique XmaI and AscI sites, will be plaque purified to homogeneity. Large scale cultures of MVA-Gus will be amplified on BHK cells, and naked DNA will be isolated from purified virus. After digestion with XmaI and AscI the MVA-Gus DNA can be used for trimolecular recombination in order to construct cDNA expression libraries in MVA.

MVA is unable to complete its life cycle in most mammalian cells. This attenuation can result in a prolonged period of high levels of expression of recombinant cDNAs, but viable MVA cannot be recovered from infected cells.

The inability to recover viable MVA from selected cells would prevent the repeated cycles of selection required to isolate functional cDNA recombinants of interest. A solution to this problem is to infect MVA infected cells with a helper virus that can complement the host range defects of MVA. This helper virus can provide the gene product(s) which MVA lacks that are essential for completion of its life cycle. It is unlikely that another host range restricted helper virus, such as fowlpox, would be able to complement the MVA defect(s), as these viruses are also restricted in mammalian cells. Wild type strains of vaccinia virus would be able to complement MVA. In this case however, production of replication competent vaccinia virus would complicate additional cycles of selection and isolation of recombinant MVA clones. A conditionally defective vaccinia virus could be used which could provide the helper function needed to recover viable MVA from mammalian cells under nonpermissive conditions, without the generation of replication competent virus. The vaccinia D4R open reading frame (orf) encodes a uracil DNA glycosylase enzyme. This enzyme is essential for vaccinia virus replication, is expressed early after infection (before DNA replication), and disruption of this gene is lethal to vaccinia. It has been demonstrated that a stably transfected mammalian cell line expressing the vaccinia D4R gene was able to complement a D4R deficient vaccinia virus (G. W. Holzer, F.G. Falkner. 1997 *J. Virology* 71:4997-5002). A D4R deficient vaccinia virus would be an excellent candidate as a helper virus to complement MVA in mammalian cells.

In order to construct a D4R complementing cell line the D4R orf will be cloned from vaccinia strain v7.5/tk by PCR amplification using primers D4R-Sense 5' AAAGGATCCA TAATGAATTC AGTGACTGTA TCACACG 3' (SEQ ID NO:98), and D4R Antisense 5' CTTGCGGCCG CTTAATAAAT AAACCCCTGA GCCC 3'(SEQ ID NO:99). The sense primer has been modified to include a BamHI site, and the anti-sense primer has been modified to include a NotI site. Following PCR amplification and digestion with BamHI and NotI the D4R orf will be cloned into the BamHI and NotI sites of pIRESHyg (Clontech). This mammalian expression vector contains the strong CMV

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-141-

Immediate Early promoter/Enhancer and the ECMV internal ribosome entry site (IRES). The D4RIRESHyg construct will be transfected into BSC1 cells and transfected clones will be selected with hygromycin. The IRES allows for efficient translation of a polycistronic mRNA that contains the D4Rorf at the 5' end, and the Hygromycin phosphotransferase gene at the 3' end. This results in a high frequency of Hygromycin resistant clones being functional (the clones express D4R). BSC1 cells that express D4R (BSC1.D4R) will be able to complement D4R deficient vaccinia, allowing for generation and propagation of this defective strain.

To construct D4R deficient vaccinia, the D4R orf (position 100732 to 101388 in vaccinia genome) and 983 bp (5' end) and 610 bp (3' end) of flanking sequence will be PCR amplified from the vaccinia genome. Primers D4R Flank sense 5' ATTGAGCTCT TAATACTTTT GTCGGGTAA AGAG 3' (SEQ ID NO:100), and D4R Flank antisense 5' TTACTCGAGA GTGTCGCAAT TTGGATTTT 3' (SEQ ID NO:101) contain a SacI (Sense) and XhoI (Antisense) site for cloning and will amplify position 99749 to 101998 of the vaccinia genome. This PCR product will be cloned into the SacI and XhoI sites of pBluescript II KS (Stratagene), generating pBS.D4R.Flank. The D4R gene contains a unique EcoRI site beginning at nucleotide position 3 of the 657bp orf, and a unique PstI site beginning at nucleotide position 433 of the orf. Insertion of a Gus expression cassette into the EcoRI and PstI sites of D4R will remove most of the D4R coding sequence. A 7.5k promoter- Gus expression vector has been constructed (M. Merchlinsky, D. Eckert, E. Smith, M. Zauderer. 1997 *Virology* 238:444-451). The 7.5-Gus expression cassette will be isolated from this vector by PCR using primers 7.5 Gus Sense 5' AAAGAATTCC TTTATTGTCA TCGGCCAAA 3' (SEQ ID NO:102) and 7.5Gus antisense 5' AATCTGCAGT CATTGTTTGC CTCCCTGCTG 3' (SEQ ID NO:103). The 7.5Gus sense primer contains an EcoRI site and the 7.5Gus antisense primer contains a PstI site. Following PCR amplification the 7.5Gus molecule will be digested with EcoRI and PstI and inserted into the EcoRI and PstI sites in pBS.D4R.Flank, generating pBS.D4R-/7.5Gus⁺. D4R-/Gus⁺ vaccinia can be generated by conventional

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-142-

homologous recombination by transfecting the pBS.D4R-/7.5Gus⁺ construct into v7.5/tk infected BSC1.D4R cells. D4R-/Gus⁺ virus can be isolated by plaque purification on BSC1.D4R cells and staining with X-Glu. The D4R- virus can be used to complement and rescue the MVA genome in mammalian cells.

5 In a related embodiment, the MVA genome may be rescued in mammalian cells with other defective poxviruses, and also by a psoralen/UV-inactivated wild-type poxviruses. Psoralen/UV inactivation is discussed herein.

EXAMPLE 10

10 Construction and use of D4R Trimolecular Recombination Vectors

Poxvirus infection can have a dramatic inhibitory effect on host cell protein and RNA synthesis. These effects on host gene expression could, under some conditions, interfere with the selection of specific poxvirus recombinants that have a defined physiological effect on the host cell. Some strains of vaccinia virus that are deficient in an essential early gene have been shown to have greatly reduced inhibitory effects on host cell protein synthesis. Production of recombinant cDNA libraries in a poxvirus vector that is deficient in an early gene function could, therefore, be advantageous for selection of certain recombinants that depend on continued active expression of some host genes for their physiological effect. Disruption of essential viral genes prevents propagation of the mutant strain. Replication defective strains of vaccinia could, however, be rescued by providing the missing function through transcomplementation in host cells or by helper virus that can be induced to express this gene.

25 Infection of a cell population with a poxvirus library constructed in a replication deficient strain should greatly attenuate the effects of infection on host cell signal transduction mechanisms, differentiation pathways, and transcriptional regulation. An additional and important benefit of this strategy is that expression of the essential gene under the control of a targeted transcriptional regulatory region can itself be the means of selecting recombinant virus that directly or

30

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-143-

indirectly lead to activation of that transcriptional regulatory region. Examples include the promoter of a gene activated as a result of crosslinking surface immunoglobulin receptors on early B cell precursors or the promoter of a gene that encodes a marker induced following stem cell differentiation. If such a promoter drives expression of an essential viral gene, then only those viral recombinants that directly or indirectly activate expression of that transcriptional regulator will replicate and be packaged as infectious particles. This method has the potential to give rise to much lower background than selection methods based on expression of *dipA* or a CTL target epitope because uninduced cells will contain no replication competent vaccinia virus that might be released through non-specific bystander effects. The selected recombinants can be further expanded in a complementing cell line or in the presence of a complementing helper virus or transfected plasmid.

A number of essential early vaccinia genes have been described. Preferably, a vaccinia strain deficient for the D4R gene could be employed. The vaccinia D4R open reading frame (orf) encodes a uracil DNA glycosylase enzyme. This enzyme is required for viral DNA replication and disruption of this gene is lethal to vaccinia (A.K. Millns, M.S. Carpenter, and A.M. Delange. 1994 *Virology* 198:504-513). It has been demonstrated that a stably transfected mammalian cell line expressing the vaccinia D4R gene is able to complement a D4R deficient vaccinia virus (G. W. Holzer, F.G. Falkner. 1997 *J. Virology* 71: 4997-5002). In the absence of D4R complementation, infection with the D4R deficient vaccinia results in greatly reduced inhibition of host cell protein synthesis (Holzer and Falkner). It has also been shown that a foreign gene inserted into the *tk* gene of D4R deficient vaccinia continues to be expressed at high levels, even in the absence of D4R complementation (M. Himly, M. Pfeleiderer, G. Holzer, U. Fischer, E. Hannak, F.G. Falkner, and F. Dörner. 1998 *Protein Expression and Purification* 14: 317-326). The replication deficient D4R strain is, therefore, well-suited for selection of viral recombinants that depend on continued active expression of some host genes for their physiological effect.

To implement this strategy for selection of specific recombinants from representative cDNA libraries constructed in a D4R deficient vaccinia strain the following cell lines and vectors are required:

1. D4R expressing complementing cell line is required for expansion of D4R deficient viral stocks.
2. The D4R gene must be deleted or inactivated in a viral strain suitable for trimolecular recombination.
3. Plasmid or viral constructs must be generated that express D4R under the control of different inducible promoters such as that which regulates expression of BAX or other genes induced following crosslinking of membrane immunoglobulin receptors on CH33 B lymphoma cells or the promoter for expression of type X collagen following induction of chondrocyte differentiation from C3H10T1/2 progenitor cells. Stable transfectants of these constructs in the relevant cell line are required to rescue specific recombinants. Alternatively, a helper virus expressing the relevant construct can be employed for inducible expression in either cell lines or primary cultures.

10.1 Construction of a D4R Complementing Cell Line A D4R complementing cell line is constructed as follows. First, the D4R orf (position 100732 to 101388 in vaccinia genome) is cloned from vaccinia strain v7.5/tk by PCR amplification using the following primers:

D4R-sense, 5' AAAGAATTCA TAATGAATTC
AGTGACTGTA TCACACG 3', designated
herein as SEQ ID NO:104;
and D4R-antisense: 5' CTTGGATCCT
TAATAAATAA ACCCTTGAGC CC 3',
designated herein as SEQ ID NO:105.

The sense primer is modified to include an EcoRI site, and the anti-sense primer is modified to include a BamHI site (both underlined). Following standard PCR amplification and digestion with EcoRI and BamHI, the resulting D4R orf is cloned into the EcoRI and BamHI sites of pIRESneo (available from Clontech,

Palo Alto, CA). This mammalian expression vector contains the strong CMV immediate early promoter/enhancer and the ECMV internal ribosome entry site (IRES). The D4R/IRESneo construct is transfected into BSC1 cells and transfected clones are selected with G418. The IRES allows for efficient translation of a polycistronic mRNA that contains the D4Rorf at the 5' end, and the neomycin phosphotransferase gene at the 3' end. This results in a high frequency of G418 resistant clones being functional (the clones express D4R). Transfected clones are tested by northern blot analysis using the D4R gene as probe in order to identify clones that express high levels of D4R mRNA. BSC1 cells that express D4R (BSC1.D4R) are able to complement D4R deficient vaccinia, allowing for generation and propagation of D4R defective viruses.

10.2. Construction of D4R Deficient vaccinia vector A D4R-deficient vaccinia virus, suitable for trimolecular recombination as described in Example 5, *supra*, is constructed by disruption of the D4R orf (position 100732 to 101388 in vaccinia genome) through the insertion of an *E.Coli GusA* expression cassette into a 300-bp deletion, by the following method.

In order to insert the *GusA* gene, regions flanking the insertion site are amplified from vaccinia virus as follows. The left flanking region is amplified with the following primers:

D4R left flank sense: 5' AATAAGCTTT
ACTCCAGATA ATATGGA 3', designated
herein as SEQ ID NO:106; and

D4R left flank antisense: 5' AATCTGCAGC
CCAGTTCCAT TTT 3', designated herein as
SEQ ID NO:107.

These primers amplify a region extending from position 100167 to position 100960 of the vaccinia genome, and have been modified to include a HindIII (Sense) and PstI (Antisense) site for cloning (both underlined). The resulting PCR product is digested with HindIII and PstI, and cloned into the HindIII and PstI sites of pBS (available from Stratagene), generating pBS.D4R.LF. The right flanking region is amplified with the following primers: D4R right flank sense:

5' AATGGATCCT CATCCAGCGG CTA 3', designated herein as SEQ ID NO:108; and

D4R right flank antisense: 5' AATGAGCTCT
AGTACCTACA ACCCGAA 3', designated
herein as SEQ ID NO:109.

These primers amplify a region extending from position 101271 to position 101975 of the vaccinia genome, and have been modified to include a BamHI (Sense) and SacI (Antisense) site for cloning (both underlined). The resulting PCR product is digested with BamHI and SacI, and cloned into the BamHI and SacI sites of pBS.D4R.LF, creating pBS.D4R.LF/RF.

An expression cassette comprising the GusA coding region operably associated with a poxvirus synthetic early/late (E/L) promoter, is inserted into pBS.D4R.LF/RF by the following method. The E/L promoter- *Gus* cassette is derived from the pEL/tk-Gus construct described in Merchlinsky, M., *et al.*, *Virology* 238: 444-451 (1997). The NotI site immediately upstream of the *Gus* ATG start codon is removed by digestion of pEL/tk-Gus with NotI, followed by a fill in reaction with Klenow fragment and religation to itself, creating pEL/tk-Gus(NotI-). The E/L-Gus expression cassette is isolated from pEL/tk-Gus(NotI-) by standard PCR using the following primers:

EL-Gus sense: 5' AAAGTCGACG
GCCAAAAATT GAAATTTT 3', designated
herein as SEQ ID NO:110; and

EL-Gus antisense: 5' AATGGATCCT
CATGTGTTGC CTCCC 3', designated herein as
SEQ ID NO:111.

The EL-Gus sense primer contains a SalI site and the EL-Gus antisense primer contains a BamHI site (both underlined). Following PCR amplification the EL-Gus cassette is digested with SalI and BamHI and inserted into the SalI and BamHI sites in pBS.D4R.LF/RF generating pBS.D4R-/ELGus. This transfer plasmid contains an EL-Gus expression cassette flanked on both sides by D4R sequence. There is also a 300bp deletion engineered into the D4R orf.

D4R⁺/Gus⁺ vaccinia viruses suitable for trimolecular recombination are generated by conventional homologous recombination following transfection of the pBS.D4R/ELGus construct into v7.5/tk-infected BSC1.D4R cells. D4R⁺/Gus⁺ virus are isolated by plaque purification on BSC1.D4R cells and staining with X-Glu (M.W. Carroll, B. Moss. 1995. *Biotechniques* 19: 352-355). This new strain is designated v7.5/tk/Gus/D4R.

DNA purified from v7.5/tk/Gus/D4R is used to construct representative vaccinia cDNA libraries by trimolecular recombination according to the method described in Example 5, except that the reactions are carried out in the BSC1.D4R complementing cell line.

10.3. Preparation of host cells expressing D4R under the control of inducible promoters. Host cells which express the D4R gene upon induction of an inducible promoter are prepared as follows. Plasmid constructs are generated that express the vaccinia D4R gene under the control of an inducible promoter. Examples of inducible promoters include, but are not limited to, promoters which are upregulated following crosslinking of membrane immunoglobulin on CH33 cells (for antibody selection), *e.g.*, the BAX promoter as described in Examples 2 and 3. The vaccinia D4R orf is amplified by PCR using primers D4R sense and D4R antisense described above in section 10.1. These PCR primers are modified as needed to include desirable restriction endonuclease sites. The D4R orf is then cloned in a suitable eukaryotic expression vector (which allows for the selection of stably transformed cells) in operable association of any desired promoter employing methods known to those skilled in the art.

The construct is then transfected into a suitable host cell, for example, the for selection of antibodies as described in Examples 2 and 3, the D4R gene, in operable association with the BAX promoter, is stably transfected into a suitable cell line, for example, a CH33 cell line, a CH 31 cell line, or a WEHI-231 cell line. The resulting host cells are utilized in the production of antibodies, essentially as described in Example 3, using libraries prepared in v7.5/tk/Gus/D4R. Antigen-induced cross-linking of membrane-expressed immunoglobulin molecules on the surface of host cells results in the induction of

expression of the D4R gene product in the cross-linked cells. Expression of D4R complements the defect in the v7.5/tk/Gus/D4R genomes in which the libraries are produced, allowing the production of infectious virus particles.

5

EXAMPLE 11

Attenuation of Poxvirus Mediated Host Shut-off by Reversible Inhibitor of DNA Synthesis

As discussed *infra*, attenuated or defective virus is sometimes desired to reduce cytopathic effects. Cytopathic effects during viral infection might interfere with selection and identification of immunoglobulin molecules using methods which take advantage of host cell death (*e.g.* apoptosis induced by cross-linking). Such effects can be attenuated with a reversible inhibitor of DNA synthesis such as hydroxyurea (HU) (Pogo, B.G. and S. Dales Virology, 1971, 43(1):144-51). HU inhibits both cell and viral DNA synthesis by depriving replication complexes of deoxyribonucleotide precursors (Hendricks, S.P. and C.K. Mathews J Biol Chem, 1998, 273(45):29519-23). Inhibition of viral DNA replication blocks late viral RNA transcription while allowing transcription and translation of genes under the control of early vaccinia promoters (Nagaya, A., B.G. Pogo, and S. Dales Virology, 1970, 40(4):1039-51). Thus, treatment with reversible inhibitor of DNA synthesis such as HU allows the detection of effects of cross-linking. Following appropriate incubation, HU inhibition can be reversed by washing the host cells so that the viral replication cycle continues and infectious recombinants can be recovered (Pogo, B.G. and S. Dales Virology, 1971, 43(1):144-51).

The results in Figure 9 demonstrate that induction of type X collagen synthesis, a marker of chondrocyte differentiation, in C3H10T 1/2 progenitor cells treated with BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) is blocked by vaccinia infection but that its synthesis can be rescued by HU mediated inhibition of viral DNA synthesis. When HU is removed from cultures by washing with fresh medium, viral DNA synthesis and assembly of infectious particles proceeds

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-149-

rapidly so that infectious viral particles can be isolated as soon as 2 hrs post-wash.

C3H10T 1/2 cells were infected with WR vaccinia virus at MOI=1 and 1 hour later either medium or 400 ng/ml of BMP-2 in the presence or absence of 2 mM HU was added. After a further 21 hour incubation at 37°C, HU was removed by washing with fresh medium. The infectious cycle was allowed to continue for another 2 hours to allow for initiation of viral DNA replication and assembly of infectious particles. At 24 hours RNA was extracted from cells maintained under the 4 different culture conditions. Northern analysis was carried out using a type X collagen specific probe. The uninduced C3H10T1/2 cells have a mesenchymal progenitor cell phenotype and as such do not express type X collagen (first lane from left). Addition of BMP-2 to normal, uninfected C3H10T 1/2 cells induces differentiation into mature chondrocytes and expression of type X collagen (compare first and second lanes from left), whereas addition of BMP-2 to vaccinia infected C3H10T 1/2 cells fails to induce synthesis of type X collagen (third lane from left). In the presence of 2mM HU, BMP-2 induces type X collagen synthesis even in vaccinia virus infected C3H10T 1/2 cells (fourth lane from left).

This strategy for attenuating viral cytopathic effects is applicable to other viruses, other cell types and to selection of immunoglobulin molecules that, for example, induce apoptosis upon cross-linking.

EXAMPLE 12

Construction of Human Fab Fragment Libraries of Diverse Specificity

Libraries of polynucleotides encoding fully human, diverse immunoglobulin Fab fragments are produced as follows. These Fab fragments comprise a heavy chain variable region linked to a first constant region domain (VH-CH1) paired with an immunoglobulin light chain. Genes for human VH (variable region of heavy chain), VK (variable region of kappa light chain) and

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-150-

VL (variable region of lambda light chains) are amplified by PCR. For each of the three variable gene families, both a recombinant plasmid library and a vaccinia virus library is constructed. The variable region genes are inserted into a p7.5/tk-based transfer/expression plasmid immediately upstream of a constant region sequence corresponding to the CH1 domain of heavy chains or the kappa light chain constant region, CK. These plasmids are employed to generate the corresponding vaccinia virus recombinants by trimolecular recombination and can also be used directly for high level expression of Fab fragments following transfection of one immunoglobulin chain or fragment thereof into cells infected with vaccinia virus recombinants of a second immunoglobulin chain or fragment thereof. The two chains are synthesized and assembled to form an Fab fragment. These Fab fragments may be membrane bound or secreted by attaching coding sequences for signal sequences, transmembrane domains, and/or intracellular domains, as is understood by one of ordinary skill in the art.

12.1 pVHEc. An expression vector which encodes a human heavy chain fragment comprising VH and the CH1 domain of C μ , designated pVHEc, is constructed as follows. Plasmid p7.5/tk2 is produced as described in Example 1.1, *supra*. A DNA construct encoding amino acids 109-113 of VH and the CH1 domain, *i.e.*, amino acids 109-223B of C μ , is amplified from the IgM heavy chain gene isolated as described in Example 1, and is modified by PCR to include a BstEII site at the 5' end of the region encoding amino acids 109-113+ the C μ CH1 domain, and a stop codon and a SalI site at its 3' end. This DNA is inserted into p7.5/tk2 between the BstEII and SalI sites to generate pVHEc. Heavy chain variable region (VH) PCR products (amino acids (-4) to(110)), produced as described in Example 1.4(a), using the primers listed in Tables 1 and 2, are cloned into BssHII and BstEII sites. Because of the overlap between the CH1 domain sequence and the restriction enzyme sites selected, this results in construction of a contiguous heavy chain fragment which lacks a functional signal peptide but remains in the correct translational reading frame.

12.2 pVKEc and pVLEc. Expression vectors encoding the human κ and λ immunoglobulin light chain constant regions, designated herein as pVKEc and

pVLEc, are constructed as follows. Plasmid p7.5/tk3.1, is produced as described in Example 1.3, *supra*.

(a) Plasmid p7.5/tk3.1 is converted into pVKEc by the following method. A cDNA coding for the C_{κ} region is isolated as described in Example 1, with primers to include an XhoI site at the 5' end of the region encoding amino acids 104-107+ C_{κ} , and a stop codon and a SalI site at its 3' end, which is then cloned into p7.5/tk3.1 at XhoI and SalI sites to generate pVKEc. Kappa light chain variable region (VK) PCR products (amino acids(-3) to(105)), produced as described in Example 1.4(b), using the primers listed in Tables 1 and 2, are then cloned into pVKEc at the ApaLI and XhoI sites. Because of the overlap between the κ light chain sequence and the restriction enzyme sites selected, this results in construction of contiguous κ light chains which lacks a functional signal peptide but remains in the correct translational reading frame.

(b) Plasmid p7.5/tk3.1 is converted into pVLEc by the following method. A cDNA coding for the C_{λ} region is isolated as described in Example 1, with primers to include a HindIII site and amino acids 105 to 107 of V_{λ} at its 5' end and a stop codon and a SalI site at its 3' end, which is then cloned into p7.5/tk3 at HindIII and SalI sites to generate pVLEc. Lambda light chain variable region (VL) PCR products (amino acids(-3) to(104)), produced as described in Example 1.4(c), using the primers listed in Tables 1 and 2, are then cloned into pVLEc at ApaLI and HindIII sites. Because of the overlap between the λ light chain sequence and the restriction enzyme sites selected, this results in construction of contiguous λ light chains which lacks a functional signal peptide but remains in the correct translational reading frame.

12.3 Secreted or Membrane Bound Forms of Fab. The expression vectors (pVHEc, pVKEc and pVLEc) serve as prototype vectors into which secretion signals, transmembrane domains, cytoplasmic domains, or combinations thereof can be cloned to target Fab to the cell surface or the extracellular space. These signals and domains, examples of which are shown in Table 7, may be inserted either in the N-terminus of Fab between NcoI and BssHII of pVHEc (or NcoI and ApaLI of pVKEc and pVLEc) and/or in the C-terminus at SalI site. To target an

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-152-

Fab for secretion into the extracellular compartment, a signal peptide is inserted at the N-terminus of either or both Fab chains, VH-CH1 or light chain. To anchor an Fab in the plasma membrane for extracellular presentation, a transmembrane domain is added to the carboxyl-terminus of VH-CH1 chain and/or to the light chain. A cytoplasmic domain may also be added.

Table 7. Localization signals			
Signal sequence	Terminus	Location	Protein
MGWSCILFLVATATGAHS (SEQ ID NO:146)	N	ES	IgG1
NLWTTASTFIVLFLLSLFYSTTVTLF (SEQ ID NO:147)	C/N	PM	IgM

Abbreviations for items under Location: ES, extracellular space; PM, plasma membrane.

EXAMPLE 13

Construction of Human Single-Chain-Fv (ScFv) Antibody Libraries.

13.1 Human scFv expression vectors p7.5/tk3.2 and p7.5/tk3.3 are constructed by the following method, as illustrated in Figure 10. Plasmid p7.5/tk3 is produced as described in Example 1.3, *supra*. Plasmid p7.5/tk3 is converted to p7.5/tk3.1 by changing the four nucleotides ATAC between NcoI and ApaLI sites into ATAGC, so that the ATG start codon in NcoI is in-frame with ApaLI without the inserted signal peptide. This is conveniently accomplished by replacing the NotI-to-SalI cassette described in Example 1.3 (SEQ ID NO:29) with a cassette having the sequence 5'-GCGGCCGCCC ATGGATAGCG TGCACCTTGAC TCGAGAAGCT TAGTAGTCGA C-3', referred to herein as SEQ ID NO:112.

Plasmid p7.5/tk3.1 is converted to p7.5/tk3.2 by substituting the region between XhoI and SalI (*i.e.*, nucleotides 30 to 51 of SEQ ID NO:112), referred to herein as SEQ ID NO:113, with the following cassette: XhoI-(nucleotides encoding amino acids 106-107 of V κ)-(nucleotides encoding a 10 amino acid linker)-G-BssHII-ATGC-BstEII-(nucleotides encoding amino acids 111-113 of VH)-stop codon-SalI. This is accomplished by digesting p7.5/tk3.1 with XhoI and SalI, and inserting a cassette having the sequence 5'CTCGAGAT CAAAGAGGGT AAATCTTCCG GATCTGGTTC CGAAGGCGCG CATGCGGTCA CCGTCTCCTC ATGAGTCGAC 3', referred to herein as SEQ ID NO:114. The linker between V κ and VH will have a final size of 14 amino acids, with the last 4 amino acids contributed by the VH PCR products, inserted as described below. The sequence of the linker is 5'GAG GGT AAA TCT TCC GGA TCT GGT TCC GAA GGC GCG CAC TCC 3' (SEQ ID NO:115), which encodes amino acids EGKSSGSGSEGAHS (SEQ ID NO:116).

Plasmid p7.5/tk3.1 is converted to p7.5/tk3.3 by substituting the region between HindIII and SalI (*i.e.*, nucleotide 36 to 51 of SEQ ID NO: 112), referred to herein as SEQ ID NO:117, with the following cassette: HindIII-(nucleotides encoding amino acid residues 105-107 of V λ)-(nucleotides encoding a 10 amino acid linker)-G-BssHII-ATGC-BstEII-(nucleotides encoding amino acids 111-113 of VH)-stop codon-SalI. This is accomplished by digesting p7.5/tk3.1 with HindIII and SalI, and inserting a cassette having the sequence 5'AAGCTTACCG TCCTAGAGGG TAAATCTTCC GGATCTGGTTC CGAAGGCGCG CATGCGGTCA CCGTCTCCTC ATGAGTCGAC 3' (SEQ ID NO:118). The linker between V λ and VH will have a final size of 14 amino acids, with the last 4 amino acids contributed by the VH PCR products, inserted as described below. The sequence of the linker is 5'GAG GGT AAA TCT TCC GGA TCT GGT TCC GAA GGC GCG CAC TCC 3' (SEQ ID NO:119), which encodes amino acids EGKSSGSGSEGAHS (SEQ ID NO:120).

13.2 Cytosolic Forms of scFv. Expression vectors encoding scFv polypeptides comprising human κ or λ immunoglobulin light chain variable

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-154-

regions, fused in frame with human heavy chain variable regions, are constructed as follows.

(a) Cytosolic V κ VH scFv expression products are prepared as follows. Kappa light chain variable region (V κ) PCR products (amino acids(-3) to(105)), produced as described in Example 1.4(b), using the primers listed in Tables 1 and 2, are cloned into p7.5/tk3.2 between the ApaI and XhoI sites. Because of the overlap between the κ light chain sequence and the restriction enzyme sites selected, this results in construction of a contiguous κ light chain in the same translational reading frame as the downstream linker. Heavy chain variable region (VH) PCR products (amino acids (-4) to(110)), produced as described in Example 1.4(a), using the primers listed in Tables 1 and 2, are cloned between the BssHII and BstEII sites of p7.5/tk3.2 to form complete scFv open reading frames. The resulting products are cytosolic forms of V κ -VH fusion proteins connected by a linker of 14 amino acids. The scFv is also preceded by 6 extra amino acids at the amino terminus encoded by the restriction sites and part of the V κ signal peptide.

(b) Cytosolic V λ VH scFv expression products are prepared as follows. Lambda light chain variable region (V λ) PCR products (amino acids(-3) to(104)), produced as described in Example 1.4(c), using the primers listed in Tables 1 and 2, are cloned into p7.5/tk3.3 between the ApaI and HindIII sites. Because of the overlap between the λ light chain sequence and the restriction enzyme sites selected, this results in construction of a contiguous λ light chain in the same translational reading frame as the downstream linker. Heavy chain variable region (VH) PCR products (amino acids (-4) to(110)), produced as described in Example 1.4(a), using the primers listed in Tables 1 and 2, are cloned between BssHII and BstEII sites of p7.5/tk3.3 to form complete scFv open reading frames. The resulting products are cytosolic forms of V λ -VH fusion proteins connected by a linker of 14 amino acids. The scFv is also preceded by 6 extra amino acids at the amino terminus encoded by the restriction sites and part of the V λ signal peptide.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-155-

13.3 Secreted or Membrane Bound Forms of scFv. The cytosolic scFv expression vectors described in section 13.2 serve as the prototype vectors into which secretion signals, transmembrane domains, cytoplasmic domains, or combinations thereof can be cloned to target scFv polypeptides to the cell surface or the extracellular space. Examples of signal peptides and membrane anchoring domains are shown in Table 7, *supra*. To generate scFv polypeptides to be secreted into the extracellular space, a cassette encoding an in-frame secretory signal peptide is inserted so as to be expressed in the N-terminus of scFv polypeptides between the NcoI and ApaLI sites of p7.5/tk3.2 or p7.5/tk3.3. To generate membrane-bound scFv for Ig-crosslinking or Ig-binding based selection, in addition to the signal peptide, a cassette encoding the membrane-bound form of Cμ is cloned into the C-terminus of scFv between the BstEII and SalI sites, downstream of and in-frame with the nucleotides encoding amino acids 111-113 of VH. A cytoplasmic domain may also be added.

EXAMPLE 14

Construction of Camelized Human Single-Domain Antibody Libraries

Camelid species use only heavy chains to generate antibodies, which are termed heavy chain antibodies. The poxvirus expression system is amendable to generate both secreted and membrane-bound human single-domain libraries, wherein the human V_H domain is "camelized," *i.e.*, is altered to resemble the V_HH domain of a camelid antibody, which can then be selected based on either functional assays or Ig-crosslinking/binding. Human V_H genes are camelized by standard mutagenesis methods to more closely resemble camelid V_HH genes. For example, human V_H3 genes, produced using the methods described in Example 1.4 using appropriate primer pairs selected from Tables 1 and 2, is camelized by substituting G44 with E, L45 with R, and W47 with G or I. See, *e.g.*, Riechmann, L., and Muyldermans, S. J. *Immunol. Meth.* 231:25-38. To generate a secreted single-domain antibody library, cassettes encoding camelized human V_H genes

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-156-

are cloned into pVHEs, produced as described in Example 1.2, to be expressed in-frame between the BssHII and BstEII sites. To generate a membrane-bound single-domain antibody library, cassettes encoding camelized human V_H genes are cloned into pVHE, produced as described in Example 1.1, to be expressed in-frame between the BssHII and BstEII sites. Vectors pVHE and pVHEs already have the signal peptide cloned in between the NcoI and BssHII sites. Amino acid residues in the three CDR regions of the camelized human V_H genes are subjected to extensive randomization, and the resulting libraries can be selected in poxviruses as described herein.

EXAMPLE 15

Selection of Fc-modified antibodies for enhanced immune effector functions

Human monoclonal antibodies are being used in therapeutic applications for treatment of an increasing number of human diseases. Human antibodies may induce or block signaling through specific cell receptors. In some applications, human antibodies may activate any of a variety of accessory effector cells through an interaction between the Fc portion of the antibody molecule and a matching Fc receptor (FcR) on these effector cells. It is, therefore, of considerable interest to identify modifications of immunoglobulin heavy chain constant region sequences that enhance or inhibit binding and signaling through FcR or binding and activation of other mediators of immune effector functions such as components of the complement cascade. See, e.g., U.S. Patent No. 5,624,821; Xu, D., *et al.*, *Cell Immunol* 200:16-26 (2000); and U.S. Patent No. 6,194,551, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entireties.

One such specific effector function is antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), a process in which antibody-coated target cells are destroyed by NK cells or other monocytes. ADCC is mediated by antibody molecules with variable region encoded specificity for a surface molecule of a target cell and constant region encoded specificity for FcγRIII on the NK cell. Through analysis

of crystal structures and site-directed mutagenesis, it has been determined that the FcγRIII binding site on human IgG1 is localized mainly to the lower hinge, *i.e.*, about amino acids 247-252 of IgG1, and the adjacent CH2 regions. See, *e.g.*, Sarmay G., *et al.*, *Mol Immunol* 29:633-639 (1992); and Michaelsen, T.E., *et al.*, *Mol Immunol* 29:319-26 (1992). By constructing a library of genes encoding antibody molecules with randomly mutated lower hinge regions in a selectable mammalian expression vector, it would be feasible to select specific constant region variants with enhanced function for ADCC. To simplify execution of this strategy, a library is constructed with defined immunoglobulin variable region sequences that confer a desired specificity.

15.1. Construction of pVHE-X and pVKE-X or pVLE-X. Plasmid pVHE-X, a human VH expression vector with a defined variable region, designated herein as X, is constructed as follows. The construction is illustrated in Figure 11. An antibody with a defined specificity X is isolated by conventional methods, or is produced and selected in eukaryotic cells using poxvirus vectors, by methods described herein. If necessary, the VH gene of the antibody is subcloned into pVHE, produced as described in Example 1.1, between the BssHII/BstEII sites, resulting in plasmid pVHE-X. Also if necessary, the VK or VL gene of the antibody is subcloned either into pVKE, produced as described in Example 1.3, at the ApaLI/XhoI sites to produce pVKE-X, or into pVLE, produced as described in Example 1.3, at ApaLI/HindIII sites, to produce pVLE-X, respectively.

15.2 Isolation of a human Cγ1 cassette. A cDNA coding for the human Cγ1 heavy chain is isolated from bone marrow RNA using SMART™ RACE cDNA Amplification Kit, using the following primers:

huCγ1-5B: 5'ATTAGGATCCGGTCACCGTC TCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:121)

huCγ1-3S: 5'ATTAGTCGACTCATTACCCGGAGACAGGGAGAG 3' (SEQ ID NO:122)

The PCR product comprises the following elements: BamHI-BstEII-
(nucleotides encoding amino acids 111-113 of VH)-(nucleotides encoding amino
acids 114-478 of C γ 1)-TGA-SalI. This product is subcloned into
pBluescriptII/KS at BamHI and SalI sites, and a second BstEII site corresponding
to amino acids 191 and 192 within the CH1 domain of C γ 1 is removed by site-
directed mutagenesis without change to the amino acid sequence.

15.3 Construction of Fc γ 1 library. C γ 1 variants are generated by
overlap PCR by the following method. The BstEII-mutagenized C γ 1 cassette,
produced as described in section 15.2, is used as the template. In the first round
of PCR, amplifications are carried out in two separate reactions using C γ 1-
sense/C γ 1-internal-R and C γ 1-internal-S/C γ 1-reverse primer sets.

C γ 1-sense: 5' AATATGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:123)

C γ 1-internal-R: 5' (MNN)₆ TTCAGGTGCTGGGCACGG 3' (SEQ ID NO:124)

C γ 1-internal-S: 5' (NNK)₆ GTCTTCCTCTTCCCCCA 3' (SEQ ID NO:125)

C γ 1-reverse: 5' AATATGTCGACTCATTTACCCGG 3' (SEQ ID NO:126)

(M=A+C, K=G+T, N=A+T+G+C)

The C γ 1-internal-R and C γ 1-internal-S primers have degenerate sequence
tails that code for variants of the six amino acids comprising residues
247-252 in the lower hinge. In the second round of PCR, the purified
products from the first round are fused by overlap PCR using the C γ 1-
sense and C γ 1-reverse primers.

The resulting products are approximately 1000 bp in size, and randomly
encode all 20 amino acids in each of the six amino acid positions 247-252. The
PCR products are digested with BstEII and SalI, and are cloned into BstEII/SalI-
digested pVHE-X, produced as described in section 15.1, to generate a library of
pVHE-X- γ 1 variants. These variants are then introduced into vaccinia virus using
trimolecular recombination as described in Example 5. In conjunction with the
recombinant vaccinia virus harboring the light chain, the Fc γ 1 library will be used

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-159-

to select those Fc variants that confer enhanced ADCC activity on a VHE-X- γ 1 expressing antibody.

15.4 Other applications. In addition the generation of variants at amino acids 247-252, other residues, such as amino acids 278-282 and amino acids 346-351 of IgG1, are also involved in binding to Fc γ RIII. Following the identification of Fc γ I variant in amino acids 247-252 that exhibits an enhanced ADCC activity, the same strategy can be employed to identify additional mutations in the other two regions that exhibit synergistic enhancement of ADCC function.

The same principle/technique can be applied to identifying variants that confer enhanced effector function on other immunoglobulin heavy chain constant region isotypes that bind to different Fc receptors. In preferred embodiments the receptors to be targeted include Fc γ RI (CD64), Fc γ RII-A (CD32), Fc γ RII-B1, Fc γ RII-B2, Fc γ RIII (CD16), and Fc ϵ RI. In other preferred embodiments, variants may be selected that enhance binding of complement components to the Fc region or Fc mediated binding to placental membrane for transplacental transport.

EXAMPLE 16

Construction of heavy chain fusion proteins to facilitate selection of cells infected with specific immunoglobulin gene recombinant vaccinia virus

16.1 Construction of CH1-Fas. An expression vector which encodes a fusion protein comprising the human heavy chain CH1 domain of C μ , fused to the transmembrane and death domains of Fas, designated herein as CH1-Fas, is constructed by the following method. The fusion protein is illustrated in Fig. 13(a).

Plasmid pVHE, produced as described in Example 1.1, is digested with BstEII and SalI and the smaller DNA fragment of about 1.4 Kb is gel purified. This smaller fragment is then used as a template in a PCR reaction using forward primer CH1(F) – 5'ACACGGTCAC CGTCTCCTCA GGGAGTGC 3' (SEQ ID

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-160-

NO:127) and reverse primer CH1(R) 5'AGTTAGATCT GGATCCTGGA AGAGGCACGT T 3' (SEQ ID NO:128). The resulting PCR product of about 320 base pairs is gel purified.

A DNA fragment comprising the transmembrane and death domains of Fas is amplified from plasmid pBS-APO14.2 with forward primer FAS(F) 5' AACGTGCCTC TTCCAGGATC CAGATCTAAC 3' (SEQ ID NO:129) and reverse primer FAS(R) 5'ACGCGTCGAC CTAGACCAAG CTTTGGATTT CAT 3'(SEQ ID NO:130). The resulting PCR product of about 504 base pairs is gel purified.

The resulting 320 and 504-base pair fragments are then combined in a PCR using forward primer CH1(F) and reverse primer FAS (R), to produce a fusion fragment of about 824 base pairs. This fragment is digested with BstEII and SalI, and the resulting 810-base pair fragment is gel purified. Plasmid pVHE also digested with BstEII and SalI, and the larger resulting fragment of about 5.7 Kb is gel purified. These two BstEII/SalI fragments are then ligated to produce CH1-Fas.

16.2 Construction of CH4-Fas. An expression vector which encodes a fusion protein comprising the human heavy chain CH1-CH4 domains of C μ , fused to the transmembrane and death domains of Fas, designated herein as CH4-Fas, is constructed by the following method. The fusion protein is illustrated in Fig. 13(b).

Plasmid pVHE, produced as described in Example 1.1, is digested with BstEII and SalI and the smaller DNA fragment of about 1.4 Kb is gel purified. This smaller fragment is then used as a template in a PCR reaction using forward primer CH4(F) 5'CTCTCCGCG GACGTCTTCG T 3' (SEQ ID NO:131) and reverse primer CH4(R) 5'AGTTAGATCT GGATCCCTCA AAGCCCTCCT C 3' (SEQ ID NO:132). The resulting PCR product of about 268 base pairs is gel purified.

A DNA fragment comprising the transmembrane and death domains of Fas is amplified from plasmid pBS-APO14.2 with forward primer FAS(F2)-

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-161-

5'GAGGAGGGCTTTGAGGGATCAGATCTAAC 3' (SEQ ID NO:133) and reverse primer FAS(R), as shown in section 16.1. The resulting PCR product of about 504 base pairs is gel purified.

The resulting 268 and 504-base pair fragments are then combined in a PCR using forward primer CH4(F) and reverse primer FAS (R), to produce a fusion fragment of about 765 base pairs. This fragment is digested with SacII and SalI, and the resulting 750-base pair fragment is gel purified. Plasmid pVHE also digested with SacII and SalI, and the larger resulting fragment of about 6.8 Kb is gel purified. These two SacII/SalI fragments are then ligated to produce CH4-Fas.

16.3 Construction of CH4(TM)-Fas. An expression vector which encodes a fusion protein comprising the human heavy chain CH1-CH4 domains and the transmembrane domain of C μ , fused to the death domain of Fas, designated herein as CH4(TM)-Fas, is constructed by the following method. The fusion protein is illustrated in Fig. 13(c).

Plasmid pVHE, produced as described in Example 1.1, is digested with BstEII and SalI and the smaller DNA fragment of about 1.4 Kb is gel purified. This smaller fragment is then used as a template in a PCR reaction using forward primer CH4(F) as shown in section 16.2, and reverse primer CH4(R2) 5'AATAGTGGTGATATATTTCACTTGAACAA 3' (SEQ ID NO:134). The resulting PCR product of about 356 base pairs is gel purified.

A DNA fragment comprising the death domains of Fas is amplified from plasmid pBS-APO14.2 with forward primer FAS(F3)- 5'TTGTCAAGGTGAAAGTGAA GAGAAAGGAA 3' (SEQ ID NO:135) and reverse primer FAS(R), as shown in section 16.1. The resulting PCR product of about 440 base pairs is gel purified.

The resulting 356 and 440-base pair fragments are then combined in a PCR using forward primer CH4(F) and reverse primer FAS (R), to produce a fusion fragment of about 795 base pairs. This fragment is digested with SacII and SalI, and the resulting 780-base pair fragment is gel purified. Plasmid pVHE also

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-162-

digested with SacII and SalI, and the larger resulting fragment of about 6.8 Kb is gel purified. These two SacII/SalI fragments are then ligated to produce CH4(TM)-Fas.

5 16.4 Cloning and insertion of diverse VH genes into the Ig-Fas fusion proteins. Heavy chain variable region (VH) PCR products (amino acids (-4) to(110)), produced as described in Example 1.4(a), using the primers listed in Tables 1 and 2, are cloned into BssHII and BstEII sites of CH1-Fas, CH4-Fas and CH4(TM)-Fas. Because of the overlap between the CH1 domain sequence and the restriction enzyme sites selected, this results in construction of a contiguous heavy chain fragment which lacks a functional signal peptide but remains in the correct translational reading frame.

10

EXAMPLE 17

Generation of Ig α and Ig β -expressing HeLaS3 and COS7 cell lines

15

In order to express specific human monoclonal antibodies on the cell surface, heavy and light chain immunoglobulins must physically associate with other proteins in the B cell receptor complex. Therefore, in order for host cells to be able to express the human antibody library they must be able to express the molecules and structures that are necessary for the efficient synthesis and assembly of antibodies into membrane-bound receptors. Mouse lymphoma cells express the molecules and structures that are necessary for the expression of specific human antibodies on the cell surface. However, one disadvantage of using lymphoma cells for human antibody library expression is that endogenously expressed immunoglobulin heavy and/or light chains can co-assemble with transgenic immunoglobulin chains, resulting in the formation of nonspecific heterogeneous molecules, which dilute antigen-specific receptors. Another disadvantage of using mouse lymphoma cells to express the human antibody library is that vaccinia virus replicates poorly in lymphocytic cell lines. Therefore, preferred cell types for the expression of specific human antibodies are

20

25

30

those which permit the generation of high titers of vaccinia virus and those that are not derived from the B cell lineage. Preferred cell types include HeLa cells, COS7 cells and BSC-1 cells.

The immunoglobulin heavy and light chains of the B cell receptor physically associate with the heterodimer of the Ig α and Ig β transmembrane proteins (Reth, M. 1992. Annu. Rev. Immunol. 10:97). This physical association is necessary for the efficient transport of membrane-bound immunoglobulin to the cell surface and for the transduction of signals through the B cell receptor (Venkitaraman, A.R. et al., 1991. Nature 352:777). However, it is unclear as to whether Ig α /Ig β heterodimers are necessary and sufficient for the expression of membrane-bound immunoglobulin in heterologous cell lines. Therefore, the cell surface expression of human antibodies on HeLaS3 and COS7 cells was evaluated following their transfection with human Ig α and Ig β cDNA.

17.1 Cloning the human Ig α and Ig β cDNA by PCR.

cDNA generated from the EBV-transformed human B cells was used as the template in the PCR reactions to amplify human Ig α and Ig β cDNA. Human Ig α cDNA was amplified with the following primers:

ig α 5' - 5'ATTAGAATTCATGCCTGGGGTCCAGGA3', designated herein as (SEQ ID NO:136); and

ig α 3' - 5'ATTAGGATCCTCACGGCTTCTCCAGCTG3', designated herein as (SEQ ID NO:137).

Human Ig β cDNA was amplified with the following primers:

ig β 5' - 5'ATTAGGATCCATGGCCAGGCTGGCGTTG3', designated herein as (SEQ ID NO:138); and

ig β 3' - 5'ATTACCAGCACACTGGTCACTCCTGGCCTGGGTG3', designated herein as (SEQ ID NO:139).

Products from Ig α PCR reaction were cloned into pIRESneo expression vector (Clontech) at EcoRI and BamHI sites, while those from Ig β PCR reaction

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-164-

were cloned into pIREShyg vector (Clontech) at BamHI and BstXI sites. The identities of the cloned Ig α and Ig β were confirmed by DNA sequencing.

17.2 Establishing Ig α and Ig β -expressing HeLaS3 and COS7 stable transfectants. HeLaS3 and COS7 cells (1×10^6 per well in a 6-well plate) were transfected with 0.5 to 1 μ g each of the purified pIRESneo-Ig α and pIREShyg-Ig β plasmid DNA using the LIPOFECTAMINE PLUS Reagent (Life technologies). Starting two days later, cells were selected with G418 (at 0.4 mg/ml) and hygromycin B (at 0.2 mg/ml) for about 2 weeks. Drug-resistant HeLaS3 colonies were directly isolated and COS7 transfectants were cloned by limiting dilution. The expression of Ig α and Ig β in each of these clones was then analyzed by RT-PCR, and the results from the representative clones were as shown in Figure 14.

EXAMPLE 18

Construction of a Diverse Library of High Affinity Human Antibodies

The current invention is the only available method for the construction of a diverse library of immunoglobulin genes in vaccinia or other pox viruses. The vaccinia vector can be designed to give high levels of membrane receptor expression to allow efficient binding to an antigen coated matrix. Alternatively, the recombinant immunoglobulin heavy chain genes can be engineered to induce apoptosis upon crosslinking of receptors by antigen. Since vaccinia virus can be readily and efficiently recovered even from cells undergoing programmed cell death, the unique properties of this system make it possible to rapidly select specific human antibody genes.

Optimal immunoglobulin heavy and light chains are selected sequentially, which maximizes diversity by screening all available heavy and light chain combinations. The sequential screening strategy is to at first select an optimal heavy chain from a small library of 10^5 H-chain recombinants in the presence of a small library of 10^4 diverse light chains. This optimized H-chain is then used

to select an optimized partner from a larger library of 10^6 to 10^7 recombinant L-chains. Once an optimal L-chain is selected, it is possible to go back and select a further optimized H-chain from a larger library of 10^6 to 10^7 recombinant H-chains. This reiteration is a boot-strap strategy that allows selection of a specific high-affinity antibody from as many as 10^{14} H₂L₂ combinations. In contrast, selection of single chain Fv in a phage library or of Fab comprised of separate VH-CH1 and VL-CL genes encoded on a single plasmid is a one step process limited by the practical size limit of a single phage library – perhaps 10^{11} phage particles.

Since it is not feasible to screen 10^{14} combinations of 10^7 H chains and 10^7 L chains, the selection of optimal H chains begins from a library of 10^5 H chain vaccinia recombinants in the presence of 10^4 L chains in a non-infectious vector. These combinations will mostly give rise to low affinity antibodies against a variety of epitopes and result in selection of *e.g.*, 1 to 100 different H chains. If 100 H chains are selected for a basic antibody, these can then be employed in a second cycle of selection with a larger library of 10^6 or 10^7 vaccinia recombinant L chains to pick 100 optimal L chain partners. The original H chains are then set aside and the 100 L chains are employed to select new, higher affinity H chains from a larger library of 10^6 or 10^7 H chains.

The strategy is a kind of in vitro affinity maturation. As is the case in normal immune responses, low affinity antibodies are initially selected and serve as the basis for selection of higher affinity progeny during repeated cycles of immunization. Whereas higher affinity clones may be derived through somatic mutation in vivo, this in vitro strategy achieves the same end by the re-association of immunoglobulin chains. In both cases, the partner of the improved immunoglobulin chain is the same as the partner in the original lower affinity antibody.

The basis of the strategy is leveraging the initial selection for a low affinity antibody. It is essential that a low affinity antibody be selected. The vaccinia-based method for sequential selection of H and L chains is well-suited to insure that an initial low affinity selection is successful because it has the

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-166-

avidity advantage that comes from expressing bivalent antibodies. In addition, the level of antibody expression can be regulated by employing different promoters in the vaccinia system. For example, the T7 polymerase system adapted to vaccinia gives high levels of expression relative to native vaccinia promoters. Initial rounds of selection can be based on a high level T7 expression system to insure selection of a low affinity "basic antibody" and later rounds of selection can be based on low level expression to drive selection of a higher affinity derivative.

An outline of a method of the current invention for the construction of a diverse library of immunoglobulin genes in vaccinia is as follows:

1. An immunoglobulin membrane associated heavy chain cDNA library is constructed from human lymphocytes in a *vaccinia* virus vector according to the methods described herein. Specially engineered cells, for example CH33 cells, mouse myeloma cells, and human EBV transformed cell lines or, preferably, HeLa cells and other non-lymphoid cells that do not produce a competing immunoglobulin chain and efficiently support vaccinia replication, are infected with the virus library at dilutions such than on average each cell is infected by one viral immunoglobulin heavy chain recombinant.

2. These same cells are also infected with psoralin inactivated immunoglobulin light chain recombinant vaccinia virus from an immunoglobulin light chain library constructed in the same vaccinia virus vector. Alternatively, the cells may be transfected with immunoglobulin light chain recombinants in a plasmid expression vector. In the population of cells as a whole, each heavy chain can be associated with any light chain.

3. The cells are incubated for a suitable period of time to allow optimal expression of fully assembled antibodies on the cell surface. When the host cell is not of lymphoid origin, the efficiency of membrane antibody expression is enhanced by employing host cells for example, HeLa or Cos

7 cells, that have been stably transfected with genes or cDNA expressing Ig α and Ig β proteins.

4a. The antigen of interest is bound to inert beads, which are then mixed with the library of antibody expressing cells. Cells that bind to antigen-coated beads are recovered and the associated immunoglobulin heavy chain recombinant virus is extracted.

4b. Alternatively, a fluorescence tag is linked, directly or indirectly, to the antigen of interest. Antibody expressing cells which bind the antigen are recovered by Fluorescence Activated Cell Sorting.

4c. Alternatively, host cells may be employed in which cross-linking of the antibody receptor with the antigen induces cell death. This may occur naturally in host cells that are immature cells of the B cell lineage or it may be a consequence of incorporation of a Fas encoded death domain at the carboxyl terminus of the immunoglobulin heavy chain constant region. The lysed cells are separated from the living cells and the recombinant viruses carrying the relevant immunoglobulin heavy chains are extracted.

5. The above cycle, steps 1-4, may be repeated multiple times, isolating recombinant virus each time and further enriching for heavy chains that contribute to optimal antigen binding.

6. Once specific antibody heavy chains have been selected, the entire procedure is repeated with an immunoglobulin light chain cDNA library constructed in the proprietary vaccinia vector in order to select the specific immunoglobulin light chains that contribute to optimal antigen binding. Sequential selection of heavy and light chains maximizes diversity by screening all available heavy and light chain combinations. The final MAb product is optimized by selection of a fully assembled bivalent antibody rather than a single chain Fv or monomeric Fab.

7. The MAb sequence is determined and specific binding verified through standard experimental techniques.

The final Mab product is optimized by selection of a fully assembled bivalent antibody rather than a single chain Fv. That is, selection is based on bivalent (H₂L₂) antibodies rather than scFv or Fab fragments. Synthesis and assembly of fully human, complete antibodies occurs in mammalian cells allowing immunoglobulin chains to undergo normal post-translational modification and assembly. Synthesis and assembly of complete antibodies would likely be very inefficient in bacterial cells and many specificities are lost due to failure of many antibodies to fold correctly in the abnormal physiological environment of a bacterial cell.

A relatively wide range of antibody epitope specificities can be selected, including the selection of specificities on the basis of functional activity. Specifically, antibodies can be selected on the basis of specific physiological effects on target cells (e.g., screening for inhibition of TNF-secretion by activated monocytes; induction of apoptosis; etc.) An outline of the method for screening for specific Mab on the basis of a functional assay is as follows:

1. An immunoglobulin heavy chain cDNA library in secretory form is constructed from naïve human lymphocytes in a *vaccinia* virus vector prepared according to the methods described herein. Multiple pools of, for example, about 100 to about 1000 recombinant viruses, are separately expanded and employed to infect producer cells at dilutions such that on average each cell is infected by one immunoglobulin heavy chain recombinant virus. These same cells are also infected with psoralin inactivated immunoglobulin light chain recombinant *vaccinia* virus from an immunoglobulin light chain library constructed in the same *vaccinia* virus vector. Alternatively, the infected cells may be transfected with immunoglobulin light chain recombinants in a plasmid expression vector. In the population of cells as a whole, each heavy chain can be associated with any light chain.

2. Infected cells are incubated for a time sufficient to allow secretion of fully assembled antibodies.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-169-

3. Assay wells are set up in which indicator cells of functional interest are incubated in the presence of aliquots of secreted antibody. These might, for example, include activated monocytes secreting TNF α . A simple ELISA assay for TNF α may then be employed to screen for any pool of antibodies that includes an activity that inhibits cytokine secretion.

4. Individual members of the selected pools are further analyzed to identify the relevant immunoglobulin heavy chain.

5. Once specific antibody heavy chains have been selected, the entire procedure is repeated with an immunoglobulin light chain cDNA library constructed in the proprietary *vaccinia* vector in order to select specific immunoglobulin light chains that contribute to optimal antigen binding.

6. The MAb sequences are identified and specific binding verified through standard experimental techniques. Because functional selection does not require *a priori* knowledge of the target membrane receptor, the selected Mab is both a potential therapeutic and a discovery tool to identify the relevant membrane receptor.

Selection occurs within human cell cultures following random association of immunoglobulin heavy and light chains. As noted above, this avoids repertoire restrictions due to limitations of synthesis in bacteria. It also avoids restrictions of the antibody repertoire due to tolerance to homologous gene products in mice. Mouse homologs of important human proteins are often 80% to 85% identical to the human sequence. It should be expected, therefore, that the mouse antibody response to a human protein would primarily focus on the 15% to 20% of epitopes that are different in man and mouse. This invention allows efficient selection of high affinity, fully human antibodies with a broad range of epitope specificities. The technology is applicable to a wide variety of projects and targets including functional selection of antibodies to previously unidentified membrane receptors with defined physiological significance.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-170-

5 The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described which are intended as single illustrations of individual aspects of the invention, and any constructs, viruses or enzymes which are functionally equivalent are within the scope of this invention. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying drawings. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

10 All publications and patent applications mentioned in this specification are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference. The disclosure and claims of U.S. Application No. 08/935,377, filed September 22, 1997 and U.S. Application No. 60/192,586, filed March 28, 2000 are herein incorporated by reference.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-171-

What Is Claimed Is:

1. A method of selecting polynucleotides which encode an antigen-specific immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, comprising:
- 5
- (a) introducing into a population of eukaryotic host cells capable of expressing said immunoglobulin molecule a first library of polynucleotides encoding, through operable association with a transcriptional control region, a plurality of first immunoglobulin subunit polypeptides, each first immunoglobulin subunit polypeptide comprising:
- 10
- (i) a first immunoglobulin constant region selected from the group consisting of a heavy chain constant region and a light chain constant region,
- (ii) an immunoglobulin variable region corresponding to said first constant region, and
- 15
- (iii) a signal peptide capable of directing cell surface expression or secretion of said first immunoglobulin subunit polypeptide;
- (b) introducing into said host cells a second library of polynucleotides encoding, through operable association with a transcriptional control region, a plurality of second immunoglobulin subunit polypeptides, each comprising:
- 20
- (i) a second immunoglobulin constant region selected from the group consisting of a heavy chain constant region and a light chain constant region, wherein said second immunoglobulin constant region is not the same as said first immunoglobulin constant region,
- 25
- (ii) an immunoglobulin variable region corresponding to said second constant region, and
- (iii) a signal peptide capable of directing cell surface expression or secretion of said second immunoglobulin subunit polypeptide,

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-172-

wherein said second immunoglobulin subunit polypeptide is capable of combining with said first immunoglobulin subunit polypeptide to form an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, attached to the membrane surface of said host cells;

5 (c) permitting expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, from said host cells;

(d) contacting said immunoglobulin molecules with an antigen; and

10 (e) recovering those polynucleotides of said first library which express immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, specific for said antigen.

2. The method of claim 1, further comprising:

15 (f) introducing said recovered polynucleotides into a population of host cells capable of expressing said immunoglobulin molecule;

(g) introducing into said host cells said second library of polynucleotides;

(h) permitting expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, from said host cells;

20 (i) contacting said host cells with said antigen; and

(j) recovering those polynucleotides of said first library which express immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, specific for said antigen.

25 3. The method of claim 2, further comprising repeating steps (f)-(j) one or more times, thereby enriching for polynucleotides of said first library which encode a first immunoglobulin subunit polypeptide which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, specifically binds said antigen.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-173-

4. The method of claim 1, further comprising isolating those polynucleotides recovered from said first library.

5. The method of claim 4, further comprising:

- 5 (k) introducing into a population of eukaryotic host cells capable of expressing said immunoglobulin molecule said second library of polynucleotides;
- (l) introducing into said host cells those polynucleotides isolated from said first library;
- 10 (m) permitting expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, from said host cells;
- (n) contacting said host cells with said specific antigen; and
- (o) recovering those polynucleotides of said second library which express immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof,
- 15 specific for said antigen.

6. The method of claim 5, further comprising:

- (p) introducing said recovered polynucleotides into a population of host cells capable of expressing said immunoglobulin molecule;
- 20 (q) introducing into said host cells those polynucleotides isolated from said first library;
- (r) permitting expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, from said host cells;
- (s) contacting said host cells with said antigen; and
- 25 (t) recovering those polynucleotides of said second library which express immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, specific for said antigen.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-174-

7. The method of claim 6, further comprising repeating steps (p)-(t) one or more times, thereby enriching for polynucleotides of said second library which encode a second immunoglobulin subunit polypeptide which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, specifically binds said antigen.

8. The method of claim 7, further comprising isolating those polynucleotides recovered from said second library.

9. The method of claim 1, wherein said immunoglobulin molecule is a human immunoglobulin molecule.

10. The method of claim 1, wherein said first immunoglobulin subunit polypeptide is an immunoglobulin heavy chain, or antigen-specific fragment thereof.

11. The method of claim 10, wherein said immunoglobulin heavy chain, or antigen-specific fragment thereof, is a membrane bound form of an immunoglobulin heavy chain.

12. The method of claim 11, wherein said immunoglobulin heavy chain, or antigen-specific fragment thereof, comprises a naturally-occurring immunoglobulin transmembrane domain.

13. The method of claim 11, wherein said immunoglobulin heavy chain, or antigen-specific fragment thereof, is attached to said host cell as part of a fusion protein.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-175-

14. The method of claim 13, wherein said fusion protein comprises a heterologous transmembrane domain.

5 15. The method of claim 13, wherein said fusion protein comprises a fas death domain.

10 16. The method of claim 10, wherein said immunoglobulin heavy chain, or antigen-specific fragment thereof, is selected from the group consisting of an IgM heavy chain, an IgD heavy chain, an IgG heavy chain, an IgA heavy chain, an IgE heavy chain, and an antigen-specific fragment of any of said heavy chains.

15 17. The method of claim 10, wherein said immunoglobulin heavy chain constant region sequence comprises a modification that supports an altered immune effector function.

20 18. The method of claim 16, wherein said immunoglobulin heavy chain, or antigen-specific fragment thereof, comprises an IgM heavy chain, or an antigen specific fragment thereof.

19. The method of claim 1, wherein said second immunoglobulin subunit polypeptide is an immunoglobulin light chain, or antigen-specific fragment thereof.

25 20. The method of claim 19, wherein said immunoglobulin light chain, or antigen-specific fragment thereof, associates with said immunoglobulin heavy chain, or antigen-specific fragment thereof, thereby producing a immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-176-

21. The method of claim 19, wherein said immunoglobulin light chain is selected from the group consisting of a kappa light chain and a lambda light chain.

5 22. The method of claim 1, wherein said first library of polynucleotides is constructed in a eukaryotic virus vector.

23. The method of claim 1, wherein said second library of polynucleotides is constructed in a eukaryotic virus vector.

10

24. The method of claim 5, wherein said polynucleotides isolated from said first library are introduced by means of a eukaryotic virus vector.

15 25. The method of claim 1, wherein said second library of polynucleotides is constructed in a plasmid vector.

26. The method of claim 22, wherein said host cells are infected with said first library at an MOI ranging from about 1 to about 10, and wherein said second library is introduced under conditions which allow up to 20 polynucleotides of said second library to be taken up by each infected host cell.

20

27. The method of claim 5, wherein said polynucleotides isolated from said first library are introduced into said host cells in a plasmid vector.

25 28. The method of claim 22, wherein said eukaryotic virus vector is an animal virus vector.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-177-

29. The method of claim 23, wherein said eukaryotic virus vector is an animal virus vector.

5 30. The method of claim 28, wherein said virus vector is capable of producing infectious viral particles in mammalian cells.

31. The method of claim 30, wherein the naturally-occurring genome of said virus vector is DNA.

10 32. The method of claim 30, wherein the naturally-occurring genome of said virus vector is RNA.

15 33. The method of claim 31, wherein the naturally-occurring genome of said virus vector is linear, double-stranded DNA.

34. The method of claim 33, wherein said virus vector is selected from the group consisting of an adenovirus vector, a herpesvirus vector and a poxvirus vector.

20 35. The method of claim 34, wherein said virus vector is a poxvirus vector.

25 36. The method of claim 35, wherein said poxvirus vector is selected from the group consisting of an orthopoxvirus vector, an avipoxvirus vector, a capripoxvirus vector, a leporipoxvirus vector, an entomopoxvirus vector, and a suipoxvirus vector.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-178-

37. The method of claim 36, wherein said poxvirus vector is an orthopoxvirus vector selected from the group consisting of a vaccinia virus vector and a raccoon poxvirus vector.

5 38. The method of claim 37, wherein said animal virus vector is a vaccinia virus vector.

39. The method of claim 38, wherein said host cells are permissive for the production of infectious viral particles of said virus.

10

40. The method of claim 38, wherein said vaccinia virus is attenuated.

41. The method of claim 40, wherein said vaccinia virus vector is deficient in D4R synthesis.

15

42. The method of claim 35, wherein said transcriptional control region of said first library of polynucleotides functions in the cytoplasm of a poxvirus-infected cell.

20

43. The method of claim 25, wherein said plasmid vector directs synthesis of said second immunoglobulin subunit in the cytoplasm of a poxvirus-infected cell through operable association with a transcription control region.

25

44. The method of claim 42, wherein said transcriptional control region comprises a promoter.

45. The method of claim 44, wherein said promoter is constitutive.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-179-

46. The method of claim 45, wherein said promoter is a vaccinia virus p7.5 promoter.

5 47. The method of claim 45, wherein said promoter is a synthetic early/late promoter.

48. The method of claim 44, wherein said promoter is a T7 phage promoter active in cells in which T7 RNA polymerase is expressed.

10 49. The method of claim 42, wherein said transcriptional control region comprises a transcriptional termination region.

15 50. The method of claim 22, wherein said first library of polynucleotides is constructed in a eukaryotic virus vector by a method comprising:

(a) cleaving an isolated linear DNA virus genome to produce a first viral fragment and a second viral fragment, wherein said first fragment is nonhomologous with said second fragment;

20 (b) providing a population of transfer plasmids comprising said polynucleotides which encode said plurality of immunoglobulin heavy chains through operable association with a transcription control region, flanked by a 5' flanking region and a 3' flanking region, wherein said 5' flanking region is homologous to said first viral fragment and said 3' flanking region is homologous to said second viral fragment; and wherein said transfer plasmids are capable of homologous recombination with said first and second viral fragments
25 such that a viable virus genome is formed;

(c) introducing said transfer plasmids and said first and second viral fragments into a host cell under conditions wherein a transfer plasmid and said viral fragments undergo *in vivo* homologous recombination, thereby

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-180-

producing a viable modified virus genome comprising a polynucleotide which encodes an immunoglobulin heavy chain; and

(d) recovering said modified virus genome.

5 51. The method of claim 23, wherein said second library of polynucleotides is constructed in a eukaryotic virus vector by a method comprising:

 (a) cleaving an isolated linear DNA virus genome to produce a first viral fragment and a second viral fragment, wherein said first fragment is
10 nonhomologous with said second fragment;

 (b) providing a population of transfer plasmids comprising said

polynucleotides which encode said plurality of immunoglobulin light chains through operable association with a transcription control region, flanked by a 5' flanking region and a 3' flanking region, wherein said 5' flanking region
15 is homologous to said first viral fragment and said 3' flanking region is homologous to said second viral fragment; and wherein said transfer plasmids are capable of homologous recombination with said first and second viral fragments such that a viable virus genome is formed;

 (c) introducing said transfer plasmids and said first and second viral fragments into a host cell under conditions wherein a transfer plasmid and said viral fragments undergo *in vivo* homologous recombination, thereby
20 producing a viable modified virus genome comprising a polynucleotide which encodes an immunoglobulin light chain; and

25 (d) recovering said modified virus genome.

52. The method of claim 1, wherein said polynucleotides encoding antigen-specific immunoglobulin molecules are identified through detection of an effect selected from the group consisting of:

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-181-

- (a) antigen-induced cell death;
- (b) antigen-induced signaling; and
- (c) antigen-specific binding.

5 53. The method of claim 5, wherein said polynucleotides encoding antigen-specific immunoglobulin molecules are identified through detection of an effect selected from the group consisting of:

- (a) antigen-induced cell death;
- (b) antigen-induced signaling; and
- 10 (c) antigen-specific binding.

 54. The method of claim 52, wherein said effect is antigen-induced cell death.

15 55. The method of claim 53, wherein said effect is antigen-induced cell death.

 56. The method of claim 54, wherein said host cells express immunoglobulin molecules on their surface, and wherein said host cells
20 expressing immunoglobulin molecules which bind said antigen directly respond to cross-linking of antigen-specific immunoglobulin receptors by induction of apoptosis.

 57. The method of claim 55, wherein said host cells express immunoglobulin molecules on their surface, and wherein said host cells
25 expressing immunoglobulin molecules which bind said antigen directly respond to cross-linking of antigen-specific immunoglobulin receptors by induction of apoptosis.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-182-

58. The method of claim 52, wherein said effect is antigen-induced signaling.

5 59. The method of claim 53, wherein said effect is antigen-induced signaling.

10 60. The method of claim 58, wherein said host cells express immunoglobulin molecules on their surface, and wherein said host cells expressing immunoglobulin molecules which bind said antigen respond to cross-linking of antigen-specific immunoglobulin receptors by expression of a detectable reporter molecule.

15 61. The method of claim 59, wherein said host cells express immunoglobulin molecules on their surface, and wherein said host cells expressing immunoglobulin molecules which bind said antigen respond to cross-linking of antigen-specific immunoglobulin receptors by expression of a detectable reporter molecule.

20 62. The method of claim 60, wherein said reporter molecule is selected from the group consisting of luciferase, green fluorescent protein, and beta-galactosidase.

25 63. The method of claim 61, wherein said reporter molecule is selected from the group consisting of luciferase, green fluorescent protein, and beta-galactosidase.

64. The method of claim 52, wherein said effect is antigen-specific binding.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-183-

65. The method of claim 64, comprising:

(a) contacting pools of said host cells with said antigen under conditions wherein antigen-specific immunoglobulin molecules expressed by said host cells will bind to said antigen; and

(b) recovering polynucleotides of said first library from those host cell pools, or from replicate pools of polynucleotides set aside previously, expressing immunoglobulin molecules to which said antigen was bound.

66. The method of claim 65, further comprising:

(c) dividing said recovered polynucleotides into a plurality of sub-pools and introducing said sub-pools into populations of host cells capable of expressing said immunoglobulin molecule;

(d) permitting expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, from said host cells;

(e) contacting said pools with said antigen under conditions wherein antigen-specific immunoglobulin molecules expressed by said host cells bind to said antigen; and

(f) recovering polynucleotides of said first library from those host cell pools, or from replicate pools of polynucleotides set aside previously, expressing immunoglobulin molecules to which said antigen was bound.

67. The method of claim 66, further comprising repeating steps (c)-(f) one or more times, thereby enriching for polynucleotides of said first library which encode a first immunoglobulin subunit polypeptide which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, specifically binds said antigen.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-184-

68. The method of claim 64, wherein said antigen is attached to a substrate selected from the group consisting of a synthetic particle, a polymer, a magnetic bead, and a protein-coated tissue culture plate.

5 69. The method of claim 64, wherein said antigen is expressed on the surface of an antigen-expressing presenting cell, wherein said antigen-expressing presenting cell is constructed by transfecting an antigen-free presenting cell with a polynucleotide which operably encodes said antigen.

10 70. The method of claim 69, wherein said antigen-expressing presenting cell is constructed in an antigen-free presenting cell selected from the group consisting of an L cell, a Cos7 cell, a 293 cell, a HeLa cell, and an NIH 3T3 cell.

15 71. The method of claim 65, wherein said antigen is conjugated to a fluorescent tag, and wherein host cell pools expressing immunoglobulin molecules which bind antigen are identified through fluorescence activated cell sorting.

20 72. The method of claim 53, wherein said effect is antigen-specific binding.

73. The method of claim 72, comprising:

25 (a) contacting pools of said host cells with said antigen under conditions wherein antigen-specific immunoglobulin molecules expressed by said host cells will bind to said antigen; and

(b) recovering polynucleotides of said second library from those host cell pools, or from replicate pools of polynucleotides set aside previously, expressing

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-185-

immunoglobulin molecules to which said antigen was bound.

74. The method of claim 73, further comprising:

5 (c) dividing said recovered polynucleotides into a plurality of sub-pools and introducing said sub-pools into populations of host cells capable of expressing said immunoglobulin molecule;

(d) permitting expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, from said host cells;

10 (e) contacting said pools with said antigen under conditions wherein antigen-specific immunoglobulin molecules expressed by said host cells bind to said antigen; and

15 (f) recovering polynucleotides of said second library from those host cell pools, or from replicate pools of polynucleotides set aside previously, expressing immunoglobulin molecules to which said antigen was bound.

75. The method of claim 74, further comprising repeating steps (c)-(f) one or more times, thereby enriching for polynucleotides of said first library which encode a first immunoglobulin subunit polypeptide which, as part of an immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, specifically binds said antigen.

76. The method of claim 72, wherein said antigen is attached to a substrate selected from the group consisting of a synthetic particle, a polymer, a magnetic bead, and a protein-coated tissue culture plate.

77. The method of claim 72, wherein said antigen is expressed on the surface of an antigen-expressing presenting cell, wherein said antigen-expressing

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-186-

presenting cell is constructed by transfecting an antigen-free presenting cell with a polynucleotide which operably encodes said antigen.

5 78. The method of claim 77, wherein said antigen-expressing presenting cell is constructed in an antigen-free presenting cell selected from the group consisting of an L cell, a Cos7 cell, a 293 cell, a HeLa cell, and an NIH 3T3 cell.

10 79. The method of claim 73, wherein said antigen is conjugated to a fluorescent tag, and wherein host cell pools expressing immunoglobulin molecules which bind antigen are identified through fluorescence activated cell sorting.

15 80. A kit for the selection of antigen-specific recombinant immunoglobulins expressed in a eukaryotic host cell comprising:

(a) a first library of polynucleotides encoding, through operable association with a transcriptional control region, a plurality of first immunoglobulin subunit polypeptides, each first immunoglobulin subunit polypeptide comprising:

20 (i) a first immunoglobulin constant region selected from the group consisting of a heavy chain constant region and a light chain constant region,

(ii) an immunoglobulin variable region corresponding to said first constant region, and

25 (iii) a signal peptide capable of directing cell surface expression or secretion of said first immunoglobulin subunit polypeptide,

wherein said first library is constructed in a eukaryotic virus vector;

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-187-

(b) a second library of polynucleotides encoding, through operable association with a transcriptional control region, a plurality of second immunoglobulin subunit polypeptides, each comprising:

5 (i) a second immunoglobulin constant region selected from the group consisting of a heavy chain constant region and a light chain constant region, wherein said second immunoglobulin constant region is not the same as said first immunoglobulin constant region,

(ii) an immunoglobulin variable region corresponding to said second constant region, and

10 (iii) a signal peptide capable of directing cell surface expression or secretion of said second immunoglobulin subunit polypeptide,

wherein a said second immunoglobulin subunit polypeptide is capable of combining with said first immunoglobulin subunit polypeptide to form a surface immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, and
15 wherein said second library is constructed in a eukaryotic virus vector; and

(c) a population of host cells capable of expressing said immunoglobulin molecules;

wherein said first and second libraries are provided both as infectious virus particles and as inactivated virus particles, and wherein said
20 inactivated virus particles infect said host cells and allow expression of said first and second immunoglobulin subunit polypeptides, but do not undergo virus replication; and

wherein antigen-specific immunoglobulin molecules expressed by said host cells are selected through interaction with an antigen.

25

81. An antibody, or antigen-specific fragment thereof, produced by the method of claim 1.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-188-

82. A composition comprising the antibody of claim 81, and a pharmaceutically acceptable carrier.

5 83. A method of selecting polynucleotides which encode a single-domain antigen-specific immunoglobulin molecule, or antigen-specific fragment thereof, comprising:

(a) introducing into a population of eukaryotic host cells capable of expressing said immunoglobulin molecule a library of polynucleotides encoding, through operable association with a transcriptional control region, a
10 plurality of single-domain immunoglobulin polypeptides, each immunoglobulin polypeptide comprising:

(i) an immunoglobulin heavy chain constant region,
(ii) an camelized immunoglobulin heavy chain variable
region, and

15 (iii) a signal peptide capable of directing cell surface expression or secretion of said immunoglobulin subunit polypeptide;

(b) permitting expression of immunoglobulin molecules, or antigen-specific fragments thereof, from said host cells;

20 (c) contacting said immunoglobulin molecules with an antigen; and

(d) recovering polynucleotides of said library from those host cells expressing immunoglobulin molecules which bind said antigen.

WO 02/102855

PCT/US01/43076

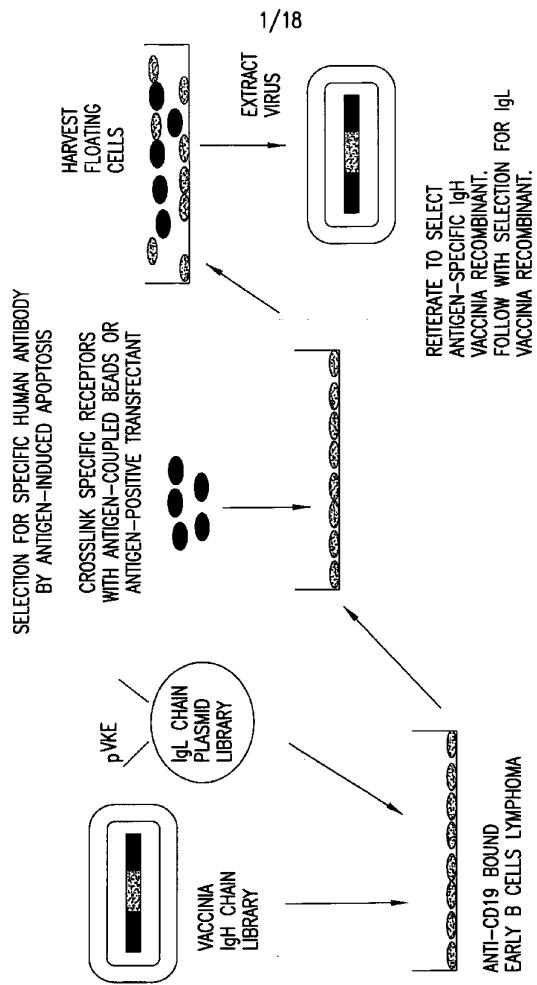


FIG.1

2/18

PREPARATION OF TARGET CELL LINES
EARLY B CELL PRECURSORS ARE TRANSFECTED WITH THE SELECTION CONSTRUCT

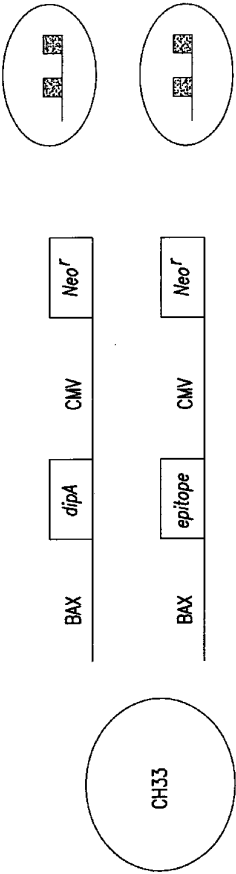


FIG.2A

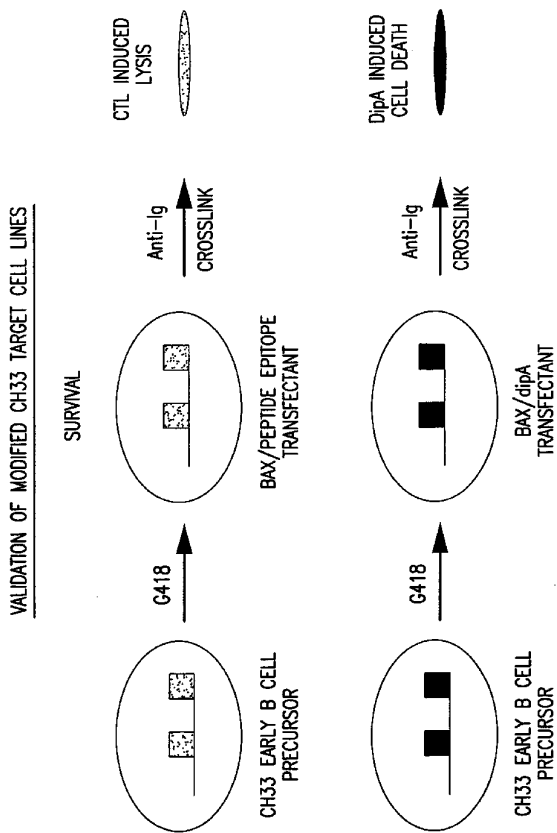


FIG.2B

WO 02/102855

PCT/US01/43076

4/18

CONSTRUCTION OF pVHE

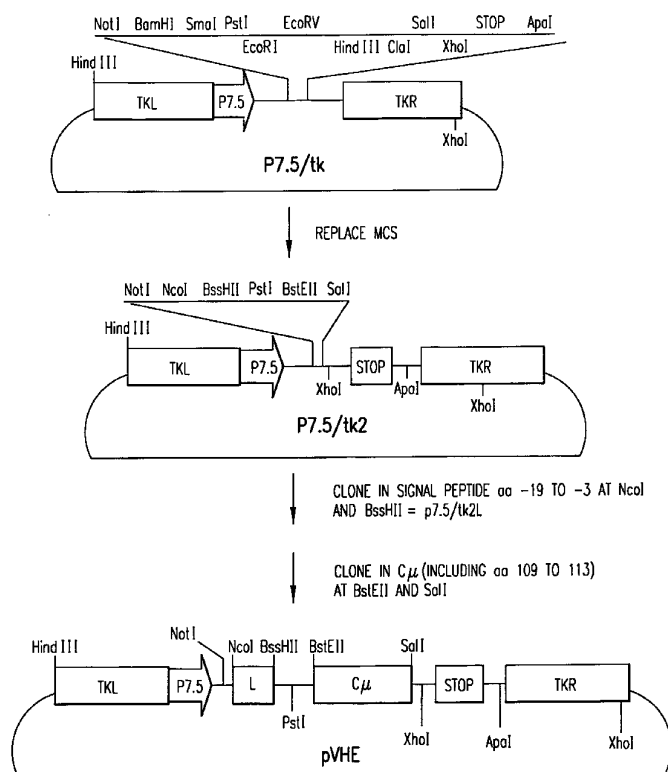


FIG.3

WO 02/102855

PCT/US01/43076

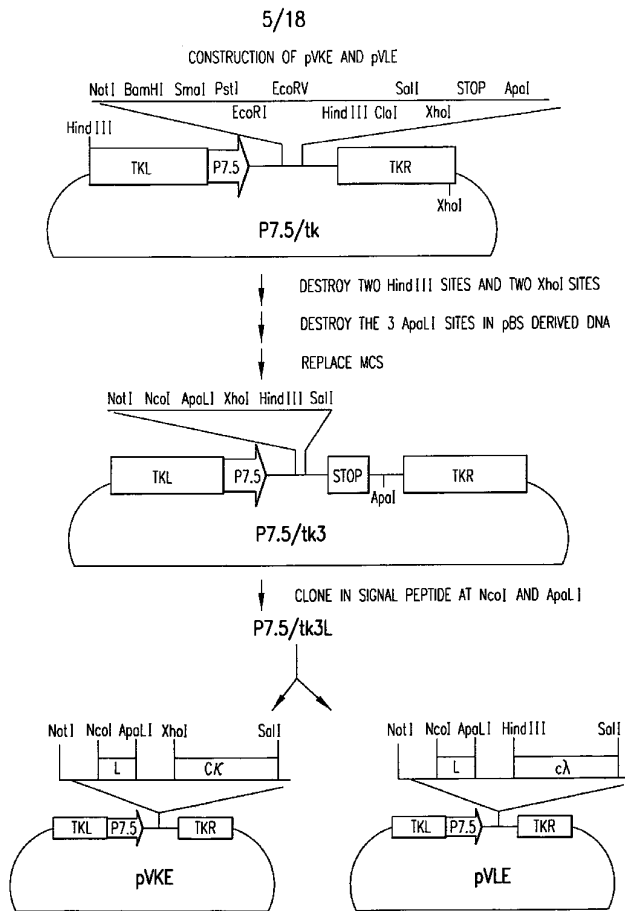


FIG.4

WO 02/102855

PCT/US01/43076

6/18

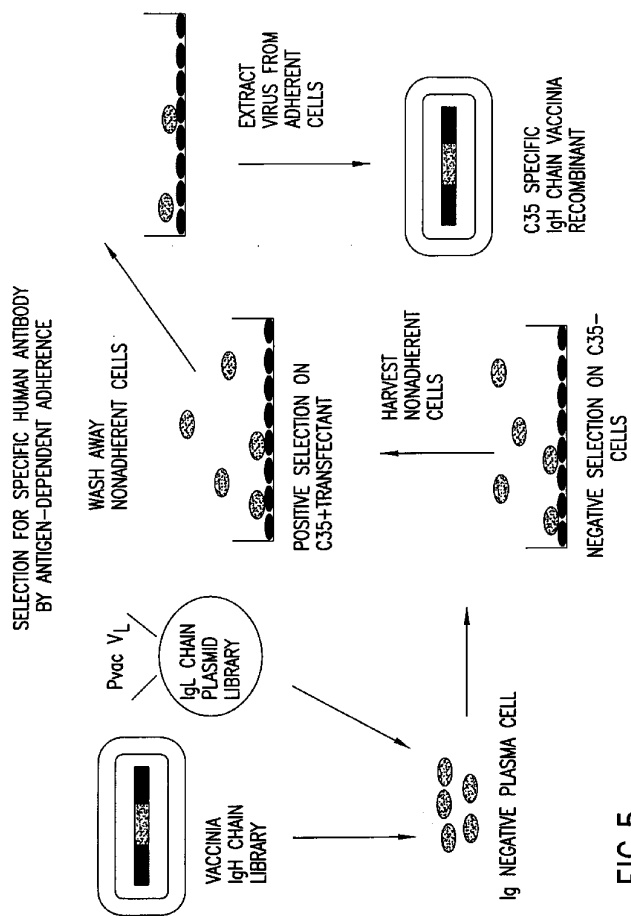


FIG.5

7/18

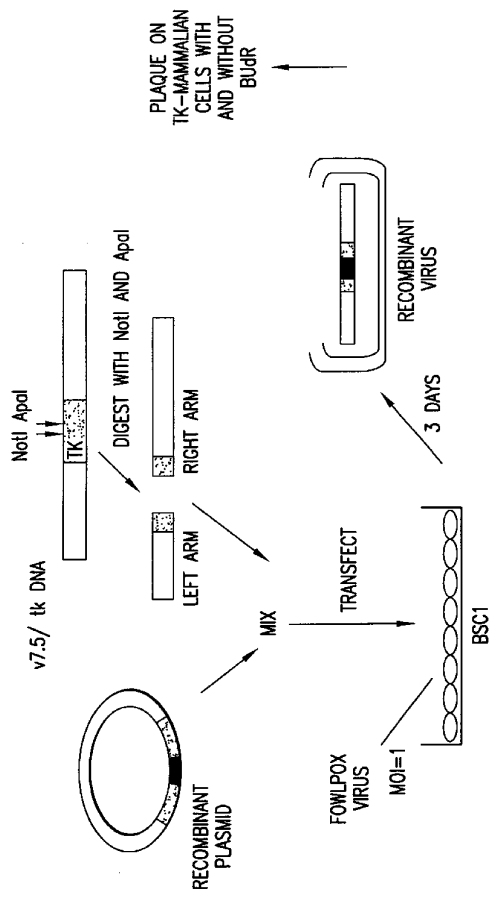


FIG.6

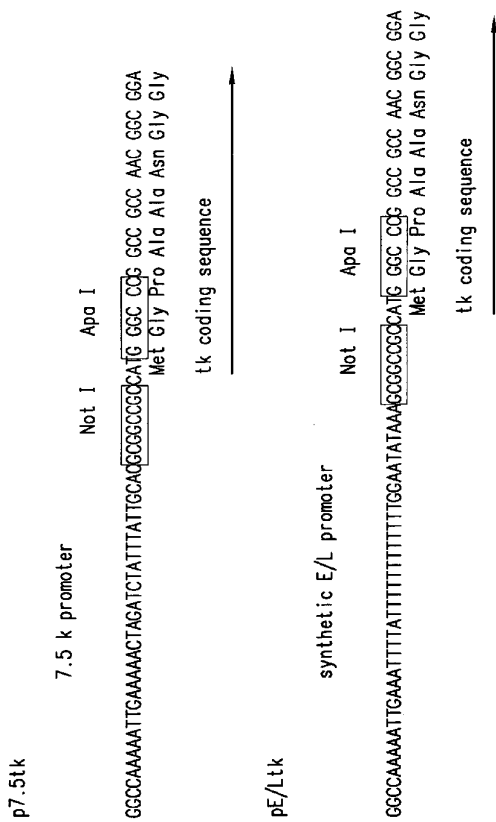


FIG.7

WO 02/102855

PCT/US01/43076

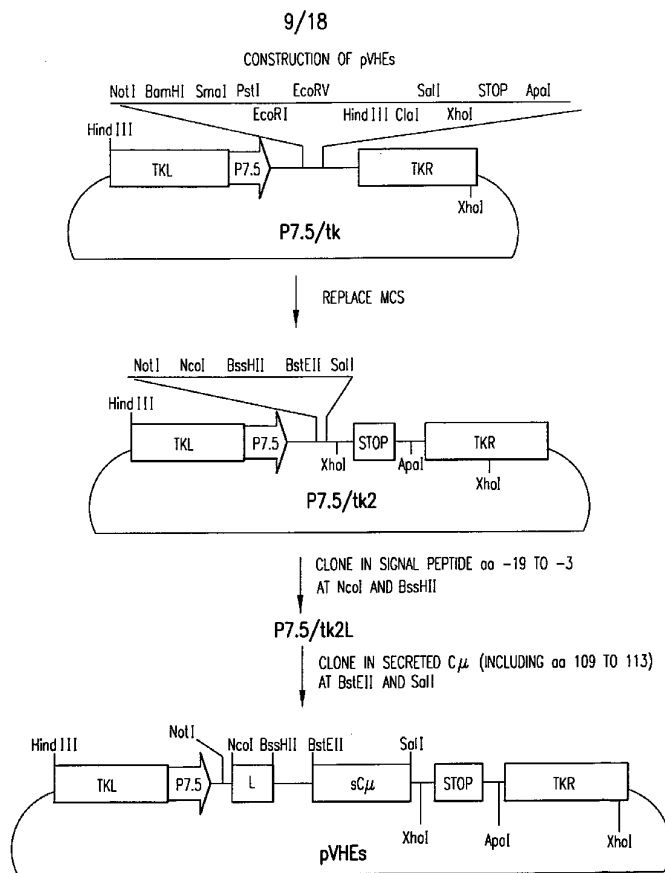


FIG.8

WO 02/102855

PCT/US01/43076

10/18

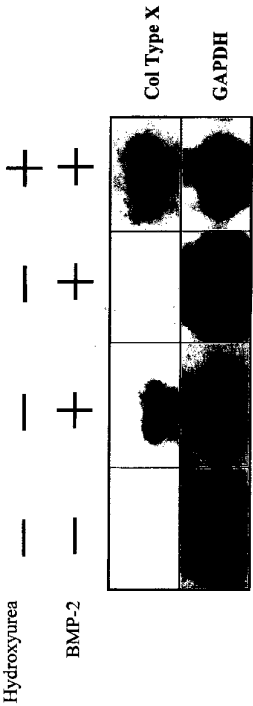
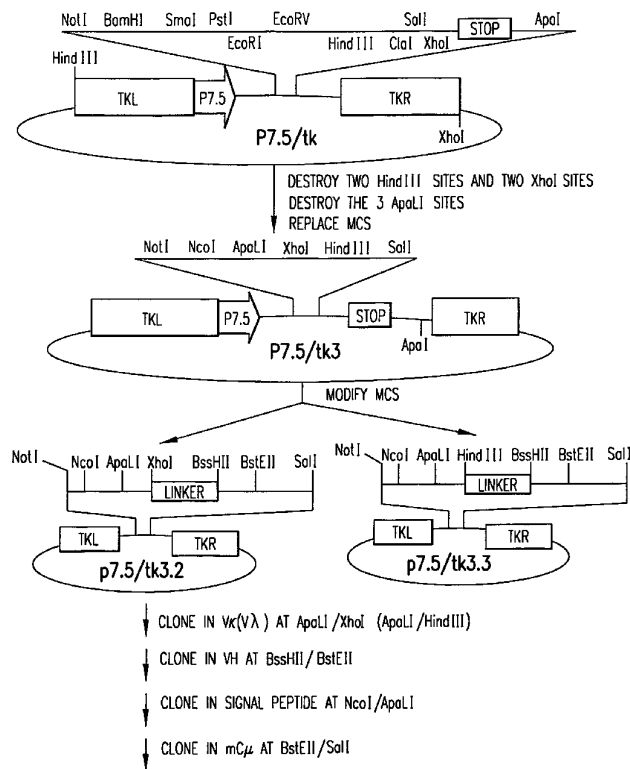


FIG.9

WO 02/102855

PCT/US01/43076

11/18



CONSTRUCTION OF scFV EXPRESSION VECTORS

FIG.10

WO 02/102855

PCT/US01/43076

12/18

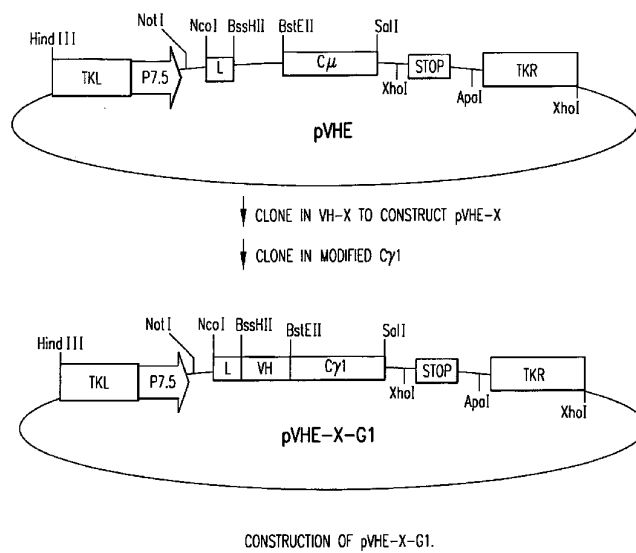


FIG.11

WO 02/102855

PCT/US01/43076

13/18

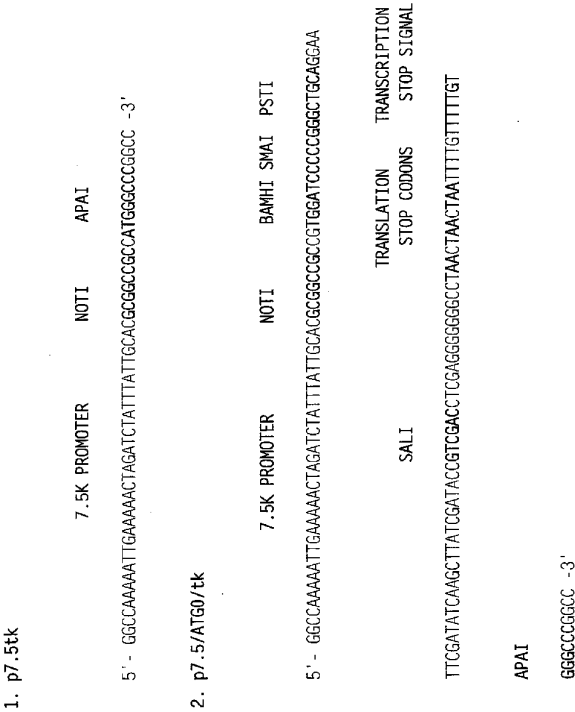


FIG.12A

WO 02/102855

PCT/US01/43076

14/18

3. p7.5/ATG1/TK

7.5K PROMOTER

NOTI

START
CODON BAMHI SMAI PSTI

5' - GCCCAAAAATTGAAAAACTAGATCTATTTATTGCACGCGCGGCCCATGGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAA

SALI

TRANSLATION
STOP CODONS

TRANSCRIPTION
STOP SIGNAL

TTCCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCTAACTAACTAATTTGTTTTTGT

APAI

GGGGGGGGCC -3'

FIG.12B

WO 02/102855

PCT/US01/43076

15/18

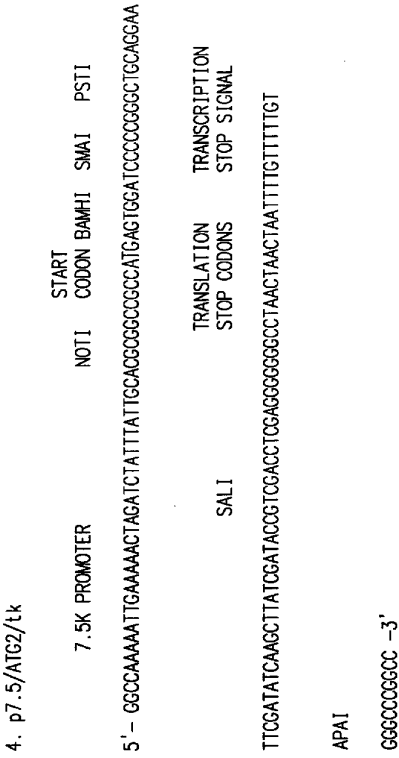


FIG.12C

WO 02/102855

PCT/US01/43076

16/18

5. p7.5/ATG3/tk

7.5K PROMOTER

NOTI

START
CODON

SMAI

PSTI

5'- GGGCAAAATTGAAAAACTAGATCTATTATTGACACGGGGCCCGCATGACGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAA

SALI

TRANSLATION
STOP CODONS

TRANSCRIPTION
STOP SIGNAL

TTGGATATCAAGCTTATCGATACCGTGGACCTCGAGGGGGCCCTAACTAAATTTGTTTTGT

APAI

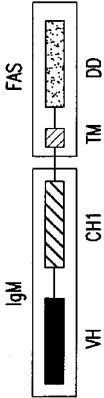
GGGGCCGGCC -3'

FIG.12D

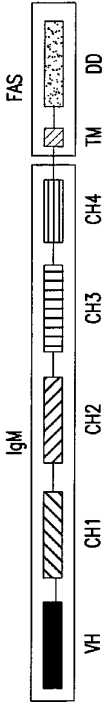
CONSTRUCTION OF IgM-Fas FUSION PRODUCTS

CONSTRUCTS:

(a) VH-CH1-TM-DD



(b) VH-CH1-CH2-CH3-CH4-TM-DD



(c) VH-CH1-CH2-CH3-CH4(TM)-DD

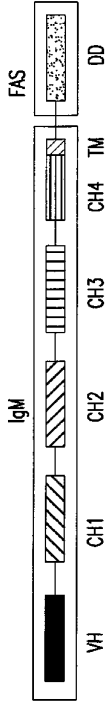
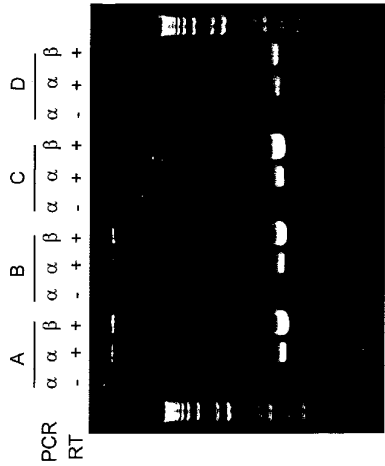


FIG.13



Expression of Ig α and Ig β in the transfected COS7 and HeLaS3 cell lines.

FIG. 14

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-1-

SEQUENCE LISTING

<110> University of Rochester

<120> In Vitro Methods Of Producing And Selecting
Immunoglobulin Molecules In Eukaryotic Cells

<130> 1821.007PC05

<150> 60/271,424

<151> 2001-02-27

<150> 60/262,067

<151> 2001-01-18

<150> 60/298,087

<151> 2001-06-15

<150> 60/249,268

<151> 2000-11-17

<160> 147

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> p7.5/tk promoter

<400> 1
ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgccatggg ccgggcc 57

<210> 2

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-2-

<211> 145

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> p 7.5/ATG0/tk promoter

<400> 2
ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgccgtgga tcccccgggc 60
tgcaggaatt cgatatcaag cttatcgata cgtcgacct cgaggggggg cctaactaac 120
taattttgtt tttgtgggcc cggcc 145

<210> 3

<211> 148

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> p 7.5/ATG1/tk promoter

<400> 3
ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgccatggt ggatccccc 60
ggctgcagga attcgatata aagcttatcg ataccgtoga cctcgagggg gggcctaact 120
aactaatttt gtttttgttg gcccggcc 148

<210> 4

<211> 149

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> p7.5/ATG2/tk vector

<400> 4
ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgccatgag tggatccccc 60
gggctgcagg aattcgatat caagcttatc gataccgtcg acctcgaggg ggggcctaac 120
taactaattt tgttttgttg gcccggcc 149

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-3-

<210> 5
<211> 150
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> p7.5/ATG3/tk vector

<400> 5
ggccaaaat tgaaaaacta gatctatitta ttgcacgcgg ccgccatgac gtggatcccc 60
cgggctgcag gaattcgata tcaagcttat cgataccgtc gacctcgagg gggggcctaa 120
ctaactaatt ttgtttttgt gggcccggcc 150

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker peptide

<400> 6
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker peptide

<400> 7
Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-4-

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker peptide

<400> 8

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr
1 5 10

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker peptide

<400> 9

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln
1 5 10 15

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker peptide

<400> 10

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
1 5 10

<210> 11

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-5-

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker peptide

<400> 11

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker peptide

<400> 12

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker peptide

<400> 13

Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp
1 5 10 15

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-6-

<210> 14

<211> 1555

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pVHE transfer plasmid

<400> 14

```
ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcaogcgg ccgcaaaacca tgggatggag    60
ctgtateate ctcttcttgg tagcaacacgc tacaggcgcg catatggtoa ccgtctctctc    120
agggagtgca tccgccccaa cctttttccc cctcgtctcc tgtgagaatt ccccgctgga    180
tacgagcagc gtggccgttg gctgcctcgc acaggacttc ctcccgact ccatcacttt    240
ctcctggaaa tacaagaaca actctgacat cagcagcacc cggggcttcc catcagtcct    300
gagagggggc aagtacgcag ccacctcaca ggtgctgctg ccttccaagg acgtcatgca    360
gggcacagac gaacacgtgg tgtgcaaagt ccagcacccc aacggcaaca aagaaaagaa    420
cgtgcctctt ccagtgattg ctgagctgcc tcccaaagtg agcgtcttgg tcccaccccg    480
cgacggcttc ttgggcaacc ccgcagcaaa gtccaagctc atctgocagg ccacgggttt    540
cagtcgcccg cagattcagg tgcctggcct gcgcgagggg aagcaggtgg ggtctggcgt    600
caccacggac caggtgcagg ctgaggccaa agagtctggg ccacagacct acaagggtgac    660
tagcactctg accatcaaag agagcgactg gctcagccag agcatgttca cctgccgcgt    720
ggatcacagg ggctgacct tccagcagaa tgcgtctctc atgtgtgtcc ccgatcaaga    780
cacagccatc cgggtcttgg ccctccccc atcttttggc agcatcttcc tcaccaagtc    840
caccaagtgg acctgcctgg tcacagacct gaccacctat gacagcgtga ccatctctg    900
gacccgccag aatggcggaag ctgtgaaaac ccacaccaac atctccgaga gccaccccaa    960
tgccacttcc agcgcgttgg gtgaggccag catctgcgag gatgactgga attccgggga    1020
gagggttcac tgcaccgtga cccacacaga cctgcctcgg ccaactgaagc agaccatctc    1080
ccggcccaag ggggtggccc tgcacaggcc cgtatgtctac ttgctgccac cagcccggga    1140
gcagctgaac ctgcgggagt cggccacat cactgtcctg gtgacgggt tctctccgc    1200
ggacgtcttc gtgcagtggg tgcagagggg gcagcccttg tcccgggaga agtatgtgac    1260
cagcgcccca atgcctgagc cccaggcccc aggccggtag ttccgccaca gcatcctgac    1320
cgtgtccgaa gaggaatgga acacggggga gacctacacc tgcgtggttg cccatgaggc    1380
cctgcccaac aggttactg agaggacctg ggacaagtc accgaggggg aggtgagcgc    1440
```

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-7-

cgacgaggag ggctttgaga acctgtgggc caccgcctcc accttcacg tctcttct 1500
cctgagcctc ttctacagta ccacgctcac ctgttcaag gtgaaatgag tcgac 1555

<210> 15

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> unique BssHII site in pVHE

<400> 15

gcgcgc

6

<210> 16

<211> 7

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Unique BstEII site in pVHE

<400> 16

ggtcacc

7

<210> 17

<211> 446

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pVKE transfer plasmid

<400> 17

ggccaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgcccattg gatggagctg

60

tatcabccto ttcttggtag caacagctac aggcgtgcac ttgactcgag atcaaacgaa

120

ctgtggctgc accatctgtc ttcattctcc cgcacatctga tgagcagttg aaatctggaa

180

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-8-

```
ctgctctgt tgtgtgctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga 240
aggtggataa cgcctccaa tgggtaact ccaggagag tgccacagag caggacagca 300
aggacagcac ctacagctc agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac 360
acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct 420
tcaacagggg agagtgttag gtgcac 446
```

<210> 18

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> unique ApalI site in pVKE plasmid

<400> 18

gtgcac

6

<210> 19

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> unique XhoI site in pVKE plasmid

<400> 19

ctcgag

6

<210> 20

<211> 455

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pVLE transfer plasmid

<400> 20

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-9-

```
ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgcccattg gatggagctg 60
tatcatcttc ttcttggtag caacagctac aggcgtgcac ttgactcgag aagcttaccg 120
tcctacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gaggcgttga 180
aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag 240
tacagtggaa ggtggataac gcctccaat cgggttaact ccaggagagt gtcacagagc 300
aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact 360
acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca 420
caaaagagctt caacagggga gagtgttagg tcgac 455
```

<210> 21

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Unique ApaLI site in pVLE plasmid

<400> 21

gtgcac 6

<210> 22

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Unique HindIII site in pVLE

<400> 22

aagctt 6

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-10-

<220>

<223> H-2Kd restricted peptide

<400> 23

Gly Tyr Lys Ala Gly Met Ile His Ile
1 5

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 24

attaggatcc ggtcaccgtc tcctcaggg

29

<210> 25

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 25

attagtcgac tcatttcacc ttgaacsagg tgac

34

<210> 26

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cassette used to generate p7.5/tk2

<400> 26

gcggccgcaa accatgaaa gcgcgcataat ggtcaccaa agtcgac

47

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-11-

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 27

attaggatcc ggtcacccgtc tcttcaggg

29

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 28

attagtcgac tcagtagcag gtgccagctg t

31

<210> 29

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cassette used to generate p7.5/tk3

<400> 29

gcggccgccc atggatcgt gcacttgact cgagaagctt agtagtcgac

50

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-12-

<220>

<223> primer

<400> 30
caggactcga gatcaaacga actgtggctg 30

<210> 31

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 31
aatatgtoga octaacactc tcccctgttg aagctcttt 39

<210> 32

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 32
aatatgtoga octaacactc tcccctgttg aagctctt 38

<210> 33

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 33
atttaagctt accgtcctac gaactgtggc tgcaccatct 40

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-13-

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 34

ttttgcgcg actcccaggt gcagctgggt cagtcctgg

38

<210> 35

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 35

ttttgcgcg actccgaggt gcagctgggt gagtctgg

38

<210> 36

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 36

ttttgcgcg actcccaggt gcagctgcag gagtcggg

38

<210> 37

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-14-

<220>
<223> primer
<400> 37
gacggtgacc aggggtgccct ggcccca 27

<210> 38
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 38
gacggtgacc aggggtgccac ggcccca 27

<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 39
gacggtgacc attgtccctt ggcccca 27

<210> 40
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 40
gacggtgacc agggttccct ggcccca 27

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-15-

<210> 41

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 41

gaaggtagacc gtggtccctt ggcccca

27

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 42

tttgtgcact cagacatcca gatgaccag totcc

35

<210> 43

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 43

tttgtgcact ccgatgttgt gatgactcag totcc

35

<210> 44

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-16-

<220>
<223> primer
<400> 44
tttgtgcact ccgaaattgt gttgacgcag tctcc 35

<210> 45
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 45
tttgtgcact ccgacatcgt gatgacccag tctcc 35

<210> 46
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 46
tttgtgcact ccgaaacgac actcacgcag tctcc 35

<210> 47
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 47
tttgtgcact ccgaaattgt gctgactcag tctcc 35

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-17-

<210> 48

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 48

gatctcgagc ttggtccctt ggccgaa

27

<210> 49

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 49

gatctcgagc ttggtccctt ggccaaa

27

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 50

gatctcgagt ttggtcccag ggccgaa

27

<210> 51

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-18-

<220>

<223> primer

<400> 51
gatctcgagc ttggtccctc cgccgaa

27

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 52
aatctcgagt cgtgtccctt ggccgaa

27

<210> 53

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 53
tttgtgcact ccagtcctgt gttgacgcag ccgcc

35

<210> 54

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 54
tttgtgcact ccagtcctgc cctgactcag cctgc

35

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-19-

<210> 55

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 55

tttgtgcact cctcctatgt gctgactcag ccacc

35

<210> 56

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 56

tttgtgcact cctctcttga gctgactcag gaccc

35

<210> 57

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 57

tttgtgcact cccacgttat actgactcaa cggcc

35

<210> 58

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-20-

<220>

<223> primer

<400> 58

tttgtgcact cccaggctgt gctcactcag ccgtc

35

<210> 59

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 59

tttgtgcact ccaattttat gctgactcag cccca

35

<210> 60

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 60

tttgtgcact cccaggctgt ggtgactcag gagcc

35

<210> 61

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 61

ggtaagcttg gtcccagttc cgaagac

27

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-21-

<210> 62

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 62

ggtaagcttg gtccctccgc cgaat

25

<210> 63

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 63

aatatgcgcg cactcccagg tgcagctggt gcagtctgg

39

<210> 64

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 64

aatatgcgcg cactcccagg tcaccttgaa ggagtctgg

39

<210> 65

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-22-

<220>
<223> primer
<400> 65
aatatgcgcg cactccgagg tgcagctggt ggagtctgg 39

<210> 66
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 66
aatatgcgcg cactcccagg tgcagctgca ggagtggg 39

<210> 67
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 67
aatatgcgcg cactccgagg tgcagctggt gcagtctg 38

<210> 68
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 68
gagacggtga ccagggtgcc ctggcccca 29

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-23-

<210> 69

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 69

gagacggtga ccaggggtgcc acggcccca

29

<210> 70

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 70

gagacggtga ccattgtccc ttggcccca

29

<210> 71

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 71

gagacggtga ccaggggttcc ctggcccca

29

<210> 72

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-24-

<220>

<223> primer

<400> 72
gagacggtga ccgtgggtccc ttggcccca

29

<210> 73

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 73
caggagtga ctcgcacatc cagatgaccc agtctcc

37

<210> 74

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 74
caggagtga ctcgcagtgt gtgatgactc agtctcc

37

<210> 75

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 75
caggagtga ctcgaaaatt gtgttgacgc agtctcc

37

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-25-

<210> 76

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 76

caggagtgca ctccgacatc gtgatgaccc agtctcc

37

<210> 77

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 77

caggagtgca ctccgaaacg acactcagc agtctcc

37

<210> 78

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 78

caggagtgca ctccgaaatt gtgctgactc agtctcc

37

<210> 79

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-26-

<220>

<223> primer

<400> 79

ttgatctcga gcttggtccc ttggccgaa

29

<210> 80

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 80

ttgatctcga gcttggtccc ctggccaaa

29

<210> 81

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 81

ttgatctcga gtttggtccc agggccgaa

29

<210> 82

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 82

ttgatctcga gcttggtccc tccgccgaa

29

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-27-

<210> 83

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 83

ttaaattcga gtcgtgtccc ttggccgaa

29

<210> 84

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 84

cagatgtgca ctcccagtct gtgttgacgc agccgcc

37

<210> 85

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 85

cagatgtgca ctcccagtct gccctgactc agcctgc

37

<210> 86

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-28-

<220>

<223> primer

<400> 86

cagatgtgca ctctctctat gtgctgactc agccacc

37

<210> 87

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 87

cagatgtgca ctctctttct gagctgactc aggaccc

37

<210> 88

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 88

cagatgtgca ctcccacgtt atactgactc aaccgcc

37

<210> 89

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 89

cagatgtgca ctcccaggct gtgctcactc agccgtc

37

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-29-

<210> 90

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 90

cagatgtgca ctccaatttt atgtgtgactc agcccca

37

<210> 91

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 91

cagatgtgca ctcccaggct gtggtgactc aggagcc

37

<210> 92

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 92

acggtaagct tggcccagct toccaagac

29

<210> 93

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-30-

<220>

<223> primer

<400> 93

acgtaagct tggccctcc gccgaatac

29

<210> 94

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 94

atgttacgtc ctgtagaaac c

21

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 95

tcattgtttg cctccctgct g

21

<210> 96

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 96

aaagcggccg ccccggtatg ttacgtcc

28

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-31-

<210> 97

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 97

aaagggcccg gcgcgcctca ttgtttgcc

29

<210> 98

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 98

aaaggatcca taatgaattc agtgactgta tcacacg

37

<210> 99

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 99

cttgccggccg ctttaataat aaacccttga gcc

34

<210> 100

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-32-

<220>
<223> primer
<400> 100
attgagctct taatactttt gtcgggtaac agag 34

<210> 101
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 101
ttactcgaga gtgtcgcaat ttggatttt 29

<210> 102
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 102
aaagaattcc tttattgtca tcggccaaa 29

<210> 103
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 103
aatctgcagt cattgtttgc ctccctgctg 30

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-33-

<210> 104

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 104

aaagaattca taatgaattc agtgactgta tcacacg

37

<210> 105

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 105

cttgatcct taataataaa accottgagc cc

32

<210> 106

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 106

aataagcttt actccagata atatgga

27

<210> 107

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-34-

<220>

<223> primer

<400> 107
aatctgcagc ccagttccat ttt

23

<210> 108

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 108
aatggatcct catccagcgg cta

23

<210> 109

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 109
aatgagctct agtacctaca accogaa

27

<210> 110

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 110
aaagtcgacg gccaaaaatt gaaatttt

28

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-35-

<210> 111

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 111

aatggatcct cattgtttgc ctccc

25

<210> 112

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cassette converting Plasmid p7.5/tk3 to p7.5/tk3.1

<400> 112

gcggccgccc atggatagcg tgcacttgac tcgagaagct tagtagtcga c

51

<210> 113

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> region substituted to convert plasmid p7.5/tk3.1 to p7.5/tk3.2

<400> 113

ctcgagaagc ttagtagtcg ac

22

<210> 114

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-36-

<220>

<223> cassette for the conversion of plasmid p7.5/tk3.1 to p7.5/tk3.2

<400> 114
ctcgagatca aagagggtaa atcttcogga tctggttcg aaggcgcgca tgcggtcacc 60
gtctctcat ggtcgac 78

<210> 115

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> p7.5/tk3.2 linker

<400> 115
gagggtaaat ctcccgatc tggttcogaa ggcgcgcact cc 42

<210> 116

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> p7.5/tk3.2 linker

<400> 116

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Gly Ala His Ser
1 5 10

<210> 117

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-37-

<223> region substituted to convert plasmid p7.5/tk3.1 to p7.5/tk3.3

<400> 117
aagcttagta gtcgac 16

<210> 118

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cassette for the conversion of plasmid p7.5/tk3.1 to p7.5/tk3.3

<400> 118
aagcttaccg tcctagaggg taaatcttc ggatctgggt cogaaggcgc gcatgcggtc 60
accgtctect catgagtcga c 81

<210> 119

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> p7.5/tk3.3 linker

<400> 119
gagggtaaat cttccggatc tggttccgaa ggcgcgcact cc 42

<210> 120

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> p7.5/tk3.3 linker

<400> 120

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Gly Ala His Ser
1 5 10

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-38-

<210> 121

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 121

attaggatcc ggtcacogtc tcttcagcc

29

<210> 122

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 122

attagtcgac tcattaccc ggagacaggg agag

34

<210> 123

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 123

aatatggtea ccgtctcttc agcc

24

<210> 124

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-39-

<220>

<223> primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> May be any nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> May be any nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> May be any nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> May be any nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> May be any nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(18)

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-40-

<223> May be any nucleotide

<400> 124
nnnnnnnnnn nnnnnnnntt caggtgctgg gcacgg

36

<210> 125

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> May be any Nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> May be any Nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> May be any Nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> May be any Nucleotide

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-41-

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> May be any Nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> May be any Nucleotide

<400> 125

nnknnknnkn nknknknkgt cttcctcttc ccccca

36

<210> 126

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 126

aatatgtcga ctcatttacc cgg

23

<210> 127

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 127

acacgggtcac cgtctcctca gggagtgc

28

<210> 128

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-42-

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 128

agttagatct ggatcctgga agaggcacgt t

31

<210> 129

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 129

aacgtgcctc ttccaggatc cagatctaac

30

<210> 130

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 130

acgcgtcgac ctagaccaag ctttgattt cat

33

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-43-

<220>

<223> primer

<400> 131
ctctcccgcg gacgtcttcg t

21

<210> 132

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 132
agttagatct ggatccctca aagccctcct c

31

<210> 133

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 133
gaggagggtc ttgagggtac cagatctaac

30

<210> 134

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 134
aatagtgtg atatatttca ccttgacaa

30

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-44-

<210> 135

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 135

ttgttcaagg tgaaagtga gagaaaggaa

30

<210> 136

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 136

attagaattc atgcctgggg gtccagga

28

<210> 137

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 137

attaggatcc tcacggcttc tccagctg

28

<210> 138

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-45-

<220>
<223> primer
<400> 139
attaggatcc atggccaggc tggcgttg 28

<210> 139
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer
<400> 139
attaccagca cactggtcac tcctggcctg ggtg 34

<210> 140
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> p7.5/tk promoter
<220>
<221> CDS
<222> (46)..(69)
<223>

<400> 140
ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgcc atg ggc ccg gcc 57
Met Gly Pro Ala
1

ggc aac ggc gga 69
Ala Asn Gly Gly
5

<210> 141

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-46-

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tk sequence of p7.5/tk

<400> 141

Met Gly Pro Ala Ala Asn Gly Gly
1 5

<210> 142

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pE/Itk promoter

<220>

<221> CDS

<222> (52)..(75)

<223>

<400> 142

ggccaaaaat tgaaatttta tttttttttt ttggaatata aagcggccgc c atg ggc 57
Met Gly
1ccg gcc gcc aac ggc gga 75
Pro Ala Ala Asn Gly Gly
5

<210> 143

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-47-

<220>

<223> tk sequence of pE/Ltk

<400> 143

Met Gly Pro Ala Ala Asn Gly Gly
1 5

<210> 144

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 144

aatatgcgcg cactcccagg tcacctgaa ggagtctgg 39

<210> 145

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 145

aatatgcgcg cactccgagg tgcagctggt gcagtctg 38

<210> 146

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Signal Sequence

<400> 146

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

WO 02/102855

PCT/US01/43076

-48-

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 147

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Signal Sequence

<400> 147

Asn Leu Trp Thr Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val Leu Phe Leu Leu Ser
1 5 10 15Leu Phe Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe
20 25

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/102855 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/68,
C12N 15/10, C07H 21/04, C07K 16/00, C12P 21/02(74) Agents: STEFFE, Eric, K. et al.; Sieme, Kessler, Gold-
stein & Fox P.L.L.C., Suite 600, 1100 New York Avenue,
N.W., Washington, DC 20005-3934 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/43076

(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.(22) International Filing Date:
14 November 2001 (14.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/249,268 17 November 2000 (17.11.2000) US
60/262,067 18 January 2001 (18.01.2001) US
60/271,424 27 February 2001 (27.02.2001) US
60/298,087 15 June 2001 (15.06.2001) US(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).(71) Applicant (for all designated States except US): UNIVER-
SITY OF ROCHESTER [US/US]; Office of Technology
Transfer, 518 Hyman Building, Rochester, NY 14627-0140
(US).Published:
with international search report

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ZAUDERER, Man-
rice [US/US]; 44 Woodland Road, Pittsford, NY 14534
(US). SMITH, Ernest, S. [US/US]; 328 Boston Road, On-
tario, NY 14519 (US).(88) Date of publication of the international search report:
26 June 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/102855 A3

(54) Title: IN VITRO METHODS OF PRODUCING AND IDENTIFYING IMMUNOGLOBULIN MOLECULES IN EUKARY-
OTIC CELLS

(57) Abstract: The present invention relates to a high efficiency method of expressing immunoglobulin molecules in eukaryotic cells. The invention is further drawn to a method of producing immunoglobulin heavy and light chain libraries, particularly using the trimolecular recombination method, for expression in eukaryotic cells. The invention further provides methods of selecting and screening for antigen-specific immunoglobulin molecules, and antigen-specific fragments thereof. The invention also provides kits for producing, screening and selecting antigen-specific immunoglobulin molecules. Finally, the invention provides immunoglobulin molecules, and antigen-specific fragments thereof, produced by the methods provided herein.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/43076
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C12N15/10 C07H21/04 C07K16/00 C12P21/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12N C07H C07K C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 28016 A (UNIV ROCHESTER) 18 May 2000 (2000-05-18) cited in the application page 42, line 23 -page 53, line 9; claims 1-42	1-83
A,P	SMITH E S ET AL: "Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells: application to identifying tumor antigens." NATURE MEDICINE. UNITED STATES AUG 2001, vol. 7, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 967-972, XP002234732 ISSN: 1078-8956 abstract; figure 1	1-83
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 March 2003		01/04/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3916		Authorized officer Jenn, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter national Application No PCT/US 01/43076
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MERCHLINSKY M ET AL: "Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 238, no. 2, 24 November 1997 (1997-11-24), pages 444-451, XP002107626 ISSN: 0042-6822 abstract -----	1-83
Y	WATERHOUSE P ET AL: "COMBINATORIAL INFECTION AND IN VIVO RECOMBINATION: A STRATEGY FOR MAKING LARGE PHAGE ANTIBODY REPERTOIRES" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 21, no. 9, 11 May 1993 (1993-05-11), pages 2265-2266, XP000575849 ISSN: 0305-1048 page 2265, column 1, line 1 - line 27 -----	1-83
Y	GRIFFITHS A D ET AL: "ISOLATION OF HIGH AFFINITY HUMAN ANTIBODIES DIRECTLY FROM LARGE SYNTHETIC REPERTOIRES" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 13, no. 14, 15 July 1994 (1994-07-15), pages 3245-3260, XP000455240 ISSN: 0261-4189 abstract page 3252, column 1, line 7 - line 11 -----	1-83
Y	US 5 830 721 A (CRAMER ANDREAS ET AL) 3 November 1998 (1998-11-03) claims 1-28 column 35, line 14 - line 22 column 35, line 59 - column 36, line 10 column 36, line 55 - line 58 -----	1-83
Y	WO 99 30151 A (INTERCELL BIOMEDIZINISCHE FORS ; VON GABAIN ALEXANDER (AT); HIRSH A) 17 June 1999 (1999-06-17) abstract; claims 1-27 -----	1-83

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/43076

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0028016	A	18-05-2000	WO 0028016 A1 18-05-2000
		AU 1397799 A	29-05-2000
		EP 1137769 A1	04-10-2001
		JP 2002529082 T	10-09-2002
US 5830721	A	03-11-1998	US 5605793 A 25-02-1997
		US 6355484 B1	12-03-2002
		US 2002051976 A1	02-05-2002
		US 5837458 A	17-11-1998
		US 6406855 B1	18-06-2002
		US 6335160 B1	01-01-2002
		AT 216722 T	15-05-2002
		AU 703264 B2	25-03-1999
		AU 2971495 A	04-09-1995
		DE 69526497 D1	29-05-2002
		DE 69526497 T2	21-11-2002
		DE 752008 T1	05-04-2001
		DK 752008 T3	17-06-2002
		EP 0752008 A1	08-01-1997
		JP 10500561 T	20-01-1998
		US 6413774 B1	02-07-2002
		US 6518065 B1	11-02-2003
		US 6506603 B1	14-01-2003
		AT 211761 T	15-01-2002
		CA 2182393 A1	24-08-1995
		CN 1145641 A	19-03-1997
		DE 1094108 T1	17-10-2002
		DE 69525084 D1	28-02-2002
		DE 69525084 T2	11-07-2002
		DE 934999 T1	05-04-2001
		DK 934999 T3	18-02-2002
		EP 1094108 A2	25-04-2001
		EP 1205547 A2	15-05-2002
		EP 0934999 A1	11-08-1999
		ES 2176324 T3	01-12-2002
		ES 2165652 T3	16-03-2002
		JP 2001057893 A	06-03-2001
		JP 2003033180 A	04-02-2003
		RU 2157851 C2	20-10-2000
		WO 9522625 A1	24-08-1995
		US 6180406 B1	30-01-2001
		US 6132970 A	17-10-2000
		US 6287861 B1	11-09-2001
		US 6291242 B1	18-09-2001
		US 2002025517 A1	28-02-2002
		US 6420175 B1	16-07-2002
		US 6277638 B1	21-08-2001
		US 6323030 B1	27-11-2001
		US 6319713 B1	20-11-2001
		US 6309883 B1	30-10-2001
		US 6297053 B1	02-10-2001
		US 5811238 A	22-09-1998
		US 6372497 B1	16-04-2002
		US 6344356 B1	05-02-2002
		US 6395547 B1	28-05-2002
WO 9930151	A	17-06-1999	EP 0922957 A1 16-06-1999
		AT 191276 T	15-04-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/43076

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9930151	A	AU 749042 B2	20-06-2002
		AU 1876999 A	28-06-1999
		CA 2310381 A1	17-06-1999
		DE 69701577 D1	04-05-2000
		DE 69701577 T2	23-11-2000
		WO 9930151 A1	17-06-1999
		EP 1036321 A1	20-09-2000
		JP 2001526054 T	18-12-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566	
// C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	

(31)優先権主張番号 60/298,087

(32)優先日 平成13年6月15日(2001.6.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,P T,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 スミス アーネスト エス.

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 オンタリオ ボストン ロード 328

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02

4B024 AA01 AA11 BA41 CA04 CA05 CA11 DA02 EA02 FA02 HA11

HA17

4B063 QA06 QA18 QQ08 QQ43 QQ79 QR32 QR48 QR77 QS33

4C085 AA33 CC22 DD62

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004532645A5	公开(公告)日	2006-08-10
申请号	JP2003506327	申请日	2001-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	罗彻斯特大学		
申请(专利权)人(译)	罗切斯特大学		
[标]发明人	ザウディラーモーリス スミスアーネストエス		
发明人	ザウディラー モーリス スミス アーネスト エス.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12Q1/02		
CPC分类号	C07K16/00 C07K2317/21 C07K2317/22 C07K2317/55 C07K2317/622 C12N2799/023		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.X G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA06 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4C085/AA33 4C085/CC22 4C085/DD62		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/249268 2000-11-17 US 60/262067 2001-01-18 US 60/271424 2001-02-27 US 60/298087 2001-06-15 US		
其他公开文献	JP2004532645A JP4368196B2		

摘要(译)

本发明涉及在真核细胞中表达免疫球蛋白分子的高效方法。本发明进一步公开了使用三分子重组方法在真核细胞中表达产生免疫球蛋白重链和轻链文库的方法。本发明还提供了选择和筛选抗原特异性免疫球蛋白分子及其抗原特异性片段的方法。本发明还提供了用于产生，筛选和选择抗原特异性免疫球蛋白分子的试剂盒。最后，本发明提供了通过本文提供的方法产生的免疫球蛋白分子及其抗原特异性片段。