

(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2004-525627

(P2004-525627A)

(43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(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
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
C O 7 K 16/00	C O 7 K 16/00	2 G O 5 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02	C 1 2 Q 1/04	4 B O 6 3
		4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 175 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-566325 (P2002-566325)	(71) 出願人	500182460
(86) (22) 出願日	平成14年2月20日 (2002. 2. 20)		ユニバーシティ・オブ・ジョージア・リサーチ・ファウンデーション・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月19日 (2003. 8. 19)		アメリカ合衆国 3 0 6 0 2 - 7 4 1 1 ジョージア州アセンズ、ボイド・グラデュエイト・スタディーズ・リサーチ・センター
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/004936	(71) 出願人	503299608
(87) 国際公開番号	W02002/066618		アベオメ コーポレーション
(87) 国際公開日	平成14年8月29日 (2002. 8. 29)		アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 0 3 3
(31) 優先権主張番号	60/270, 322		, デカター, ウェブスター ドライブ 6 1 0
(32) 優先日	平成13年2月20日 (2001. 2. 20)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体の迅速な産生

(57) 【要約】

本発明は、遺伝的に改変されたハイブリドーマ、骨髄腫およびB細胞に関する。本発明はまた、モノクローナル抗体を作製する方法において、遺伝的に改変されたハイブリドーマ、骨髄腫およびB細胞を利用することに関する。本発明はまた、目的のモノクローナル抗体を作製するために利用され得るハイブリドーマおよびB細胞の集団を提供する。1つの実施形態では、本発明のハイブリドーマ細胞集団は、該集団中の15%を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ハイブリドーマ細胞集団であって、該集団中の 15% を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現する、ハイブリドーマ細胞集団。

【請求項 2】

ハイブリドーマ細胞集団であって、該集団中の 25% を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現する、ハイブリドーマ細胞集団。

【請求項 3】

ハイブリドーマ細胞集団であって、該集団中の 50% を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現する、ハイブリドーマ細胞集団。

10

【請求項 4】

ハイブリドーマ細胞集団であって、該集団中の 75% を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現する、ハイブリドーマ細胞集団。

【請求項 5】

ハイブリドーマ細胞であって、20 を超えるモノクローナル抗体分子が、該細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞。

【請求項 6】

ハイブリドーマ細胞であって、50 を超えるモノクローナル抗体分子が、該細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞。

【請求項 7】

ハイブリドーマ細胞であって、100 を超えるモノクローナル抗体分子が、該細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞。

20

【請求項 8】

ハイブリドーマ細胞であって、250 を超えるモノクローナル抗体分子が、該細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞。

【請求項 9】

ハイブリドーマ細胞であって、500 を超えるモノクローナル抗体分子が、該細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞。

【請求項 10】

ハイブリドーマ細胞集団であって、ここで、該集団中の 15% を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現し、そしてここで 20 を超えるモノクローナル抗体分子が、該集団中の、モノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞集団。

30

【請求項 11】

ハイブリドーマ細胞集団であって、ここで、該集団中の 15% を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現し、そしてここで 50 を超えるモノクローナル抗体分子が、該集団中の、モノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞集団。

【請求項 12】

ハイブリドーマ細胞集団であって、ここで、該集団中の 25% を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現し、そしてここで 20 を超えるモノクローナル抗体分子が、該集団中の、モノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞集団。

40

【請求項 13】

ハイブリドーマ細胞集団であって、ここで、該集団中の 25% を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現し、そしてここで 50 を超えるモノクローナル抗体分子が、該集団中の、モノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞集団。

【請求項 14】

ハイブリドーマ細胞であって、ここで、該ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノク

50

ローナル抗体の総量の約 0.01% ~ 約 10% が、該細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞。

【請求項 15】

ハイブリドーマ細胞集団であって、ここで、該集団中の 15% を超えるハイブリドーマ細胞が、該細胞表面で該ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約 0.01% ~ 約 10% を発現する、ハイブリドーマ細胞集団。

【請求項 16】

ハイブリドーマ細胞集団であって、ここで、該集団中の 15% を超えるハイブリドーマ細胞が、該細胞表面で該ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約 0.01% ~ 約 10% を発現し、そしてここで、20 を超えるモノクローナル抗体分子が、該細胞表面に発現されて結合している、ハイブリドーマ細胞集団。

10

【請求項 17】

ベクターを含むハイブリドーマ細胞であって、ここで、該ベクターは、Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも 1 つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む、ハイブリドーマ細胞。

【請求項 18】

Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異表面発現抗体レセプターを含む、請求項 17 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 19】

Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも 1 つのキメラ表面発現抗体レセプターを含む、請求項 17 に記載のハイブリドーマ細胞。

20

【請求項 20】

前記ハイブリドーマ細胞が、Ig を含む、請求項 17 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 21】

前記ハイブリドーマ細胞が、Ig を含む、請求項 17 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 22】

前記ハイブリドーマ細胞が、Ig および Ig を含む、請求項 17 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 23】

前記変異した Ig レセプターが、Y176F、Y182F、Y193F、Y204F からなる群より選択される 1 以上の変異を含む、請求項 18 に記載のハイブリドーマ細胞。

30

【請求項 24】

前記変異した Ig レセプターが、Y176F、Y182F、Y193F、Y204F からなる群より選択される 1 以上の変異を含む、請求項 18 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 25】

前記変異した Ig レセプターが、アミノ酸残基 176 ~ 220 の欠失を含む、請求項 18 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 26】

前記変異した Ig レセプターが、Y190F および Y206F からなる群より選択される 1 以上の変異を含む、請求項 18 に記載のハイブリドーマ細胞。

40

【請求項 27】

前記ベクターが、Ig をコードする核酸を含む、請求項 17 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 28】

前記ベクターが、Ig をコードする核酸を含む、請求項 17 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 29】

前記ベクターが、Ig および Ig をコードする核酸を含む、請求項 17 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 30】

50

I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする前記核酸が、発現配列に機能的に連結している、請求項17に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項31】

前記発現配列が、誘導性発現配列である、請求項30に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項32】

前記ベクターが、前記細胞のゲノムに組み込まれている、請求項17に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項33】

前記ベクターが、前記細胞のゲノムに組み込まれていない、請求項17に記載のハイブリドーマ細胞。 10

【請求項34】

ベクターを含むハイブリドーマ細胞であって、該ベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含み、ここで、該核酸は、誘導性の機能的発現配列に連結されている、ハイブリドーマ細胞。

【請求項35】

I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを含むハイブリドーマ細胞を作製するための方法であって、ベクターを含む骨髄腫細胞をB細胞と融合して、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを含むハイブリドーマ細胞を産生する工程を包含し、ここで、該ベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む、方法。 20

【請求項36】

前記ベクターが、前記ハイブリドーマ細胞のゲノムに組み込まれる、請求項34に記載の方法。

【請求項37】

前記ベクターが、前記ハイブリドーマ細胞のゲノムに組み込まれない、請求項34に記載の方法。

【請求項38】

前記表面発現抗体レセプターをコードする前記核酸が、誘導性発現配列に機能的に連結されている、請求項34に記載の方法。 30

【請求項39】

前記骨髄腫細胞が、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの変異表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含み、ここで、該表面発現抗体レセプターをコードする該核酸が、誘導性発現配列に機能的に連結されている、請求項34に記載の方法。

【請求項40】

前記骨髄腫細胞が、Y176F、Y182F、Y193F、Y204Fからなる群より選択される1以上の変異を含む変異I g レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む、請求項39に記載の方法。 40

【請求項41】

前記骨髄腫細胞が、Y190FおよびY206Fからなる群より選択される1以上の変異を含む変異I g レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む、請求項39に記載の方法。

【請求項42】

請求項35に記載の方法によって産生される、ハイブリドーマ細胞。

【請求項43】

ベクターを含むB細胞であって、ここで、該ベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む、B細胞。

【請求項 44】

I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの変異表面発現抗体レセプターを含む、請求項 43 に記載の B 細胞。

【請求項 45】

I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つのキメラ表面発現抗体レセプターを含む、請求項 43 に記載の B 細胞。

【請求項 46】

前記ベクターが、I g をコードする核酸を含む、請求項 43 に記載の B 細胞。

【請求項 47】

前記ベクターが、I g をコードする核酸を含む、請求項 43 に記載の B 細胞。

【請求項 48】

前記ベクターが、I g および I g をコードする核酸を含む、請求項 43 に記載の B 細胞。

【請求項 49】

I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする前記核酸が、発現配列に機能的に連結している、請求項 43 に記載の B 細胞。

【請求項 50】

前記発現配列が、誘導性である、請求項 43 に記載の B 細胞。

【請求項 51】

前記変異 I g レセプターが、Y 1 7 6 F、Y 1 8 2 F、Y 1 9 3 F、Y 2 0 4 F からなる群より選択される1以上の変異を含む、請求項 44 に記載の B 細胞。

【請求項 52】

前記変異 I g レセプターが、アミノ酸残基 1 7 6 ~ 2 2 0 の欠失を含む、請求項 44 に記載の B 細胞。

【請求項 53】

前記変異 I g レセプターが、Y 1 9 0 F および Y 2 0 6 F からなる群より選択される1以上の変異を含む、請求項 44 に記載の B 細胞。

【請求項 54】

前記ベクターが、前記 B 細胞のゲノムに組み込まれている、請求項 43 に記載の B 細胞。

【請求項 55】

ベクターを含む B 細胞であって、ここで、該ベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含み、ここで該ベクターは、I g および I g をコードする核酸を含み、そしてここで該ベクターは、該 B 細胞のゲノムに組み込まれている、B 細胞。

【請求項 56】

請求項 43 に記載の B 細胞を作製する方法であって、B 細胞を、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含むベクターでトランスフェクトする工程を包含し、ここで、該表面発現抗体レセプターをコードする該核酸は、発現配列に機能的に連結されている、方法。

【請求項 57】

前記発現配列が、誘導性発現配列である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記ベクターが、前記 B 細胞のゲノムに組み込まれる、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

請求項 56 に記載の方法によって産生される、B 細胞。

【請求項 60】

I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む骨髓腫細胞であって、ここで、該表面

10

20

30

40

50

発現抗体レセプターをコードする該核酸が、誘導性発現配列に機能的に連結されている、骨髄腫細胞。

【請求項 6 1】

I g および I g からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも 1 つの核酸を含む骨髄腫細胞であって、ここで、該表面発現抗体レセプターをコードする該核酸が、誘導性発現配列に機能的に連結されている、骨髄腫細胞。

【請求項 6 2】

前記変異 I g レセプターが、Y 1 7 6 F、Y 1 8 2 F、Y 1 9 3 F、Y 2 0 4 F からなる群より選択される 1 以上の変異を含む変異 I g レセプターである、請求項 6 1 に記載の骨髄腫細胞。

10

【請求項 6 3】

前記変異 I g レセプターが、Y 1 9 0 F および Y 2 0 6 F からなる群より選択される 1 以上の変異を含む変異 I g レセプターである、請求項 6 1 に記載の骨髄腫細胞。

【請求項 6 4】

前記変異 I g レセプターが、アミノ酸残基 1 7 6 ~ 2 2 0 の欠失を含む I g である、請求項 6 1 に記載の骨髄腫細胞。

【請求項 6 5】

前記ベクターが、I g をコードする核酸を含む、請求項 6 0 に記載の骨髄腫細胞。

【請求項 6 6】

前記ベクターが、I g をコードする核酸を含む、請求項 6 0 に記載の骨髄腫細胞。

20

【請求項 6 7】

前記ベクターが、I g および I g をコードする核酸を含む、請求項 6 0 に記載の骨髄腫細胞。

【請求項 6 8】

請求項 6 0 に記載の骨髄腫を作製する方法であって、骨髄腫細胞を、I g および I g からなる群より選択される少なくとも 1 つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも 1 つの核酸でトランスフェクトする工程を包含し、ここで、該表面発現抗体レセプターをコードする該核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている、方法。

【請求項 6 9】

請求項 6 1 に記載の骨髄腫を作製する方法であって、骨髄腫細胞を、I g および I g からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも 1 つの核酸でトランスフェクトする工程を包含し、ここで、該表面発現抗体レセプターをコードする該核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている、方法。

30

【請求項 7 0】

目的のモノクローナル抗体を作製する方法であって：

a) ハイブリドーマ細胞集団を、検出可能な標識に連結されている抗原と接触させる工程であって、ここで、該集団中の 1 5 % を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現しており、ここで、該抗原は、該モノクローナル抗体に結合して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を得る、工程；

40

b) 該検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、従って、該目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定する工程；ならびに

c) 該目的のモノクローナル抗体を該ハイブリドーマ細胞から作製する工程；を包含する、方法。

【請求項 7 1】

目的のモノクローナル抗体を作製する方法であって：

a) ハイブリドーマ細胞集団を、抗原と接触させる工程であって、ここで、該集団中の 1 5 % を超える細胞が、該細胞表面に結合しているモノクローナル抗体を発現しており、ここで、該抗原は、該モノクローナル抗体に結合する、工程；

50

b) 検出可能な標識を該抗原に添加して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を与える工程；

c) 該検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、従って、該目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定する工程；ならびに

d) 該目的のモノクローナル抗体を該ハイブリドーマ細胞から作製する工程；
を包含する、方法。

【請求項 7 2】

前記検出可能な標識が、蛍光標識であり、そして前記ハイブリドーマ細胞が、蛍光活性化細胞選別を介して単離される、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記検出可能な標識が、蛍光標識であり、そして前記ハイブリドーマ細胞が、蛍光活性化細胞選別を介して単離される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

請求項 7 0 に記載の方法によって産生される、モノクローナル抗体。

【請求項 7 5】

請求項 7 1 に記載の方法によって産生される、モノクローナル抗体。

【請求項 7 6】

目的のモノクローナル抗体を作製する方法であって：

a) ハイブリドーマ細胞集団を、検出可能な標識に連結されている抗原と接触させる工程であって、ここで、20 を超えるモノクローナル抗体分子が、該細胞表面に発現されて結合しており、ここで、該抗原は、該モノクローナル抗体に結合して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を与える、工程；

b) 該検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、従って、該目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定する工程；

c) 該目的のモノクローナル抗体を該ハイブリドーマ細胞から作製する工程；
を包含する、方法。

【請求項 7 7】

目的のモノクローナル抗体を作製する方法であって：

a) ハイブリドーマ細胞を抗原と接触させる工程であって、ここで、20 より多くのモノクローナル抗体分子が発現されて該細胞表面に結合しており、ここで、該抗原は、該モノクローナル抗体に結合する、工程；

b) 検出可能な標識を該抗原に添加して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を得る工程；

c) 該検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、従って、該目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定する工程；ならびに

d) 該目的のモノクローナル抗体を該ハイブリドーマ細胞から作製する工程；
を包含する、方法。

【請求項 7 8】

前記検出可能な標識が、蛍光標識であり、そして前記ハイブリドーマ細胞が、蛍光活性化細胞選別を介して単離される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記検出可能な標識が、蛍光標識であり、そして前記ハイブリドーマ細胞が、蛍光活性化細胞選別を介して単離される、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 8 0】

請求項 7 6 に記載の方法によって産生される、モノクローナル抗体。

【請求項 8 1】

請求項 7 7 に記載の方法によって産生される、モノクローナル抗体。

【請求項 8 2】

本発明はまた、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供し、該方法は：

a) ベクターを含む B 細胞を、検出可能な標識に連結した抗原と接触させる工程であって

10

20

30

40

50

、ここで、該ベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含み、ここで、該抗原は、該モノクローナル抗体に結合して、検出可能に標識されたB細胞が得られる、工程；

b) 該検出可能に標識されたB細胞を単離し、従って、該目的のモノクローナル抗体を産生するB細胞を同定する工程；ならびに

c) 該目的のモノクローナル抗体を作製する工程；

を包含する、方法。

【請求項83】

本発明はまた、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供し、該方法は：

a) ベクターを含むB細胞を、抗原と接触させる工程であって、ここで、該ベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む、工程；

b) 該抗原に結合する検出可能な標識を添加して、検出可能に標識されたB細胞を得る工程；

c) 該検出可能に標識されたB細胞を単離し、従って該目的のモノクローナル抗体を産生するB細胞を同定する工程；ならびに

d) 該目的のモノクローナル抗体を作製する工程；

を包含する、方法。

【請求項84】

前記検出可能な標識が、蛍光標識であり、そして前記ハイブリドーマ細胞が、蛍光活性化細胞選別を介して単離される、請求項82に記載の方法。

【請求項85】

前記検出可能な標識が、蛍光標識であり、そして前記ハイブリドーマ細胞が、蛍光活性化細胞選別を介して単離される、請求項83に記載の方法。

【請求項86】

請求項82に記載の方法によって産生される、モノクローナル抗体。

【請求項87】

請求項83に記載の方法によって産生される、モノクローナル抗体。

【請求項88】

選択された抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製する方法であって：

a) マウスを該抗原で免疫する工程；

b) 該免疫されたマウス由来のB細胞を、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む黒色腫細胞と融合して、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を産生する工程であって、ここで、該ハイブリドーマ細胞によって産生される該モノクローナル抗体は、発現されて該細胞表面に結合される、工程；

c) 該モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を該抗原と接触させる工程であって、ここで、該抗原は、該細胞表面上の該モノクローナル抗体に結合して、検出可能なハイブリドーマ細胞を産生する、工程、

d) 該ハイブリドーマ細胞を検出する工程；ならびに

e) 該ハイブリドーマ細胞を単離し、従って特定の抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製する工程；

を包含する、方法。

【請求項89】

前記抗原が、検出可能な標識に連結している、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

選択された抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製する方法であって：

a) 請求項43に記載のB細胞を抗原と接触させる工程であって、ここで、該抗原は、該

モノクローナル抗体に結合して、検出可能な B 細胞を生じる、工程；

b) 該 B 細胞を検出する工程；

c) 該 B 細胞を単離し、従って目的のモノクローナル抗体を産生する B 細胞を同定する工程；および

d) 該目的のモノクローナル抗体を産生する該 B 細胞を黒色腫細胞と融合して、選択された抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を産生する工程；を包含する、方法。

【請求項 9 1】

前記抗原が、検出可能な標識に連結している、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

ベクターを含む B 細胞を含むトランスジェニック動物であって、ここで、該ベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも 1 つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む、トランスジェニック動物。

【請求項 9 3】

前記 B 細胞が、I g および I g からなる群より選択される少なくとも 1 つの表面発現抗体レセプターを含む、請求項 9 2 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 9 4】

前記 B 細胞が、I g および I g からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異表面発現抗体レセプターを含む、請求項 9 2 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 9 5】

前記 B 細胞が、I g および I g からなる群より選択される少なくとも 1 つのキメラ表面発現抗体レセプターを含む、請求項 9 2 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 9 6】

変異した I g レセプターが、Y 1 7 6 F、Y 1 8 2 F、Y 1 9 3 F、Y 2 0 4 F からなる群より選択される 1 以上の変異を含む、請求項 9 2 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 9 7】

変異した I g レセプターが、Y 1 9 0 F および Y 2 0 6 F からなる群より選択される 1 以上の変異を含む、請求項 9 2 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 9 8】

請求項 9 2 に記載のトランスジェニック動物を作製する方法であって：

a) 発現配列に機能的に連結された、I g をコードする核酸を含む導入遺伝子、および / または発現配列に機能的に連結された、I g をコードする核酸を含む導入遺伝子を胚に注入する工程；

b) 該胚を動物へと発生させる工程；

を包含する、方法。

【請求項 9 9】

請求項 7 3 に記載の動物を、第二の動物と交配して、第三の動物を産生する工程をさらに包含する、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記動物が、マウスである、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記動物が、ウサギである、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記動物が、ラットである、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記動物が、モルモットである、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記導入遺伝子の発現が、誘導性である、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記導入遺伝子の発現が、c r e - l o x 発現系によって制御される、請求項 9 2 に記載

10

20

30

40

50

のトランスジェニック動物。

【請求項 106】

前記導入遺伝子の発現が、誘導性テトラサイクリンプロモーター系によって制御される、請求項 92 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 107】

特定の抗原を認識するモノクローナル抗体を産生する細胞を同定する方法であって：

- a) 請求項 92 に記載の動物を、前記抗原で免疫する工程；
- b) 前記 B 細胞を工程 a) の動物から単離する工程；
- c) 工程 b) の該細胞を、該抗原と接触させる工程であって、ここで、該抗原は、該モノクローナル抗体に結合して、検出可能な B 細胞を生じる、工程；
- d) 該検出可能な B 細胞を単離し、従って特定の抗原を認識するモノクローナル抗体を産生する細胞を同定する工程；

10

を包含する、方法。

【請求項 108】

前記検出可能な標識が、蛍光標識であり、そして前記ハイブリドーマ細胞が、蛍光活性化細胞選別を介して単離される、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

請求項 98 に記載の方法によって産生される、トランスジェニック動物。

【請求項 110】

請求項 92 に記載の動物から得られる、B 細胞。

20

【請求項 111】

ベクターを含む造血幹細胞であって、ここで、該ベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも 1 つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む、造血幹細胞。

【請求項 112】

I g および / または I g をコードする余分なコピーの核酸を含む、ハイブリドーマ細胞。

【請求項 113】

前記核酸が、I g をコードする、請求項 112 に記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項 114】

I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含むハイブリドーマ細胞集団であって、該細胞集団は、該細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、ここで、該モノクローナル抗体が蛍光によって検出される場合、該細胞集団の蛍光強度は、I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 2 倍強い、細胞集団。

30

【請求項 115】

前記蛍光強度が、少なくとも 5 倍強い、請求項 114 に記載の集団。

【請求項 116】

前記蛍光強度が、少なくとも 10 倍強い、請求項 114 に記載の集団。

【請求項 117】

前記蛍光強度が、少なくとも 25 倍強い、請求項 114 に記載の集団。

40

【請求項 118】

前記蛍光強度が、少なくとも 50 倍強い、請求項 114 に記載の集団。

【請求項 119】

前記蛍光強度が、少なくとも 100 倍強い、請求項 114 に記載の集団。

【請求項 120】

前記ハイブリドーマ細胞が、I g をコードする核酸を含むベクターを含む、請求項 114 に記載の集団。

【請求項 121】

前記集団が、25 細胞と 250 細胞との間である、請求項 114 に記載の集団。

50

【請求項 1 2 2】

I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含む形質細胞集団であって、該細胞集団は、該細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、ここで、該モノクローナル抗体が蛍光によって検出される場合、該細胞集団の蛍光強度は、I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 2 倍強い、細胞集団。

【請求項 1 2 3】

前記蛍光強度が、少なくとも 5 倍強い、請求項 1 2 2 に記載の集団。

【請求項 1 2 4】

前記蛍光強度が、少なくとも 10 倍強い、請求項 1 2 2 に記載の集団。

10

【請求項 1 2 5】

前記蛍光強度が、少なくとも 25 倍強い、請求項 1 2 2 に記載の集団。

【請求項 1 2 6】

前記蛍光強度が、少なくとも 50 倍強い、請求項 1 2 2 に記載の集団。

【請求項 1 2 7】

前記蛍光強度が、少なくとも 100 倍強い、請求項 1 2 2 に記載の集団。

【請求項 1 2 8】

前記形質細胞が、I g をコードする核酸を含むベクターを含む、請求項 1 2 2 に記載の集団。

【請求項 1 2 9】

前記集団が、25 細胞と 250 細胞との間である、請求項 1 2 2 に記載の集団。

20

【請求項 1 3 0】

I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含むハイブリドーマ細胞集団であって、該細胞集団は、該細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、ここで、該モノクローナル抗体が蛍光によって検出される場合、該細胞の少なくとも 10 % の蛍光強度は、I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 2 倍強い、細胞集団。

【請求項 1 3 1】

前記細胞の少なくとも 25 % の蛍光強度が、I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 2 倍強い、請求項 1 3 0 に記載の集団。

30

【請求項 1 3 2】

前記細胞の少なくとも 50 % の蛍光強度が、I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 2 倍強い、請求項 1 3 0 に記載の集団。

【請求項 1 3 3】

前記細胞の少なくとも 75 % の蛍光強度が、I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 2 倍強い、請求項 1 3 0 に記載の集団。

【請求項 1 3 4】

前記細胞の少なくとも 10 % の蛍光強度が、I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 3 倍強い、請求項 1 3 0 に記載の集団。

40

【請求項 1 3 5】

前記細胞の少なくとも 10 % の蛍光強度が、I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 5 倍強い、請求項 1 3 0 に記載の集団。

【請求項 1 3 6】

前記細胞の少なくとも 10 % の蛍光強度が、I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 10 倍

50

強い、請求項 130 に記載の集団。

【請求項 137】

前記ハイブリドーマ細胞が、Ig をコードする核酸を含むベクターを含む、請求項 130 に記載の集団。

【請求項 138】

前記集団が、25細胞～250細胞の間である、請求項 130 に記載の集団。

【請求項 139】

Ig および/または Ig をコードする核酸を含むベクターを含む形質細胞集団であって、該細胞集団は、該細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、ここで、該モノクローナル抗体が蛍光によって検出される場合、該細胞の少なくとも 10% の蛍光強度は、Ig および/または Ig をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 2 倍強い、細胞集団。

10

【請求項 140】

前記細胞の少なくとも 25% の蛍光強度が、Ig および/または Ig をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 2 倍強い、請求項 139 に記載の集団。

【請求項 141】

前記細胞の少なくとも 50% の蛍光強度が、Ig および/または Ig をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 2 倍強い、請求項 139 に記載の集団。

20

【請求項 142】

前記細胞の少なくとも 75% の蛍光強度が、Ig および/または Ig をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 2 倍強い、請求項 139 に記載の集団。

【請求項 143】

前記細胞の少なくとも 10% の蛍光強度が、Ig および/または Ig をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 3 倍強い、請求項 139 に記載の集団。

【請求項 144】

前記細胞の少なくとも 10% の蛍光強度が、Ig および/または Ig をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 5 倍強い、請求項 139 に記載の集団。

30

【請求項 145】

前記細胞の少なくとも 10% の蛍光強度が、Ig および/または Ig をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも 10 倍強い、請求項 139 に記載の集団。

【請求項 146】

前記形質細胞が、Ig をコードする核酸を含むベクターを含む、請求項 139 に記載の集団。

【請求項 147】

前記集団が、25細胞～250細胞の間である、請求項 139 に記載の集団。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2001年2月20日出願の米国仮出願番号60/270,322(その全体が、本明細書によって参考として援用される)の優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、遺伝的に変更されたハイブリドーマ、骨髄腫およびB細胞に関する。本発明はまた、モノクローナル抗体を作製する方法において、遺伝的に変更されたハイブリドーマ

50

、骨髄腫およびB細胞を利用することに関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

機能的ゲノミクスおよびプロテオミクスにおける広範な試みは、タンパク質機能研究のために使用されるモノクローナル抗体についての空前の需要を創出している。モノクローナル抗体は、タンパク質標的の発見および特徴付け(精製、定量ならびに器官および細胞局在を含む)を含む、研究のすべての段階において、使用され得る。プロテオミクスにおける最近の進歩は、高スループット研究における使用およびタンパク質チップ上での使用のための、多数の抗体についての必要性を創出している。モノクローナル抗体は、数十年間にわたって、臨床的診断における重要な試薬として使用されており、重要な新規クラスの治療剤として浮上している。

10

【0004】

ハイブリドーマ技術は、モノクローナル抗体を入手するために最も一般に使用される方法である。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞から分泌され、正常な抗体産生脾臓B細胞を、不死化骨髄腫細胞または他の不死化細胞と融合させることによって作製される。ハイブリドーマ作製は、26年前に始まったときからほとんど変化していない(KohlerおよびMilstein、1975)。

【0005】

ハイブリドーマ作製のための代表的なプロトコールは、以下を含む：(i)動物(例えば、マウス、ラットまたはウサギ)を、精製タンパク質抗原で免疫する工程；(ii)抗体産生B細胞を、代表的には脾臓から回収する工程；(iii)B細胞を、酵素ヒポキサンチンゲンシンホスホリボシルトランスフェラーゼを欠失した非分泌骨髄腫細胞株(例えば、BALB/cマウス株由来のx63-Ag8.653)と融合させる工程；(iv)ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(HAT)を含む選択培地中で、ハイブリドーマ細胞を増殖させる工程；および(v)所望の抗体を産生する細胞をスクリーニングする工程；および(vi)限界希釈クローニングをして、抗体を分泌する同質な細胞株を獲得する工程(Antczak、1982)。

20

【0006】

従来ハイブリドーマ技術では、異なる抗原に対する多数の抗体、または単一の標的抗原に対する多数の抗体を、効率的な様式で研究者が入手することはできない。限界希釈によってクローニングされるハイブリドーマ細胞は、モノクローナル抗体の産生において、おそらく最も問題があり、時間を消費し、そして労働集約的な工程である(O'Reillyら、1998)。この工程において、細胞を、繰り返し希釈して細胞数を減らし、そしてその上清を、分泌されたモノクローナル抗体についてアッセイした。スクリーニングは、所望のハイブリドーマが失われていないことを確認するために、巧妙に実行する必要がある。迅速に増殖するハイブリドーマの場合、細胞は、より大きい管または新鮮な培地に直ちに移されない場合、栄養素の枯渇によって、マイクロタイターウェルの中で死ぬ。また、いくつかのハイブリドーマを含む代表的なウェルにおいて、所望でないハイブリドーマは、所望のハイブリドーマよりも連続的に増殖し過ぎ得る。このことは、限界希釈工程を、数週間または数ヶ月まで引き伸ばし得、重要なハイブリドーマの損失を生じさえし得る。ハイブリドーマがアッセイ時間までに妥当なサイズまで増殖しない場合、これらは、検出に十分な抗体を産生し得ない。従って、上清をスクリーニングする時間は、慎重に選択されるべきである。最初のスクリーニングについて利用可能な「ウインドウ」は大きくなく、通常2~3日にわたって拡大する(Antczak、1982)。一旦開始されると、純粋な細胞株の限界希釈単離は、代表的には任意の1つのハイブリドーマについて3~4週間にわたって続く。

30

40

【0007】

所望のハイブリドーマ細胞を単離するより迅速な方法についての必要性が存在する。少なくとも2つの研究室が、抗体の表面提示の追跡に基づいて、正常なハイブリドーマを分類

50

することを試みた (Parksら、1979; Meilhocら、1989)。彼らは、任意の集団中のハイブリドーマ細胞のサブセットが、小さいが測定可能な数(約20)の表面抗体分子を提示したことを示した。抗原が高度に蛍光性のマイクロスフィアと連結されて、蛍光シグナルを増大させた場合、このことは、抗原で標識された場合にこれらの細胞を分類するために十分である。これらの高度に蛍光性のスフィアを用いてさえ、このシグナルは、バックグラウンドの数倍でしかなかった。

【0008】

ハイブリドーマ細胞上の表面抗体提示の有意な増加についての必要性、および任意の集団中の表面抗体を提示するハイブリドーマ細胞の割合を有意に増加させて、迅速なスクリーニングを可能にする必要性が存在する。本発明は、DISH(ハイブリドーマ細胞の直接的スクリーニング)を提供することによって、これら両方を提供する。本発明のDISH技術は、数週間ではなく数時間で達成され得る、単純で迅速かつ信頼性のあるハイブリドーマ細胞の選択を提供する。DISHは、従来のハイブリドーマ技術を超えるいくつかの有意な改善を提供し、これにより、研究者が、有効な様式で多数の抗体レパートリーを入手することを可能にする。現在のハイブリドーマプロトコールを使用して、約40,000の融合体が、代表的には調製される。より多い融合体が作製されない主な理由は、限界希釈を使用して所望のクローンを単離する際に遭遇する困難である。DISHは、蛍光活性化細胞分別(FACS)および他の様式を使用して、非常に迅速で高スループットの細胞選択を可能にする。FACS技術は、数百万の細胞が、数時間で分別されることを可能にするので、DISH技術を使用してスクリーニングされ得るハイブリドーマ融合体の数は、限界希釈によるよりも規模が大きい。重要なことに、FACS分類は、別個のウェルへの所望の単一細胞のハイブリドーマ堆積を可能にする。従って、所望ではあるがゆっくり増殖する細胞が失われる問題は、DISHを使用して排除される。従って、DISHは、現在の抗体スクリーニングおよび限界希釈手順を、迅速で高スループットの選択プロセスで置換する。本発明はまた、適切な免疫グロブリンを表面提示する形質細胞の集団を提供するために利用されて、単一の形質細胞が標的抗原と反応する免疫グロブリンを産生するか否かを決定するために使用される、高スループットの蛍光活性化細胞分別技術を可能にし得る。

10

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

30

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、ここで、集団中の15%より多くの細胞が、この細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する。

【0010】

また本発明は、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、ここで、集団中の25%より多くの細胞が、この細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する。

【0011】

さらに、ハイブリドーマ細胞集団が提供され、ここで、集団中の50%より多くの細胞が、この細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する。

40

【0012】

また本発明は、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、ここで、集団中の75%より多くの細胞が、この細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する。

【0013】

本発明はまた、ハイブリドーマ細胞を提供し、ここで、20より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そして細胞表面に結合している。

【0014】

本発明はさらに、ハイブリドーマ細胞を提供し、ここで、50より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そして細胞表面に結合している。

【0015】

50

また本発明は、ハイブリドーマ細胞を提供し、ここで、100より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そして細胞表面に結合している。

【0016】

本発明はさらに、ハイブリドーマ細胞を提供し、ここで、250より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そして細胞表面に結合している。

【0017】

また本発明は、ハイブリドーマ細胞を提供し、ここで、500より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そして細胞表面に結合している。

【0018】

本発明はさらに、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、ここで、集団中の15%より多い細胞が、この細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、そして20より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そしてモノクローナル抗体を発現する集団中の細胞の細胞表面に結合している。 10

【0019】

また本発明は、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、ここで、集団中の15%より多い細胞が、この細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、そして50より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そしてモノクローナル抗体を発現する集団中の細胞の細胞表面に結合している。

【0020】

本発明はさらに、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、ここで、集団中の25%より多い細胞が、この細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、そして20より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そしてモノクローナル抗体を発現する集団中の細胞の細胞表面に結合している。 20

【0021】

本発明はまた、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、ここで、集団中の25%より多い細胞が、この細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、そして50より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そしてモノクローナル抗体を発現する集団中の細胞の細胞表面に結合している。

【0022】

本発明はまた、ハイブリドーマ細胞を提供し、ここで、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約0.01%~約10%が発現され、そして細胞表面に結合している。 30

【0023】

本発明はまた、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、ここで、集団中の15%より多いハイブリドーマ細胞が、ハイブリドーマ細胞によってこの細胞表面上に産生されるモノクローナル抗体の総量の約0.01%~約10%を発現する。

【0024】

本発明はさらに、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、ここで、集団中の15%より多いハイブリドーマ細胞が、ハイブリドーマ細胞によってこの細胞表面上に産生されるモノクローナル抗体の総量の約0.01%~約10%を発現し、そして20より多いモノクローナル抗体が発現され、そして細胞表面に結合している。 40

【0025】

本発明はまた、ベクターを含むハイブリドーマ細胞を提供し、ここで、このベクターは、Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む。

【0026】

本発明はさらに、ベクターを含むハイブリドーマ細胞を提供し、ここで、このベクターは、Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含み、この核酸は、誘導性の機能的発現配列に連結されている。

【0027】

本発明はまた、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを含むハイブリドーマ細胞を作製する方法を提供し、この方法は、ベクターを含む骨髄腫細胞をB細胞と融合させて、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを含むハイブリドーマ細胞を作製する工程を包含し、ここで、このベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む。

【0028】

本発明はまた、ベクターを含むB細胞を提供し、ここで、このベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む。

10

【0029】

本発明はまた、ベクターを含むB細胞を提供し、ここで、このベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含み、このベクターは、I g および I g をコードする核酸を含み、そしてこのベクターは、B細胞のゲノムに組み込まれている。

【0030】

本発明はまた、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む、骨髄腫細胞を提供し、ここで、この表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

20

【0031】

本発明はまた、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの変異した表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む、骨髄腫細胞を提供し、ここで、この表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

【0032】

本発明はまた、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：a)ハイブリドーマ細胞集団を、検出可能な標識に連結された抗原と接触させる工程であって、この集団中の15%より多い細胞は、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、この抗原は、このモノクローナル抗体に結合して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を得る、工程；b)検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、それによって、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定する工程；ならびにc)このハイブリドーマ細胞から、目的のモノクローナル抗体を作製する工程。

30

【0033】

本発明はまた、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：a)ハイブリドーマ細胞集団を抗原と接触させる工程であって、この集団中の15%より多い細胞は細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、この抗原はこのモノクローナル抗体に結合する、工程；b)検出可能な標識を抗原に付加して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を得る工程；c)検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、それによって、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定する工程；ならびにd)このハイブリドーマ細胞から、目的のモノクローナル抗体を作製する工程。

40

【0034】

本発明はさらに、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：a)ハイブリドーマ細胞を検出可能な標識に連結された抗原と接触させて、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を得る工程であって、ここで、20より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そして細胞表面に結合し、この抗原はモノクローナル抗体に結合する、工程；b)検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、それによって、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定する工程

50

；ならびに c) このハイブリドーマ細胞から、目的のモノクローナル抗体を作製する工程。

【 0 0 3 5 】

本発明は、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する： a) ハイブリドーマ細胞を抗原と接触させる工程であって、ここで、20より多いモノクローナル抗体分子が発現され、そして細胞表面に結合し、この抗原はモノクローナル抗体に結合する、工程； b) 検出可能な標識を抗原に付加して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を得る工程； c) 検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、それによって、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定する工程；ならびに d) このハイブリドーマ細胞から、目的のモノクローナル抗体を作製する工程。

10

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する： a) ベクターを含む B 細胞を検出可能な標識に連結された抗原と接触させて、検出可能に標識された B 細胞を得る工程であって、ここで、このベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含み、この抗原は、このモノクローナル抗体に結合する、工程； b) 検出可能に標識された B 細胞を単離し、それによって、目的のモノクローナル抗体を産生する B 細胞を同定する工程；ならびに c) 目的のモノクローナル抗体を作製する工程。

20

【 0 0 3 7 】

本発明はまた、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する： a) ベクターを含む B 細胞を抗原と接触させる工程であって、ここで、このベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む、工程； b) 抗原に結合する検出可能な標識を付加して、検出可能に標識された B 細胞を得る工程； c) 検出可能に標識された B 細胞を単離し、それによって、目的のモノクローナル抗体を産生する B 細胞を同定する工程；ならびに d) 目的のモノクローナル抗体を作製する工程。

30

【 0 0 3 8 】

本発明はまた、選択された抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する： a) この抗原でマウスを免疫する工程； b) 免疫されたマウス由来の B 細胞を骨髓腫細胞と接触させて、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を作製する工程であって、この骨髓腫細胞は、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含み、ここで、このハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体が発現され、細胞表面に結合している、工程； c) このモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を抗原と接触させて、検出可能なハイブリドーマ細胞を作製する工程であって、この抗原は、細胞表面上のモノクローナル抗体に結合する、工程； d) このハイブリドーマ細胞を検出する工程；ならびに e) ハイブリドーマ細胞を単離し、それによって、特定の抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製する工程。

40

【 0 0 3 9 】

本発明はまた、ベクターを含む B 細胞を含むトランスジェニック動物を提供し、このベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む。

【 0 0 4 0 】

本発明はまた、ベクターを含む造血幹細胞を提供し、このベクターは、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む。

【 0 0 4 1 】

本発明はさらに、I g および / または I g をコードする核酸を含むベクターを含むハ

50

イブリドーマ細胞集団を提供し、このハイブリドーマ細胞は、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、ここで、このモノクローナル抗体が蛍光によって検出される場合、この細胞の少なくとも10%の蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも2倍大きい。

【0042】

本発明はまた、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含む形質細胞集団を提供し、この形質細胞は、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、ここで、このモノクローナル抗体が蛍光によって検出される場合、この細胞集団の蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞

10

【0043】

本発明はまた、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含むハイブリドーマ細胞集団を提供し、このハイブリドーマ細胞は、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、ここで、このモノクローナル抗体が蛍光によって検出される場合、この細胞の少なくとも10%の蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも2倍大きい。

【0044】

本発明はさらに、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含む形質細胞集団を提供し、この形質細胞は、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現し、ここで、このモノクローナル抗体が蛍光によって検出される場合、この細胞の少なくとも10%の蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞集団の蛍光強度よりも少なくとも2倍大きい。

20

【0045】

(発明の詳細な説明)

本発明は、以下の本発明の好ましい実施形態の詳細な説明を参照することにより、より容易に理解され得る。

【0046】

本発明の方法を開示および記載する前に、本発明は、特定の構築物、分子、および方法に限定されず、当然変化し得ることが理解される。本明細書中で使用する用語は、特定の実施形態を説明する目的のみのためであり、限定することを意図しないこともまた理解される。

30

【0047】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈上そうでないことが明確に示されない限り、複数の参照を含むことに注意されたい。例えば、細胞(a cell)は、単一の細胞または1つより多い細胞を意味し得る。

【0048】

(ハイブリドーマ)

本発明は、ハイブリドーマ細胞の集団を提供する。この集団中の細胞の15%よりも多くは、細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現する。その集団中の細胞の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%(またはその中間の数値)よりも多くが、細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明により提供される。

40

【0049】

本明細書中で使用する場合、「ハイブリドーマ」は、抗体産生細胞(例えば、B細胞)と不死化細胞(例えば、骨髄腫細胞)とを融合することにより作製される細胞または細胞株である。本明細書中で使用する場合、「B細胞」は、未成熟B細胞、成熟ナイーブB細胞

50

、成熟活性化B細胞、メモリーB細胞、B系統リンパ球、形質細胞、あるいはヒト起源または非ヒト動物供給源由来の任意の他のB系統細胞を意味する。本発明のハイブリドーマは、ヒト起源または非ヒト動物供給源由来のB細胞と不死化細胞株とを、適切な融合剤（例えば、ポリエチレングリコール）を用いて融合し、ハイブリドーマ細胞を形成することにより作製され得る（Goding、「Monoclonal Antibodies: Principles and Practice」Academic Press、（1986）pp.59-103）。

【0050】

ハイブリドーマの作製のためにB細胞を獲得するために、マウスまたは他の適切な宿主動物は、代表的に、免疫剤または抗原で免疫されて、その免疫剤または抗原に特異的に結合する抗体を産生するかまたは産生し得るB細胞が誘発される。あるいは、B細胞は、インビトロで免疫され得る。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシ、およびヒト起源の骨髄腫細胞である。通常、ラットまたはマウス骨髄腫細胞株が用いられる。ハイブリドーマ細胞は、適切な培養培地において培養され得る。培養培地は、好ましくは、融合していない、不死化細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含む。例えば、HATは、DISHのために必要でないけれども、代表的に、親細胞が酵素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（HGPRTまたはHPR T）を欠失している場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的に、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（「HAT培地」）を含む。これらの物質は、HGPRT欠損細胞の増殖を防止する。

【0051】

好ましい不死化細胞株は、効果的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の高レベルの発現を支持し、そして培地に感受性である細胞株である。不死化細胞株は、HAT培地に感受性であり得る。より好ましい不死化細胞株は、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. および American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Mdから入手可能なマウス骨髄腫株である。ヒト骨髄腫細胞株およびマウス-ヒト異種骨髄腫細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている（Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984) および Brodeurら、「Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications」、Marcel Dekker, Inc., New York、（1987）pp.51-63）。例えば、以下の骨髄腫細胞株が、ATCCから入手され得る：MOPC-31C、RPMI8226、IM-9、MPC-11、CCL-189、HK-PEG-1、HS-Sultan、A2B5クローン105、P3X63Ag8.653、Sp2/0-Ag14、Sp2/0-Ag14/SF、P3X63Ag8U.1、HFN36.3HFN7.1、45.6TG1.7、ARH-77、Y3-Ag1.2.3、SJK-132-20、SJK-287-38、およびSJK-237-71。

【0052】

本発明のハイブリドーマ細胞は、表面発現についてアッセイされ得、そしてハイブリドーマ細胞を培養する培養培地は、当該分野で公知の方法（例えば、ELISA、ウエスタンブロット、FACS、磁気分離等）により、所望の免疫原に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。ハイブリドーマ細胞により分泌されるモノクローナル抗体の結合特異性は、例えば、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ（例えば、放射性免疫アッセイ（RIA）または酵素連結イムノソルベントアッセイ（ELISA））により決定され得る。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munsonら、Anal. Biochem., 107:220 (1980) のスキッチャード分析により決定され得る。

【0053】

表面発現をアッセイすることによるか、または培養培地をアッセイすることによるかのい

10

20

30

40

50

ずれかによって、所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、選択されたハイブリドーマ細胞は、標準的な方法により増殖され得る。この目的のために適切な培養培地として、例えば、Dulbecco's Modified Eagle's MediumおよびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物における腹水としてインビボで増殖され得る。

【0054】

本明細書中で使用する場合、「ハイブリドーマ細胞の集団」は、抗体を発現する細胞のパーセンテージが決定され得るような十分な数の細胞を意味する。この集団のハイブリドーマ細胞は、この系統の細胞の全てが特定の抗原に特異的な1つのみのモノクローナル抗体を産生する純粋なハイブリドーマ細胞株由来の細胞か、または複数のモノクローナル抗体を産生する細胞の混合物であり得る。従って、ハイブリドーマ細胞の集団は、1つより多いモノクローナル抗体を産生し得、その結果、いくつかの細胞は、1つの抗原を認識するモノクローナル抗体を産生し、そしてこの集団の他の細胞は、第2の抗原を認識するモノクローナル抗体を産生し、そしてこの集団の他の細胞は、第3の抗原を認識するモノクローナル抗体を産生する、などである。

10

【0055】

本明細書中で使用する場合、「発現する」は、モノクローナル抗体が、当該分野で標準的な手段（例えば、現在当該分野で実施されているような、ウエスタンブロット、ELISA、免疫蛍光、溶血アッセイ、蛍光活性化細胞分離（FACS））により検出され得ることを意味する。

20

【0056】

抗体は、代表的に、特定の抗原に対する結合特異性を示すタンパク質である。ネイティブの抗体は、通常、2つの同一の軽（L）鎖および2つの同一の重（H）鎖で構成されるヘテロテトラマー糖タンパク質である。代表的に、各々の軽鎖は、1つの共有結合性ジスルフィド結合により重鎖に連結されているが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変化する。各々の重鎖および軽鎖は、規則正しい間隔を空けた鎖内ジスルフィド架橋を有し得る。各々の重鎖は、1つの末端に可変ドメイン（V（H））およびそれに続く多くの定常ドメインを有し得る。各々の軽鎖は、1つの末端に可変ドメイン（V（L））および他方の末端に定常ドメインを有し得る。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと整列され、そして軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間の境界面を形成すると考えられている。任意の脊椎種由来の抗体の軽鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、2つの明らかに異なる型（カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる）のうちの1つを割り当てられ得る。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは、異なるクラスを割り当てられ得る。現在、5つの主要な免疫グロブリンのクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMが存在し、そしてこれらのいくつかはさらに、サブクラス（アイソタイプ）（例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3、およびIgG-4；IgA-1およびIgA-2）に分類され得る。本発明は、Ig および/またはIg への結合を通じて全ての免疫グロブリンクラスの提示を提供する。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 μ 、 δ 、 γ 、 ϵ 、および μ と呼ばれる。

30

40

【0057】

免疫グロブリン（Ig）重鎖遺伝子は、代表的に、複数のポリ（A）部位を有する複雑な転写単位であり、切断およびポリアデニル化機構における変化がB細胞の部位特異的な発現において重要な役割を果たし得る。Ig μ 重鎖は、プレ、未成熟、成熟B細胞およびIgM+形質細胞において発現され得る。 δ 、 γ 、および ϵ 重鎖は、それぞれ、メモリー形質細胞ならびにIgA+、IgE+、およびIgG+形質細胞において発現され得る（JanewayおよびTravers, 1994）。5つのクラスのIg重鎖遺伝子（ δ 、 γ 、 ϵ 、 μ ）の各々由来のRNAは、選択的なプロセッシングを受けて、2つの型のmRNAを生成し得る：1つは、Igタンパク質の分泌形態をコードし、形質細胞における

50

プロモーターに近位の弱い I g s e c (分泌特異的) ポリ(A) 部位の使用により産生される; もう一方の m R N A は、成熟 B 細胞またはメモリー B 細胞の表面上の抗原に対する膜結合(m b) レセプターをコードし、そして、下流の強力な I g 膜ポリ(A) 部位の使用により産生され得る [A l t、1980; R o g e r s、1980; R o g e r s、1981]。

【0058】

異なる B 細胞段階における I g 遺伝子の転写速度において、2 ~ 5 倍の変化が存在し得る (K e l l y および P e r r y、1986)。末端部位は、 μ において変化し得る (G a l l i s、1987; G u i s e s、1988; Y u a n および T u c k e r、1984) が、 δ および ϵ 遺伝子においては変化しない (F l a s p o h l e r s、1995; F l a s p o h l e r および M i l c a r e k、1990; L e b m a n s、1992)。RNA プロセッシング事象は、1985 年に最初に示されたように、2 つの形態の I g G 重鎖 m R N A の比率を決定する上で重要な役割を果たし得る (M i l c a r e k および H a l l、1985)。RNA プロセッシングについての厳格な役割は、さらに実証されている (E d w a l d s - G i l b e r t および M i l c a r e k、1995; E d w a l d s - G i l b e r t および M i l c a r e k、1995; F l a s p o h l e r s、1995; F l a s p o h l e r および M i l c a r e k、1990; G e n o v e s e s、1991; G e n o v e s e および M i l c a r e k、1990; H a l l および M i l c a r e k、1989; K o b r i n s、1986; L a s s m a n s、1992; L a s s m a n および M i l c a r e k、1992; M a t i s s、1996; M i l c a r e k、1996 を参照のこと)。 (E d w a l d s - G i l b e r t s、1997) もまた参照のこと。弱い分泌特異的ポリ(A) 部位(膜特異的ポリ(A) 部位に対してプロモーター近位である)でのポリアデニル化および最後の分泌特異的なエキソンにおける最適以下のスプライス部位での膜特異的エキソンに対するスプライシングは、相互に相容れない事象であり得る。前駆体 RNA の切断およびポリアデニル化における変化は、第 1 の弱いポリ(A) 部位の使用に対する形質細胞におけるバランスを壊すことが示される。

【0059】

用語「可変」は、抗体間で配列が異なり、そして各々の特定の抗体のその特定の抗原への結合および特異性において使用される可変ドメインの特定の部分を記載するために本明細書中で使用される。しかし、可変性は、通常、抗体の可変ドメインを通して等しく分散していない。それは、代表的に、相補性決定領域(C D R)と呼ばれる 3 つのセグメントまたは軽鎖および重鎖の可変ドメインの両方における超可変領域に集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク(F R)と呼ばれる。ネイティブの重鎖および軽鎖の可変ドメインは、各々、3 つの C D R (これらは、シート構造を連結し、そしていくつかの場合、 β -シート構造の一部を形成するループを形成する)により接続された 4 つの F R 領域(大部分が、 β -シート構造を取っている)を含み得る。各々の鎖の C D R は、F R 領域によって近接して一緒に保持され得、そして他の鎖からの C D R と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与し得る (K a b a t E . A . s、" S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t " N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h、B e t h e s d a、M d . (1 9 8 7) を参照のこと)。定常ドメインは、代表的に、抗体の抗原への結合に直接的に関与しないが、種々のエフェクター機能(例えば、抗体依存的細胞毒性における抗体の関与)を示す。

【0060】

本明細書中で使用する場合「モノクローナル抗体」は、単一の抗体を産生する細胞型に全て由来する細胞により産生され、そして抗原に対する特異的な親和性を有する抗体をいう。モノクローナル抗体は、実質的に均一な集団の抗体から獲得される(すなわち、この集団を構成する個々の抗体は、微量で存在し得る起こり得る天然に存在する変異を除いて同一である)。本発明のハイブリドーマ細胞により分泌されるモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順(例えば、プロテイン A - S e p h a r o s e、ヒドロキシル

10

20

30

40

50

アパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、または親和性クロマトグラフィー)により、培養培地または腹水液から単離または精製され得る。

【0061】

一旦、本発明によりハイブリドーマが単離されると、ハイブリドーマの抗体コード領域は、組換えDNA方法(例えば、米国特許第4,816,567号または同第6,331,415号に記載される方法)によりモノクローナル抗体を作製するために使用され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより)容易に単離され、配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として利用される。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに配置され得、次いで、宿主細胞(例えば、そうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髄腫細胞)にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成が得られる。DNAはまた、例えば、ヒト重鎖および軽鎖の定常ドメインのコード配列を、相同なマウス配列の代りに置換することによるか(米国特許第4,816,567号)、あるいは非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てまたは一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することにより改変され得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインと置換され得るか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインと置換され得、1つの抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位および異なる抗原に対する特異性を有する第2の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体が作製される。

10

20

【0062】

本発明はまた、20よりも多いモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞を提供する。50よりも多いモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞もまた、本発明により提供される。100よりも多いモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞がさらに、本発明により提供される。本発明はまた、250よりも多いモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞を提供する。500よりも多いモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞もまた、本発明により提供される。これらの数の間の抗体数もまた、提供される。

30

【0063】

集団中の15%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、20個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

【0064】

集団中の15%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、50個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

40

【0065】

集団中の15%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、100個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

【0066】

本発明はまた、集団中の15%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、250個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団を提供する。

50

【0067】

集団中の15%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、500個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

【0068】

集団中の25%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、20個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

10

【0069】

集団中の25%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、50個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

【0070】

集団中の25%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、100個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

20

【0071】

本発明はまた、集団中の25%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、250個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団を提供する。

【0072】

集団中の25%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、500個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

30

【0073】

集団中の50%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、20個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

【0074】

集団中の50%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、50個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

40

【0075】

集団中の50%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、100個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

【0076】

本発明はまた、集団中の50%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、250個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団を提供する。

50

【0077】

集団中の50%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、500個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

【0078】

集団中の75%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、20個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

10

【0079】

集団中の75%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、50個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

【0080】

集団中の75%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、100個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

20

【0081】

本発明はまた、集団中の75%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、250個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団を提供する。

【0082】

集団中の75%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、500個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

30

【0083】

集団中の90%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、20個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

【0084】

集団中の90%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、50個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

40

【0085】

集団中の90%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、100個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

【0086】

本発明はまた、集団中の90%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、250個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団を提供する。

50

【 0 0 8 7 】

集団中の90%より多くの細胞が、その細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現し、そして、500個より多くのモノクローナル抗体分子が、発現され、かつその集団中のモノクローナル抗体を発現する細胞の細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。

【 0 0 8 8 】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約0.001%~約10%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。

【 0 0 8 9 】

上記の細胞のパーセンテージと細胞当たりの抗体数との任意の組み合わせもまた提供され、特に列挙される細胞のパーセンテージおよび細胞当たりの抗体数の間の数も同様に提供される。

10

【 0 0 9 0 】

細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量は、当該分野の標準的な方法のうちのいずれか（これには、ウエスタンブロット、ELISA、免疫蛍光およびFACSが挙げられるが、これらに限定されない）によって決定され得る。これらの方法を利用して、細胞によって培地中に分泌された抗体の量、細胞表面に結合した抗体の量、および細胞中に存在する細胞内抗体の量を測定する。当業者は、細胞によって産生される抗体の総量を得るために上記の技術もしくは当業者に公知の他の技術を用いてこれらの量を測定する方法を認識し、その結果、発現され、かつ細胞表面に結合した抗体の総量のパーセンテージが得られる。

20

【 0 0 9 1 】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約0.01%~約10%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。

【 0 0 9 2 】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約10%~約20%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。

30

【 0 0 9 3 】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約20%~約30%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。

【 0 0 9 4 】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約30%~約40%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。

【 0 0 9 5 】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約40%~約50%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。

40

【 0 0 9 6 】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約50%~約60%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。

【 0 0 9 7 】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約60%~約70%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。

50

【0098】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約70%~約80%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。

【0099】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約80%~約90%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。

【0100】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量のうちの約90%~約100%が発現され、そして細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞もまた、本発明によって提供される。 10

【0101】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約0.01%~約10%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約0.01%~約10%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。 20

【0102】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約10%~約20%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約10%~約20%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

【0103】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約20%~約30%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約20%~約30%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。 30

【0104】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約30%~約40%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約30%~約40%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。 40

【0105】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約40%~約50%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75% 50

、 80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約40%～約50%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

【0106】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約50%～約60%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約50%～約60%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

10

【0107】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約60%～約70%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約60%～約70%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

20

【0108】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約70%～約80%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約70%～約80%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

【0109】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約80%～約90%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約80%～約90%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

30

【0110】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約90%～約100%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団が、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約90%～約100%をその細胞表面上に発現する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

40

【0111】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約0.01%～約10%をその細胞表面上に発現し、そして20個より多くのモノクローナル抗体が、発現され、かつその細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%

50

、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約0.01%~約10%をその細胞表面上に発現し、そして、その集団の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くは、20個より多くのモノクローナル抗体が発現されかつその細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞である、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

【0112】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約10%~約20%をその細胞表面上に発現し、そして20個より多くのモノクローナル抗体が、発現され、かつその細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約10%~約20%をその細胞表面上に発現し、そして、その集団の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くは、20個より多くのモノクローナル抗体が発現されかつその細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞である、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

10

20

【0113】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約20%~約30%をその細胞表面上に発現し、そして20個より多くのモノクローナル抗体が、発現され、かつその細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約20%~約30%をその細胞表面上に発現し、そして、その集団の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くは、20個より多くのモノクローナル抗体が発現されかつその細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞である、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

30

【0114】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約30%~約40%をその細胞表面上に発現し、そして20個より多くのモノクローナル抗体が、発現され、かつその細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約30%~約40%をその細胞表面上に発現し、そして、その集団の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くは、20個より多くのモノクローナル抗体が発現されかつその細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞である、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

40

【0115】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約40%~約50%をその細胞表面上に発現し、そして20個より多くのモノクローナル抗体が、発現され、かつその細胞表面に結合する、ハ

50

イブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約40%～約50%をその細胞表面上に発現し、そして、その集団の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くは、20個より多くのモノクローナル抗体が発現されかつその細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞である、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

【0116】

集団中の15%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約50%～約60%をその細胞表面上に発現し、そして20個より多くのモノクローナル抗体が、発現され、かつその細胞表面に結合する、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によってさらに提供される。集団中の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くのハイブリドーマ細胞が、そのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の総量の約50%～約60%をその細胞表面上に発現し、そして、その集団の20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くは、20個より多くのモノクローナル抗体が発現されかつその細胞表面に結合するハイブリドーマ細胞である、ハイブリドーマ細胞の集団もまた、本発明によって提供される。

【0117】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約60%～約70%を発現し、そして20個を超えるモノクローナル抗体が、発現されそしてその細胞表面に結合される。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約60%～約70%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、20個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

【0118】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約70%～約80%を発現し、そして20個を超えるモノクローナル抗体が、発現されそしてその細胞表面に結合される。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約70%～約80%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、20個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

【0119】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団

10

20

30

40

50

中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約80%~約90%を発現し、そして20個を超えるモノクローナル抗体が、発現されそしてその細胞表面に結合される。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約80%~約90%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、20個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

10

【0120】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約90%~約100%を発現し、そして20個を超えるモノクローナル抗体が、発現されそしてその細胞表面に結合される。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約90%~約100%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、20個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

20

【0121】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約0.01%~約10%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約0.01%~約10%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

30

40

【0122】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約10%~約20%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞によ

50

り產生されるモノクローナル抗体の総量の約10%~約20%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

【0123】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により產生されるモノクローナル抗体の総量の約20%~約30%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により產生されるモノクローナル抗体の総量の約20%~約30%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

10

20

【0124】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により產生されるモノクローナル抗体の総量の約30%~約40%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により產生されるモノクローナル抗体の総量の約30%~約40%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

30

【0125】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により產生されるモノクローナル抗体の総量の約40%~約50%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により產生されるモノクローナル抗体の総量の約40%~約50%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

40

50

【0126】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約50%～約60%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約50%～約60%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

10

【0127】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約60%～約70%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約60%～約70%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

20

30

【0128】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約70%～約80%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約70%～約80%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

40

【0129】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約80%～約90%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、50個、100個、250

50

個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約80%~約90%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

10

【0130】

本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約90%~約100%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの15%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。本発明によって、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団において、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、細胞表面上にそのハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の総量の約90%~約100%を発現し、そして、その集団中のハイブリドーマ細胞のうちの20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%より多くが、50個、100個、250個または500個を超えるモノクローナル抗体が発現されそしてその細胞表面に結合されるハイブリドーマ細胞である。

20

【0131】

本発明によって、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を含む、ハイブリドーマ細胞集団がまた提供され、この集団は、コントロール細胞(すなわち、標準的ハイブリドーマ細胞)よりも細胞表面上に約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍多くの抗体を有する。

30

【0132】

本発明によって、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する、Ig および/またはIg をコードする核酸を含むベクターを含む、ハイブリドーマ細胞集団がさらに提供され、この集団において、そのモノクローナル抗体が蛍光により検出される場合、その細胞集団の蛍光強度は、Ig および/またはIg をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度より少なくとも2倍大きい。

【0133】

本発明はまた、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する、Ig および/またはIg をコードする核酸を含むベクターを含む、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、この集団において、そのモノクローナル抗体が蛍光により検出される場合、その細胞集団の蛍光強度は、Ig および/またはIg をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度より少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、250倍、500倍、1000倍またはその間の任意の量大きい。その蛍光強度の増加倍数はまた、上記に列挙した増加倍数の間の任意の量であり得る。その蛍光強度の増加倍数は、当該分野で標準的な方法および実施例において本願明細書中に記載される方法によって、測定され得る。

40

【0134】

蛍光強度を測定するために利用され得るハイブリドーマ細胞の集団は、25個の細胞と500個の細胞との間であり得る。従って、その集団は、約25個、50個、75個、10

50

0個、125個、150個、175個、200個、225個、250個、275個、300個、325個、350個、375個、400個、425個、450個、475個、500個の細胞、またはこれらの値の間の任意の数の細胞であり得る。

【0135】

この集団中のハイブリドーマは、I g をコードする核酸を含むベクターを含み得る。

【0136】

本発明によって、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含む、ハイブリドーマ細胞集団がさらに提供され、この集団において、そのモノクローナル抗体が蛍光により検出される場合、それらの細胞のうちの少なくとも10%の蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度より少なくとも2倍大きい。

10

【0137】

本発明はまた、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含む、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、この集団において、そのモノクローナル抗体が蛍光により検出される場合、それらの細胞のうちの少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはこれらの間の任意のパーセンテージの蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度より少なくとも2倍大きい。

20

【0138】

本発明はまた、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含む、ハイブリドーマ細胞集団を提供し、この集団において、そのモノクローナル抗体が蛍光により検出される場合、それらの細胞のうちの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはこれらの間の任意のパーセンテージの蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まないハイブリドーマ細胞集団の蛍光強度より少なくとも2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、250倍、500倍、1,000倍またはこれらの間の任意の量大きい。

30

【0139】

さらに、本発明によって、ベクターを含むハイブリドーマ細胞が提供され、この細胞において、そのベクターは、I g およびI g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む。従って、このハイブリドーマは、I g をコードする核酸を含むベクターを含み得るか、またはこのハイブリドーマは、I g をコードする核酸を含むベクターを含み得るか、またはこのハイブリドーマは、I g をコードする核酸およびI g をコードする核酸の両方を含み得る。I g またはI g をコードする核酸は、単一のベクター中に存在しても、または複数のベクター中に存在してもよい。例えば、このハイブリドーマは、I g をコードする核酸を含むベクターとI g をコードする核酸を含むベクターとを含み得るか、またはI g の核酸配列およびI g の核酸配列の両方を含むベクターを含み得る。これらのベクターのいずれかが、上記細胞のゲノム中に組み込まれ得るか、またはI g および/またはI g の一過性発現が可能であるように染色体外に保有され得る。

40

【0140】

本明細書中で使用される場合、用語「核酸」は、DNAであっても、RNAであっても、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい、一本鎖または複数鎖の分子を指し、それらの核酸に対する改変を包含する。この核酸は、コード鎖もしくはその相補体、またはそれらの任意の組み合わせを示し得る。核酸は、本明細書中に考察されるI g レセプターおよびI g レセプターについて天然に存在する配列と、配列が同一であり得るか、または天然に存在する配列中に見出されるのと同じアミノ酸をコードする代替的コドン

50

含み得る。その核酸が機能的レセプターをコードする限り、欠失、置換、変異、およびそれらの組み合わせを含む、I g をコードする核酸配列およびI g をコードする核酸配列もまた、企図される。これらの核酸はまた、その代表的構造から改変され得る。そのような改変としては、メチル化核酸、硫黄によるリン酸残基上の非結合酸素の置換（ホスホロチオエートデオキシヌクレオチドを生じる）、セレンウムによるリン酸残基上の非結合酸素の置換（ホスホルセレノエートデオキシヌクレオチドを生じる）、またはメチル基によるリン酸残基上の非結合酸素の置換（メチルホスホネートデオキシヌクレオチドを生じる）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0141】

I g レセプターの核酸配列は、登録番号NM__007655を介してGenBankから入手可能であり、この核酸配列によりコードされるポリペプチドは、登録番号NP__031681を介してGenBankから入手可能である。本明細書中に記載される実施例において利用されたI g をコードする核酸配列は、登録番号NM__007655を介してGenBankから入手可能本来のI g レセプターとは異なるが、Sakaguchiらにより提供される配列と一致する。この配列は、図3に提供される。

【0142】

I g をコードする核酸分子およびI g をコードする核酸分子は、それが通常見出される生物から単離され得る。例えば、ゲノムDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーが、目的の核酸の存在下で構築およびスクリーニングされ得る。このようなライブラリーを構築およびスクリーニングするための方法は、当該分野で周知であり、そしてその構築工程およびスクリーニング工程を実施するためのキットは、市販されている（例えば、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA）。一旦単離されると、その核酸は、適切なベクター中に直接クローニングされ得るか、または必要な場合は、その後のクローニング工程を容易にするように改変され得る。このような改変工程は、慣用的であり、その例は、制限酵素切断部位を含むオリゴヌクレオチドリンカーをその核酸の末端に付加することである。一般的な方法は、Sambrookら「Molecular Cloning, a Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に示されている。

【0143】

一旦、所望のI g および/またはI g の核酸配列が得られると、特定のアミノ酸をコードする配列が、当該分野で周知の技術によって、任意の特定のアミノ酸一で改変または変化され得る。例えば、そのアミノ酸位置に広がり、かつ任意のアミノ酸を別のアミノ酸で置換し得る、PCRプライマーが設計され得る。その後、核酸は、増幅され、そして野生型レセプターコード配列中に挿入され得、そのレセプターの任意の位置のアミノ酸の多数の可能な組み合わせが得られ得る。あるいは、当業者は、点変異誘発のための技術を介して、特定の核酸配列中の任意の点にて特異的変異を誘導し得る。一般的な方法は、Smith, M. 「In vitro mutagenesis」Ann. Rev. Gen., 19: 423 - 462 (1985) およびZoller, M. J. 「New molecular biology methods for protein engineering」Curr. Opin. Struct. Biol. 1: 605 - 610 (1991)に示される。これらのような技術は、コードされるアミノ酸配列を変更することなく、コード配列を変更するために使用され得る。

【0144】

I g をコードするDNA分子を得る方法の別の例は、I g をコードする組換えDNA分子を合成することである。I g をコードする核酸もまた、この様式で得られ得る。例えば、オリゴヌクレオチド合成手順は、当該分野で慣用的であり、そして特定のタンパク質領域をコードするオリゴヌクレオチドは、自動DNA合成を介して容易に入手可能である。二本鎖分子のうちの本の核酸が、合成され得、そしてその相補鎖にハイブリダイズされ得る。生じる二本鎖分子が、適切なベクター中へのクローニングのために、内部制限

酵素切断部位または末端に適切な5'突出もしくは3'突出のいずれかを有するように、これらのオリゴヌクレオチドを設計し得る。比較的大きなタンパク質をコードする二本鎖分子が、まず、そのタンパク質の特定の領域をコードするいくつかの異なる二本鎖分子を構築すること、ついで、これらの分子と一緒に連結することによって、容易に合成され得る。例えば、Cunninghamら「Receptor and Antibody Epitopes in Human Growth Hormone Identified by Homolog-Scanning Mutagenesis」Science 243:1330-1336(1989)は、まず、重複する相補的合成オリゴヌクレオチドを構築し、これらのフラグメントと一緒に連結することによって、ヒト成長ホルモン遺伝子をコードする合成遺伝子を構築した。また、Ferrettiら、Proc. Nat. Acad. Sci. 82:599-603(1986)も参照のこと。Ferrettiらにおいて、合成オリゴヌクレオチドからの1057塩基対の合成ウシロドプシン遺伝子の合成が、開示されている。この様式で核酸を構築することによって、当業者は、Ig またはIg 内の任意の特定の位置に所望のアミノ酸を有する、任意の特定のIg またはIg を容易に入手し得る。また、合成遺伝子を作製する酵素鋳型反応方法を記載する、米国特許第5,503,995号も参照のこと。このような技術は、当該分野で慣用的であり、そして十分に記載されている。その後、これらの核酸またはIg もしくはIg をコードする核酸のフラグメントが、下記のようにインビボまたはインビトロで発現され得る。同様に、核酸または核酸フラグメントが、インビボまたはインビトロで発現され得る。

10

20

【0145】

一旦、Ig をコードする核酸またはその核酸の領域が、構築され、修飾され、または単離されると、その核酸は、適切なベクターにクローン化され得、その核酸は、その野生型および/または改変されたIg レセプタータンパク質のインビボまたはインビトロの合成を指向し得る。また、一旦、Ig をコードする核酸またはその核酸の領域が、構築され、修飾され、または単離されると、その核酸は、適切なベクターにクローン化され得、その核酸は、その野生型および/または改変されたIg レセプタータンパク質のインビボまたはインビトロの合成を指向し得る。そのベクターは、その挿入された遺伝子または核酸の転写を指向または調節するのに必要な機能エレメントを有することが企図される。これらの機能エレメントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：プロモーター、そのプロモーターの上流または下流の領域（例えば、そのプロモーターの転写活性を調節し得るエンハンサー）、複製起点、そのプロモーターに隣接する挿入物のクローニングを容易にする適切な制限部位、そのベクターを含む細胞またはその挿入物を含むベクターを選択する役割を担い得る抗生物質抵抗性遺伝子または他のマーカー、RNAスプライスジャンクション、転写停止領域あるいは挿入された遺伝子またはハイブリッド遺伝子の発現を容易にすることを担い得る任意の他の領域（一般的には、Sambrookらを参照のこと）。Ig および/またはIg の余分なコピーをコードするDNAまたはRNAを、Ig および/またはIg がそのレセプターの発現の増大を生じる限り、さらなる機能エレメント（例えば、裸のDNAまたはRNA）の非存在下で、直接的に細胞にトランスフェクトし得た。

30

40

【0146】

本発明のIg およびIg をコードする核酸を含むベクターは、当該分野において公知であるような真核生物細胞における核酸の発現に適切な任意のベクターであり得る。例えば、pcDNA3.1 NeoRベクターまたはpcDNA3.1 Zeo(Invitrogen, Inc. Life Sciences Division)が、使用され得る。他のベクターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Invitrogen製2ベクター誘導系(pINDプラスミドおよびpVgRXRプラスミド)、Clontech製2ベクター誘導系(pTet-ONプラスミドまたはpTet-OffプラスミドおよびpTRE2プラスミド)、Promega製の構成性発現のための単一プラスミド(pCIプラスミドベクターまたはpSIプラスミドベクター)、Stra

50

t a g e n e 製 2 ベクター誘導系 (p C M V L a c I プラスミドおよび p O P R S V I / M C S プラスミド)、 S t r a t a g e n e 製の単一プラスミド誘導系 (p E R V 3 プラスミドまたは p E G S H プラスミド) ならびに S t r a t a g e n e 製の単一レトロウイルス誘導系 (p C F B - E G S H レトロウイルスまたは p F B - E R V レトロウイルス)。このベクターはまた、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、シュードタイプレトロウイルスベクター (p s e u d o t y p e d r e t r o v i r a l v e c t o r) またはボックスウイルス (例えば、ワクシニアウイルスベクター) のようなウイルスベクターであり得る。

【 0 1 4 7 】

本発明はまた、ベクターを含むハイブリドーマ細胞を提供し、ここで、このベクターは、 I g および I g からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む。従って、本発明は、変異 I g レセプターをコードする核酸を含むベクターを含むハイブリドーマ細胞、変異 I g レセプターをコードする核酸を含むベクターを含むハイブリドーマ細胞、ならびに変異 I g レセプターをコードする核酸および変異 I g レセプターをコードする核酸の両方を含むベクターを含むハイブリドーマ細胞、を提供する。 10

【 0 1 4 8 】

変異 I g レセプターおよび変異 I g レセプターは、変化した細胞質ドメインを有する非シグナル伝達レセプターを含む。このような変異レセプターの例は、アミノ酸残基 1 7 6、1 8 2、1 9 3、および 2 0 4 で変異を含む I g レセプターである。本発明の変異した I g レセプターはまた、 Y 1 7 6 F、Y 1 8 2 F、Y 1 9 3 F および Y 2 0 4 F からなる群より選択される 1 以上の変異を含む変異した I g を含む。本発明によってさらに提供されるのは、アミノ酸残基 1 7 6 ~ 2 2 0 の欠失を含む変異した I g レセプターである。変異表面発現抗原レセプターの別の例は、アミノ酸残基 1 9 0 および 2 0 6 で変異を含む変異した I g レセプターである。本発明の変異した I g レセプターはまた、 Y 1 9 0 F および Y 2 0 6 F からなる群より選択される、1 以上の変異を含む変異 I g レセプターを含む。この I g および I g について、本明細書中に記載されるこれらの変異は、このレセプターが、抗体を結合する能力を保持するが、シグナル伝達レセプターとして作用し得ないように設計される。当業者は、上記のような I g および I g をコードする核酸を操作する方法ならびに本明細書中に記載される変異レセプターおよび他の変異レセプターを得るための当該分野で公知の他の技術を知っている。 20 30

【 0 1 4 9 】

本発明はまた、ベクターを含むハイブリドーマ細胞を提供し、ここで、このベクターは、 I g および I g からなる群より選択される少なくとも 1 つのキメラ表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む。この用途に使用されるとき、「キメラ」とは、その細胞表面レセプターが、ある種 (例えば、ヒト) のレセプター配列および別の種に由来する配列および別の種由来のレセプター配列を含み得ることを意味する。例えば、キメラ I g は、ヒト I g 細胞外ドメインならびにマウス I g 膜貫通ドメインおよびマウス細胞内 (細胞質) ドメインを含み得るか、または、キメラ I g は、ヒト I g 細胞外ドメインおよびヒト膜貫通ドメインならびにマウス細胞内ドメインを含み得る。同様に、キメラ I g は、ヒト I g 細胞外ドメインならびにマウス I g 膜貫通ドメインおよびマウス細胞内ドメインを含み得るか、または、キメラ I g はヒト I g 細胞外ドメインおよびヒト膜貫通ドメインならびにマウス細胞内ドメインを含み得る。他の種 (例えば、ニワトリ、イヌ、ウサギ、ラット、スナネズミおよびハムスター) に由来するレセプター配列はまた、本発明のキメラレセプターを作製するために使用され得る。キメラレセプターの他の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ウサギ N 末端細胞外レセプタードメイン、マウス膜貫通ドメインおよびマウス C 末端細胞内ドメインを含む、キメラ I g レセプターまたはキメラ I g レセプター；ニワトリ N 末端ドメイン、マウス膜貫通ドメイン、およびマウス C 末端ドメインを含む、キメラレセプター；マウス N 末端細胞外ドメイン、ニワトリ膜貫通ドメインおよびニワトリ C 末端細胞内シグナル伝達ドメインを 40 50

含む、キメラレセプター；マウスN末端細胞外ドメイン、ウサギ膜貫通ドメインおよびヒトC末端細胞内シグナル伝達ドメインを含む、キメラレセプター；マウスN末端細胞外ドメイン、ヒト膜貫通ドメインおよびマウス由来の変異C末端細胞内非シグナル伝達ドメインを含むキメラレセプター。

【0150】

本発明のキメラレセプターはまた、Ig またはIg 由来の配列および別の非関連配列を含むキメラレセプターも含む。例えば、本発明は、細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインIg ドメインおよび細胞内Igドメインを伴って、非関連タンパク質（例えば、CD8または任意の他のタンパク質）由来の細胞外ドメインを含むキメラIg レセプターを企図する。

10

【0151】

本発明はさらに、ベクターを含むハイブリドーマ細胞を提供し、このベクターは、Ig およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含み、ここで、この核酸は、誘導的な機能発現配列に連結する。

【0152】

Ig およびIg をコードする全ての配列は、発現配列に機能的に連結する。この発現配列は、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、ならびに必要な情報処理部位（例えば、リボゾーム結合部位、RNAプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写停止配列）を含み得る。使用されるプロモーターは、構成性プロモーターまたは誘導性プロモーターであり得る。

20

【0153】

本発明の組成物および方法のために使用され得る誘導性発現系は、IPTGに基づく調節系、テトラサイクリンに基づく調節系、CIDに基づく調節系、エクジソンに基づく調節系、およびエストロゲンに基づく調節系を含む。Burcinら、"A Regulatory System for Target Gene Expression" *Frontiers in Bioscience*, 3:1-7 (1998) は、これらの系を、詳細に記載し、これらの誘導性発現系を記載する目的のために、本明細書中でその全体が参考として援用される。使用され得る別の誘導系は、cre-lox系である(Lakso "Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice" *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6861-65 (1992); Orbanら、"Tissue and site-specific DNA recombination in transgenic mice" *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6861-65 (1992); Guら、"Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting" *Science* 265:103-106 (1994) を参照のこと)。本発明の核酸はまた、誘導性メタロチオネイン(metallothioneine)プロモーターの制御下であり得る(CoxおよびManess "Neurite extension and protein tyrosine phosphorylation elicited by inducible expression of the v-src oncogene in a PC12 cell line" *Exp Cell Res* 195:423-31 (1991) を参照のこと)。

30

40

【0154】

Ig およびIg からなる群より選択される、少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含むベクターを含むことに加えて、本発明のハイブリドーマはまた、分泌形態の免疫グロブリンM発現を阻害することに関連する酵素であるU1Aをコードする核酸を含むベクターを含み得る(Phillipsら、"Regulation of nuclear poly(A) addition controls the e

50

expression of immunoglobulin M secretory mRNA", EMBO 22:6443-6452(2001)を参照のこと)。

【0155】

この用途において記載される全てのハイブリドーマ細胞は、目的のモノクローナル抗体を作製するために本明細書中に記載される方法において使用され得る。

【0156】

(ハイブリドーマの作製方法)

Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを含むハイブリドーマ細胞を作製する方法もまた、本発明によって提供され、この方法は、ベクターを含む骨髄腫細胞とB細胞とを融合して、Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを含むハイブリドーマ細胞を生成する工程であって、このベクターがIg および/またはIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む、工程を包含する。

【0157】

本発明のハイブリドーマ細胞を作製する方法において、このベクターは、細胞のゲノムに組み込まれ得る。このベクターはまた、この細胞内で染色体外に保持され得、従って、Ig および Ig の一過性発現を可能にし得る。本発明のハイブリドーマを作製する方法において、Ig および Ig をコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結し得る。誘導性発現系は、上記において議論される。

【0158】

本発明の骨髄腫細胞は、Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含み得、ここで、この表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結する。本発明の骨髄腫細胞はまた、変異Ig レセプターおよび/または変異Ig レセプターを含み得る。このような変異レセプターの例は、アミノ酸残基176、182、193、および204において変異を含むIg レセプターである。本発明の変異Ig はまた、Y176F、Y182F、Y193FおよびY204Fからなる群より選択される1以上の変異を含む変異されたIg を含む。本発明によってさらに提供されるものは、アミノ酸176~220の欠失を含む変異Ig レセプターをコードする核酸を含む骨髄腫細胞である。変異表面発現抗体レセプターの別の例は、アミノ酸残基190および206での変異を含む変異Ig レセプターである。本発明の変異Ig レセプターはまた、Y190FおよびY206Fからなる群より選択される1以上の変異を含む変異Ig レセプターを含む。本発明の骨髄腫細胞は、変異Ig レセプターをコードするベクターを含む骨髄腫細胞、変異Ig レセプターを含むベクターを含む骨髄腫細胞、または変異Ig レセプターおよび変異Ig レセプターを含むベクターを含む骨髄腫細胞であり得る。

【0159】

本発明の方法において使用される骨髄腫細胞はまた、キメラIg レセプターおよび/またはキメラIg レセプターをコードする核酸を含み得る。

【0160】

(B細胞)

本発明はまた、ベクターを含むB細胞を提供し、ここで、このベクターは、Ig および Ig からなる群より選択される、少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む。従って、本発明のB細胞は、Ig をコードする核酸を含むベクターまたはIg をコードする核酸を含むベクター、あるいはIg および Ig の両方をコードする核酸を含むベクターを含み得る。

【0161】

本発明のB細胞はまた、変異Ig レセプターおよび/または変異Ig レセプターをコードする核酸を含むベクターを含み得る。このような変異レセプターの例は、アミノ酸残基176、182、193および204での変異を含むIg レセプターである。本発明の変異Ig レセプターはまた、Y176F、Y182F、Y193FおよびY204F

からなる群より選択される1以上の変異を含む変異Igを含む。アミノ酸残基176～220の欠失を含む変異Igレセプターをコードする核酸を含むベクターを含むB細胞が、本発明によってさらに提供される。変異表面発現抗体レセプターの別の例は、アミノ酸残基190および206での変異を含む変異Igレセプターである。本発明の変異Igレセプターはまた、Y190FおよびY206Fからなる群より選択される1以上の変異を含む変異Igレセプターも含む。本発明のB細胞は、変異Igレセプターをコードするベクターを含むB細胞、変異Igレセプターをコードするベクターを含むB細胞、または変異Igレセプターおよび変異Igレセプターをコードするベクターを含むB細胞であり得る。本発明のB細胞はまた、キメラIgレセプターおよび/またはキメラIgレセプターをコードする核酸を含み得る。

10

【0162】

本発明はまた、ベクターを含むB細胞を提供し、ここで、このベクターは、IgおよびIgをコードする核酸を含み、ここで、IgおよびIgをコードするこの核酸は誘導性発現配列に機能的に連結し、そして、ここで、IgおよびIgをコードするこの核酸は、この細胞のゲノムに組み込まれる。このようなB細胞は、本明細書に記載のトランスジェニック動物から得られ得る。

【0163】

本発明はまた、ベクターを含むB細胞を作製する方法を提供し、ここで、このベクターは、IgおよびIgからなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含み、この方法は、IgおよびIgからなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含むベクターでB細胞をトランスフェクトする工程を包含し、ここで、この表面発現抗体レセプターをコードする核酸は機能的に発現配列に連結している。本発明のB細胞を作製する方法において、IgおよびIgをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結され得る。本発明のB細胞を作製する方法において、IgおよびIgからなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含むベクターは、このB細胞のゲノムに組み込まれ得る。あるいは、このベクターは、この細胞のゲノムに組み込まれず、そして、このベクターは、染色体外に保持され、Igおよび/またはIgの一過性発現を可能にする。

20

【0164】

本発明のベクターは、当該分野で公知の任意の技術を使用して細胞にトランスフェクトされ得る。例えば、リポフェクトアミン(lipofectamine)トランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソーム送達および粒子銃衝撃(particle gun bombardment)が、全て、細胞へのベクター送達を行うために使用され得る。

30

【0165】

動物の脾臓から取り出したB細胞をトランスフェクトするために、B細胞を24～48時間、これらが分裂するように、培養物の中で増殖させる。次いで、IgおよびIgからなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能にコードする少なくとも1つの核酸を含む核酸を含むレトロウイルスベクターは、この細胞にトランスフェクトされ得る。増殖を促進するために、サイトカインが、この培養物に添加され得る。これらの方法において使用され得るサイトカインとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IFN、および/またはTGF-。次いで、これらの細胞表面に結合した抗体を産生するB細胞は、当該分野で公知であり、そして、本明細書中に記載される方法(例えば、FACS、細胞パニング、ELISA、など)によって検出され得る。あるいは、例えば、以下のようなウイルスベクターが、B細胞をトランスフェクトするために使用され得る；アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ベクター、ワクシニアウイルスベクター、シュードタイプレトロウイルスベクター。当業者は、ベクターによってトランスフェクトされる能力についてB細胞を試験して、これらの細胞に核酸を導入するのに最も適切なベクター

40

50

を選択する方法を理解している。当業者はまた、本発明のB細胞を操作し、特定のベクターによって認識される細胞表面レセプターを産生し得る。例えば、本発明のB細胞は、アデノウイルスに対する細胞表面レセプターが、このB細胞表面上に存在させ、このB細胞へのこのアデノウイルスベクターの侵入を容易にするように、操作され得る。あるいは、このB細胞に導入された(Ig およびIg 以外の)レセプターに結合するリガンドを含む、ウイルスベクターがまた、ベクター移入を行うために使用され得る。これらの細胞表面レセプターの存在は、本明細書または当該分野のほかの場所に記載される、誘導性発現系によって制御され得、その結果、トランスフェクション後に、ウイルスの侵入に必要な細胞表面レセプターの発現は、もはや誘導されず、従って、このレセプターは、もはや、このB細胞の細胞表面に発現されない。次いで、これらのB細胞は、不死化細胞(例えば、天然に存在する骨髄腫細胞)または遺伝的に改変された骨髄腫細胞(例えば、目的のモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞株を作製するために本明細書中で提供された骨髄腫細胞株)と融合され得る。あるいは、この抗体のアミノ酸配列もしくはその所望の一部分(例えば、このようなB細胞によって産生された可変領域)、またはこのような抗体もしくはその一部分をコードする核酸(cDNA)が、決定または単離され得る。次いで、このようなDNA配列は、このような抗体の発現および分泌を指向するベクターに取りこまれ得、そして、このようなベクターは、宿主細胞(例えば、骨髄腫または他の適切な不死化細胞)にトランスフェクトされ得る。このような抗体配列決定をトランスフェクトし、そして、発現するための技術は、米国特許第5,627,052号および米国特許第6,331,415号に記載されている。

10

20

【0166】

本発明のB細胞はさらに、検出可能な標識を含み得る。

【0167】

本発明はまた、テロメラーゼをコードする核酸でB細胞をトランスフェクトすることによって作製される不死化B細胞を提供する(Bunk "Immortalizing Human Cells, The Scientist 14:19(2000)を参照のこと)。不死化B細胞は、増強されたテロメラーゼ発現に加え、pRB/pl6(INK4a)を不活化することによって、作製され得る(Kiyonora, 1998; Dicksonら, 2000を参照のこと)。さらに、不死化細胞は、c-mycおよびシミアンウイルス40ラージT抗原を過剰発現することによって作製され得る(Greenbergら, 1999; Kimら, 2001)。不死化B細胞はまた、サイクリンD1を過剰発現させ、かつp53を不活化することによって(Opitzら, 2001を参照のこと)か、あるいは、SV40ラージT抗原のみを過剰発現することによって(Russoら, 1998)、作製され得る。B細胞を不死化する他の方法として、ras遺伝子を過剰発現すること、ならびにヒト乳頭腫ウイルス16E6遺伝子およびヒト乳頭腫ウイルスE7ウイルスを過剰発現することが挙げられる(Coursenら, 1997を参照のこと)。使用され得る遺伝子の別の組み合わせは、hTERT、sv40ラージT癌タンパク質(oncoprotein)およびHrasの癌対立遺伝子である。

30

【0168】

いくつかの用途のために、1つ以上のIgレセプターを発現し得、かつ不死化しているB細胞を作製することが所望され得る。これを達成するための1つの手段は、1つ以上の不死化遺伝子についてトランスジェニック性である動物由来の胚を使用することである。このような動物の1つのは、IMMORTOMOUSE(登録商標)マウスであり、これは、Charles River Laboratoriesから市販されている。このようなマウスは、ほとんどの細胞において温度感応性SV40T抗原遺伝子を有している。当業者は、不死化B細胞は、hTERTまたはHrasのような上述の細胞を不死化することが知られているさらなる遺伝子を保持するトランスジェニック動物を使用することによって、取得され得ることを認識する。

40

【0169】

Ig およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプター

50

をコードする核酸を含むベクターを含むことに加えて、本発明のB細胞はまた、U1Aをコードする核酸を含むベクターを含み得、このU1Aは、分泌形態の免疫グロブリンMの発現を阻害することに関連する酵素である(Phillipsら、"Regulation of nuclear poly(A) addition controls the expression of immunoglobulin M secretory mRNA", EMBO 22:6443-6452(2001)を参照のこと)。

【0170】

本明細書中に記載のベクターを含むB細胞の全ては、ハイブドーマを作製するための骨髓腫細胞株または他の不死化細胞株に融合され得る。得られるハイブリドーマ細胞は、本明細書中に記載の目的のモノクローナル抗体を作製する方法において使用され得る。

10

【0171】

(形質細胞)

代表的なマウスの脾臓において、約 10^8 のB細胞が存在する。このようなB細胞表面の約99%が、抗体を提示する。しかし、このような細胞のうちの1%の細胞、すなわち 10^6 の細胞は、形質細胞であり、そして、代表的な表面は、ごく微量の抗体のみを提示する。形質細胞は、特定の標的抗原に対して、高度に特異的であり、かつ強い親和性のある免疫グロブリンを産生することが知られている。本発明は、単一の細胞が、標的抗原と反応する免疫グロブリンを産生しているか否かを決定するのに使用されるハイスループットな蛍光活性化細胞分類技術を可能にする十分な量の免疫グロブリンを表面提示する、形質細胞の集団を提供する。このような形質細胞は、任意の動物(例えば、本明細書中で提供されるようなトランスジェニック動物)から得られ得、そして、そのB細胞内でヒト抗体をコードする核酸を発現するトランスジェニック動物から単離される場合、完全ヒト免疫グロブリンを産生し得る。

20

【0172】

上述のように、形質細胞は、標的抗原に対して非常に特異的、高親和性の抗体を作製する。従って、形質細胞を分類する前のB細胞の大きな集団から形質細胞を単離し、所望の抗体を産生する細胞を同定することが所望され得る。マーカーSYNDECAN-1は、他のB細胞よりも形質細胞において高度に発現される。さらに、形質細胞は、IGDもB220も発現しないが、他のB細胞は、両方のマーカーを発現する。SYNDECAN、IGDおよびB220についての市販の抗体が、利用可能であり、そしてこれらの3つのマーカーは、当該分野で公知の手段によって、B細胞集団から形質細胞を分離するために当業者によって使用され得る。形質細胞はまた、密度に基づく遠心分離によって他の細胞から分離され得、ここで、形質細胞を含む画分は、溶離器(elutriator)を使用して回収される。あるいは、精製された形質細胞集団は、分離/精製カラム(例えば、磁気ビーズを使用するカラム)を使用して達成され得る。

30

【0173】

本発明は、形質細胞集団を提供し、ここで、この集団中の5%より多い細胞が細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現する。また、本発明によって提供されるものは、集団中の細胞の、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%のより多い細胞が、細胞表面に結合するモノクローナル抗体を発現する形質細胞集団である。

40

【0174】

本発明はまた、形質細胞を提供し、ここで、20を超えるモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合されている。50を超えるモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合されている形質細胞もまた、本発明により提供される。100を超えるモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合されている形質細胞が、本発明によりさらに提供される。本発明はまた、250を超えるモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合されている形質細胞を提供する。500を超えるモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合されている形質細胞もまた、本発明により提供される。

50

【0175】

本発明により、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含む、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する、形質細胞の集団がさらに提供される。ここで、このモノクローナル抗体が、蛍光により検出される場合、この細胞の集団の蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞の集団の蛍光強度より、少なくとも2倍大きい。

【0176】

本発明はまた、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含む、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する、形質細胞の集団を提供する。ここで、モノクローナル抗体が蛍光により検出される場合、この細胞集団の蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞の手段の蛍光強度より、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、250倍、500倍、1000倍、2500倍、5000倍または10000倍大きい。この蛍光強度の倍数はまた、上記の倍数の増加の間の任意の量であり得る。蛍光強度の倍数増加は、当該分野で標準的な方法により測定され得、実施例で本明細書中に記載される。

10

【0177】

蛍光強度を測定するために利用される形質細胞の集団は、25細胞と500細胞との間であり得る。従って、この集団は、約25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500細胞またはこれら値の間の任意の細胞数であり得る。

20

【0178】

集団中の形質細胞は、I g をコードする核酸を含むベクターを含み得る。

【0179】

本発明により、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含む、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する、形質細胞の集団がさらに提供される。ここでモノクローナル抗体が蛍光により検出される場合、細胞の少なくとも10%の蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞の集団の蛍光強度より、少なくとも2倍大きい。

【0180】

本発明はまた、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含む、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する、形質細胞の集団を提供し、ここで、モノクローナル抗体が蛍光により検出される場合、細胞の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはその間の任意の割合の蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞の手段の蛍光強度より、少なくとも2倍である。

30

【0181】

本発明はまた、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含む、細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する、形質細胞の集団を提供し、ここで、モノクローナル抗体が蛍光により検出される場合、細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはその間の任意の割合の蛍光強度は、I g および/またはI g をコードする核酸を含むベクターを含まない形質細胞の集団の蛍光強度より、少なくとも2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、12倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、250倍、500倍、1000倍、またはその間の任意の量である。

40

【0182】

本明細書中に記載の形質細胞の集団の全ては、本発明により提供される抗体を作製する方法において利用され得る。その結果、本発明の形質細胞は、単離され得、引き続き生成され得るモノクローナル抗体生成細胞を同定するために、抗原と接触され得る。

【0183】

50

(骨髄腫細胞)

本発明はまた、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む骨髄腫細胞を提供する。ここで表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

【0184】

本発明により、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの変異した表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む骨髄腫細胞がさらに提供される。ここで、表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

10

【0185】

本発明により、アミノ酸残基176~220の欠失を有する変異I g レセプターを機能的にコードする核酸を含む骨髄腫細胞もまた提供される。ここでこの表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

【0186】

本発明により、Y176F、Y182F、Y193F、Y204Fからなる群より選択される1以上の変異を有する変異I g レセプターを機能的にコードする核酸を含む骨髄腫細胞がさらに提供される。ここでこの表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

【0187】

本発明はさらに、Y190FおよびY206Fからなる群より選択される1以上の変異を有する変異I g レセプターを機能的にコードする核酸を含む骨髄腫細胞を提供する。ここで表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

20

【0188】

本発明により提供されるベクターを含む骨髄腫細胞はいずれも、B細胞(本発明のベクターを含むB細胞を含む)と融合されて、ハイブリドーマ細胞が作製される。次いで、得られたハイブリドーマ細胞は、本明細書中に記載のモノクローナル抗体を作製する方法において使用され得る。

【0189】

本発明はまた、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む骨髄腫細胞を作製する方法を提供する。ここで表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。この方法は、骨髄腫細胞を、I g および I g からなる群より選択される数なくとも1つの表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸で、トランスフェクトする工程を包含し、ここで、表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

30

【0190】

本発明はまた、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの変異した表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む骨髄腫細胞を作製する方法を提供する。ここで、表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。この方法は、骨髄腫細胞を、I g および I g からなる群より選択される少なくとも1つの変異した表面発現抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸でトランスフェクトする工程を包含し、ここで表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

40

【0191】

本発明により、Y176F、Y182F、Y193F、Y204Fからなる群より選択される1以上の変異を有する変異I g レセプターを機能的にコードする核酸を含む骨髄腫細胞を作製する方法がさらに提供される。ここでこの表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。この方法は、骨髄腫細胞を、Y1

50

76F、Y182F、Y193F、Y204Fからなる群より選択される1以上の変異を有する変異Igレセプターを機能的にコードする核酸でトランスフェクトする工程を包含し、ここで表面発現抗体レセプターは、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

【0192】

本発明は、Y190FおよびY206Fからなる群より選択される1以上の変異を有する変異Igレセプターを機能的にコードする核酸を含む骨髓腫細胞を作製する方法を提供する。ここで表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。この方法は、骨髓腫細胞を、Y190FおよびY206Fからなる群より選択される1以上の変異を有する変異Igレセプターを機能的にコードする核酸でトランスフェクトする工程を包含し、ここでこの表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

10

【0193】

本発明は、アミノ酸残基176~220の欠失を有する変異Igレセプターを機能的にコードする核酸を含む骨髓腫細胞を作製する方法を提供する。ここでこの表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。この方法は、骨髓腫細胞を、アミノ酸残基176~220の欠失を有する変異Igレセプターを機能的にコードする核酸でトランスフェクトする工程を包含し、ここでこの表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、誘導性発現配列に機能的に連結されている。

【0194】

IgおよびIgからなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含むベクターを含むことに加えて、本発明の骨髓腫細胞はまた、免疫グロブリンMの分泌形態の発現を阻害することに関与する酵素U1Aをコードする核酸を含むベクターを含む(Philipsら、「Regulation of nuclear poly(A) addition controls the expression of immunoglobulin M secretory mRNA」EMBO 22:6443-6452(2001)を参照のこと)。

20

【0195】

本発明はまた、骨髓腫細胞または他の不死化細胞を、それらの表面上のIgおよびIgの存在についてスクリーニングする方法を提供する。IgおよびIgを天然に発現する骨髓腫細胞または不死化細胞が同定されると、この細胞は、B細胞と融合されて、それらの細胞表面にモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞が生成される。Igを天然に発現する骨髓腫細胞または不死化細胞が同定されると、この細胞は、本発明のB細胞と融合されて、それらの細胞表面にモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞が生成される。あるいは、この細胞は、Igをコードする核酸を含むベクターでトランスフェクトされ得、次いで、それらの細胞表面にモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞を生成するために、B細胞と融合され得る。Igを天然に発現する骨髓腫細胞または不死化細胞が同定されると、この細胞は、本発明のB細胞と融合されて、それらの細胞表面にモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞が生成され得る。あるいは、この細胞は、Igをコードする核酸を含むベクターでトランスフェクトされ得、次いで、それらの細胞表面にモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞を生成するためにB細胞に融合され得る。

30

40

【0196】

骨髓腫細胞はまた、骨髓腫細胞のどれが、ハイブリドーマを作製するために適切な融合パートナーであるかを決定するためにスクリーニングされ得る。当業者は、どの骨髓腫細胞がB細胞と融合するに最も適しているかを決定するために、Igおよび/またはIgの存在についてスクリーニングする前または後のいずれかに、所望の融合特徴について骨髓腫細胞をどのように試験するかを分かっている。あるいは、一旦骨髓腫細胞または不死化細胞が融合に適しているとみなされると、この骨髓腫細胞は、B細胞と融合する前にIgおよび/またはIgでトランスフェクトされ得る。さらに、HAT選択が必要ないので、所定のプロトコルにおけるB細胞についての融合パートナーとして使用される細胞

50

の本発明者の選択は、大きく拡げられる。D I S Hを使用すると、骨髄腫または他の候補融合パートナーは、今日使用されている標準的な骨髄腫を超える、より大きな細胞節約 (c e l l s p a r i n g) であるかまたは他の利点を提供することが同定され得る。

【 0 1 9 7 】

(モノクローナル抗体を作製する方法)

本発明は、以下の工程を包含する、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供する： a) ハイブリドーマ細胞の集団 (ここで、この集団中の細胞の15%超が細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する) を検出可能な標識に連結された抗原 (ここでこの抗原は、モノクローナル抗体に結合して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を生じる) と接触させる工程； b) 検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離して、従って、目的のモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞を同定する工程； c) 目的のモノクローナル抗体をハイブリドーマ細胞から作製する工程。

10

【 0 1 9 8 】

また、目的のモノクローナル抗体を作製する方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する： a) ハイブリドーマ細胞の集団 (ここで、この集団中の細胞の15%超が細胞表面に結合したモノクローナル抗体を発現する) を抗原と接触させる工程であって、その抗原は、そのモノクローナル抗体と結合する、工程； b) 検出可能な標識を抗原に付加して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を得る工程； c) この検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、従って、目的のモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞を同定する工程； d) このハイブリドーマ細胞から目的のモノクローナル抗体を作製する工程。

20

【 0 1 9 9 】

本明細書中に記載のモノクローナル抗体を作製する方法において、抗原/抗体複合体が形成され得る条件、ならびに抗原/抗体複合体の形成の検出のためのアッセイおよび検出されたタンパク質の定量のためのアッセイは、当該分野で標準的である。このようなアッセイとしては、当業者に周知であるように、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ウエスタンブロッティング、免疫沈降、免疫蛍光、免疫細胞化学、免疫組織化学、蛍光活性化細胞選別 (F A C S)、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (F I S H)、免疫磁性アッセイ、E L I S A、E L I S P O T (C o l i g a n ら、編、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , W i l e y , N e w Y o r k (1 9 9 5))、凝集アッセイ、フロキュレーション (f l o c c u l a t i o n) アッセイ、細胞パニング、磁性分離など。

30

【 0 2 0 0 】

本発明の抗原は、基材 (例えば、ビーズ、チューブ、スライド、プレート、ニトロセルロースシートなど) に結合され得るか、または検出可能な標識 (部分) と結合体化され得るか、または両方が結合体化され得る。本発明について意図される検出可能な部分としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：免疫蛍光部分 (例えば、フルオレセイン、ローダミン)、放射活性部分 (例えば、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{35}S)、酵素部分 (例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、金コロイド部分、色素およびビオチン部分。このような結合体化技術は、当該分野で標準である (例えば、H a r l o w および L a n e , 「 A n t i b o d i e s , A L a b o r a t o r y M a n u a l 」 C o l d S p r i n g H a r b o r P u b l i c a t i o n s , N e w Y o r k , (1 9 8 8) ; Y a n g ら、N a t u r e 3 8 2 : 3 1 9 - 3 2 4 (1 9 9 6))。標識は、抗原に直接的または間接的のいずれかで結合され得る。間接的結合の1つの例は、スペーサー部分の使用である。これらスペーサー部分は、続いて、不溶性または可溶性のいずれかであり得る (D i e n e r ら、S c i e n c e 2 3 1 : 1 4 8 (1 9 8 6))。

40

【 0 2 0 1 】

当業者に公知の多くの異なる標識および標識方法が存在する。本発明において使用され得る型の標識の例としては、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、化学発光化合物、マイクロス

50

フィア色素および生物発光化合物が挙げられる。さらに、本発明の実施に必要な、これら標識の抗原への結合は、当業者にとって通常の標準的な技術を使用して行われ得る。

【0202】

本明細書中に記載のハイブリドーマの集団は、1より多くのモノクローナル抗体を生成するので、本発明は、モノクローナル抗体を作製する方法を提供する。ここで、細胞の集団は、1を超える抗原と接触される。一旦各抗原が、目的のモノクローナル抗体に結合すると、それぞれ1つが、分離可能な標識により検出され得、従って、細胞の集団中で目的の1を超えるモノクローナル抗体を同定し得る。例えば、この集団は、3種類の抗原と接触され得、ここで各抗原は、異なる蛍光標識で直接的または間接的のいずれかで標識される。モノクローナル抗体生成細胞が検出され得、3種類の異なるモノクローナル抗体生成細胞が、異なる標識と関連する蛍光の差異に基づいて区別され得る。従って、本発明は、細胞の集団からの、1を超えるモノクローナル抗体の単離および生成を可能にする。この同じアプローチが、本発明のB細胞からの複数のモノクローナル抗体単離および生成（本発明の形質細胞からのモノクローナル抗体の単離および生成を含む）に適用され得る。

10

【0203】

目的のモノクローナル抗体を作製する上記方法において、ハイブリドーマ細胞の集団（20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%を超える）は、抗原と接触され得る。

【0204】

目的のモノクローナル抗体を作製する方法は、以下の工程を包含する：a)ハイブリドーマ細胞（ここで、20を超えるモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合されている）を、検出可能な標識に連結された抗原（ここでこの抗原は、モノクローナル抗体に結合して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を生じる）と接触させる工程；b)この検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、従って、目的のモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞を同定する工程；c)目的のモノクローナル抗体を、ハイブリドーマ細胞から作製する工程。

20

【0205】

目的のモノクローナル抗体を作製する方法は、以下の工程を包含する：a)ハイブリドーマ細胞（ここで、20を超えるモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合されている）を、抗原（ここでこの抗原は、モノクローナル抗体に結合する）と接触させる工程；b)この抗原に検出可能な標識を付加して、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を生じる工程；c)この検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を単離し、従って、目的のモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞を同定する工程；d)目的のモノクローナル抗体を、ハイブリドーマ細胞から作製する工程。

30

【0206】

目的のモノクローナル抗体を作製する上記方法において、50、100、250、または500を超えるモノクローナル抗体分子が発現され、細胞表面に結合したハイブリドーマ細胞は、抗原と接触され得る。

【0207】

目的のモノクローナル抗体を作製する方法全てにおいて、ハイブリドーマ細胞は、IgおよびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含むベクターを含み得る。Ig およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、変異Ig および/または変異Ig であり得、上記のように、キメラIg および/またはキメラIg であり得る。

40

【0208】

本発明はまた、以下を包含する、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供する：a)ベクター（ここで、このベクターは、Ig およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む）を含むB細胞を、検

50

出可能な標識と連結された抗原（ここでこの抗原は、このモノクローナル抗体に結合して、検出可能に標識されたB細胞を生じる）と接触させる工程；b）この検出可能に標識されたB細胞を単離し、従って、目的のモノクローナル抗体を生成するB細胞を同定する工程；c）目的のモノクローナル抗体を作製する工程。

【0209】

本発明はまた、以下を包含する、目的のモノクローナル抗体を作製する方法を提供する：a）ベクター（ここで、このベクターは、Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む）を含むB細胞を、抗原と接触させる工程；b）この抗原に結合する検出可能な標識を付加して、検出可能に標識されたB細胞を生じる工程；c）この検出可能に標識されたB細胞を単離し、従って、目的のモノクローナル抗体を生成するB細胞を同定する工程；d）目的のモノクローナル抗体を作製する工程。

10

【0210】

本発明はさらに、以下を包含する、目的のモノクローナル抗体を作製する方法をさらに提供する：a）ベクター（ここで、このベクターは、Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む）を含むB細胞を、検出可能な標識に連結された抗原（ここで、この抗原は、モノクローナル抗体に結合して、検出可能に標識されたB細胞を生じる）と接触させる工程；b）この検出可能に標識されたB細胞を単離し、従って、目的のモノクローナル抗体を生成するB細胞を同定する工程；c）このモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を決定する工程；およびd）目的のモノクローナル抗体を作製する工程。このモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列は、抗体生成細胞（例えば、B細胞）からRNAを得て、cDNAを構築し、この免疫グロブリン鎖の可変領域中のDNA配列に対応するプライマーを使用してこのcDNAを増幅し、ヌクレオチド配列を決定し、このモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を得るために、ヌクレオチド配列を翻訳することにより決定され得る。モノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を決定する目的に関しては、米国特許第5,627,052号（その全体が本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

20

【0211】

本発明はさらに、以下の工程を包含する、目的のモノクローナル抗体を作製する方法をさらに提供する：a）ベクター（ここで、このベクターは、Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含む）を含むB細胞を、検出可能な標識に連結された抗原（ここで、この抗原は、モノクローナル抗体に結合して、検出可能に標識されたB細胞を生じる）と接触させる工程；b）この検出可能に標識されたB細胞を単離し、従って、目的のモノクローナル抗体を生成するB細胞を同定する工程；c）このモノクローナル抗体の可変領域をコードする核酸を得る工程；およびd）目的のモノクローナル抗体を作製する工程。このモノクローナル抗体の可変領域をコードする核酸は、抗体生成細胞（例えば、B細胞）からDNAを単離することにより得られ得る。一旦DNAが単離されると、再配置された可変領域をコードするDNA配列（相補性決定領域を含む）がPCRにより増幅され、得られた増幅産物が配列決定される。モノクローナル抗体の可変領域をコードする核酸を得る目的については、米国特許第5,627,052号（その全体が本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

30

40

【0212】

B細胞から目的のモノクローナル抗体を作製する方法全てにおいて、そのB細胞は、Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸を含むベクターを含み得る。Ig および Ig からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現抗体レセプターをコードする核酸は、変異Ig および/または変異Ig、キメラIg および/またはキメラIg であり得る。

【0213】

本発明はまた、選択された抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：a）この抗原でマウ

50

ス免疫する工程；b)この免疫されたマウスからのB細胞を、Ig およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現された抗体レセプターを機能的にコードする少なくとも1つの核酸を含む骨髓腫細胞と融合してモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を産生する工程であって、ここで、；このハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体は、発現されて、細胞表面に結合される、工程；c)このモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を、抗原に接触させる工程であって、ここで、この抗原は、細胞表面上のモノクローナル抗体に結合して、検出可能なハイブリドーマ細胞を産生する、工程；およびd)検出可能なハイブリドーマ細胞を単離し、よって特定の抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製する工程。この方法において、抗原は、検出可能に標識されたハイブリドーマ細胞を得るために直接標識され得る。

10

【0214】

本明細書中で使用される場合、「抗原」は、ペプチド、ポリペプチド、組換えポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ポリペプチドのフラグメント（例えば、C末端フラグメントまたはN末端フラグメント）、有機化合物、合成化合物、細菌供給源、植物供給源、動物供給源、原生動物供給源または真菌供給源由来の天然に存在する化合物であり得る。抗原はまた、細胞表面レセプターの結合部位を含み得、その結果、その特定の部位に対するモノクローナル抗体は、細胞表面レセプターを標的化するように作製され得る。

【0215】

選択された抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製する方法は、以下の工程を包含する：a)ベクターを含有するB細胞を接触させる工程であって、ここで、このベクターは、抗原とともに、Ig およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現された抗体レセプターをコードする核酸を含み、ここで、この抗原は、検出可能なB細胞を得るためにモノクローナル抗体に結合する、工程；b)この検出可能なB細胞を単離し、よって目的のモノクローナル抗体を産生するB細胞を同定する工程

20

；およびc)目的のモノクローナル抗体を産生するB細胞を、選択された抗原を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を産生する骨髓腫細胞に、融合させる工程。この方法において、抗原は、検出可能に標識されたB細胞を得るために直接標識され得る。

30

【0216】

また、ベクターを含有するB細胞を含むトランスジェニック動物が、本発明によって提供され、ここで、このベクターは、発現配列（プロモーター、イントロン配列およびポリアダニル化シグナル配列を含むが、これらに限定されない）に機能的に連結されるIg およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現された抗体レセプターをコードする核酸を含む。ベクターを含有するB細胞は、Ig およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの変異された表面発現された抗体レセプターを含み得る。ベクターを含有するB細胞は、Ig およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現されたキメラ抗体レセプターを含み得る。ベクターを含有するB細胞は、Y176F、Y182F、Y193F、Y204Fからなる群より選択される少なくとも1つの変異を含む、変異されたIg レセプターを含み得る。ベクターを含有するB細胞は、Y190FおよびY206Fからなる群より選択される少なくとも1つの変異を含む、変異されたIg レセプターを含み得る。

40

【0217】

本発明のトランスジェニック動物は、当該分野において公知の方法によって作製され得る。トランスジェニック動物を作製する目的、導入遺伝子の存在についてトランスジェニック動物をスクリーニングする目的およびトランスジェニック動物に関する他の方法論について、米国特許第6,111,166号（本明細書中にその全体が参照として援用される）を参照してください。例えば、本発明のトランスジェニック動物は、a)発現配列に機能的に連結された、Ig をコードする核酸を含む導入遺伝子、および/または発現配列

50

に機能的に連結された、I g をコードする核酸を含む導入遺伝子を、胚中に注入すること、ならびにb)この胚を動物中で発達させること、によって作製され得る。これはさらに、この動物を第2の動物と交雑させて第3の動物を産生させることを含む。導入遺伝子を含むB細胞(ここで、この導入遺伝子は、I g およびI g からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現された抗体レセプターをコードする核酸を含む)は、本発明のトランスジェニック動物より単離され得る。本発明のトランスジェニック動物としては、マウス、ラット、ウサギ、モルモットが挙げられるがこれらに限定されない。

【0218】

本発明のトランスジェニック動物において、導入遺伝子は、未成熟B細胞、ネイティブな成熟B細胞、活性化した成熟B細胞、メモリーB細胞、B系統リンパ球および/または形質細胞中で発現され得る。よって、発現配列は、この導入遺伝子の発現がB細胞を指向する(しかし、排他的にB細胞を指向するのではない)ように選択され得る。発現配列は、以下の型のB細胞の1つ以上または全てに対して発現を指向し得る:未成熟B細胞、ネイティブな成熟B細胞、活性化した成熟B細胞、メモリーB細胞、B系統リンパ球および形質細胞。

10

【0219】

本発明のトランスジェニック動物において、導入遺伝子の発現は、誘導性プロモーターによって制御され得る。本発明のトランスジェニック動物は、誘導性発現系(例えば、cre-lox系、メタロチオネインまたはテトラサイクリン-調節トランス活性化因子系)を利用し得る。cre-lox系の例を使用して、目的の遺伝子(I g およびI g)は、交差する部位の遺伝子座(loxP)に隣接する停止コドンを含むプラスミドまたは適切なウイルスベクターに挿入される。この遺伝子座は、8つの塩基対スペーサー領域によって分けられた、繰り返される反転した2つの13塩基対を含む。このカセットは、特定のプロモーター(例えば、免疫グロブリン プロモーター、免疫グロブリン プロモーター、CD19プロモーター、CD45R/B220プロモーター、CD81(TAPA-1)プロモーターまたはCD138(シンデカン1)プロモーター)の制御下である。目的の遺伝子は、細胞特異的プロモーターから逆側のloxP-停止-loxP領域でプラスミド中に挿入される。別のプラスミドにおいて、creリコンビナーゼは、その発現が制御され得るプロモーター(proI)の次に挿入される。各プラスミドは、分離した胚の前核にマイクロインジェクトとされ、そしてこの胚は偽妊娠雌性に移植される。さらに、これらのプラスミドを使用して、適切な動物から胚性幹細胞を形質転換し得る。その後、後者は、同一または同様の非ヒト動物由来の胚盤胞と組み合わせられ、そしてキメラ動物を作製するために導入遺伝子を含むプラスミドを含む偽妊娠の義母に再度移植される。さらに、当該分野において周知のトランスジェニック動物を作製する方法(例えば、リポフェクチンまたは胚性幹細胞またはプレ移植胚のウイルス性トランスフェクション)もまた、使用され得る。あるいは、proI-cre導入遺伝子を保有するマウスは、既に確立されたマウス(例えば、Kuhnらによる、インターフェロン誘導性「Mx-Cre」マウス(以下を参照のこと))を含み得る。

20

30

【0220】

トランスジェニック動物を交尾させ、そして生じたF1動物を、PCRおよび/またはサザンブロッティング分析を介して遺伝子についてスクリーニングする。導入遺伝子についてのホモ接合が確立される後、次いで、proI-cre配列を有する動物を、インタクトなpro-loxP-停止-loxP-Ig-Igを有する動物と交配させる。次いで、生じたF1動物を、PCRおよび/またはサザンブロッティング分析を介して両方の導入遺伝子を保有する個体についてスクリーニングする。「Mx-Cre」creリコンビナーゼ導入遺伝子の場合、pro-loxP-停止-loxP-Ig-Ig導入遺伝子の発現は、「Mx-Cre」creリコンビナーゼ導入遺伝子を有する場合と同様に、1型インターフェロン(IFN)の注入を介するようにcreリコンビナーゼの発現を開始させることによって達成される。次いで、creリコンビナーゼは、1つのlox部位の反転した反復で結合し、そして第2の部位とのシナプスを形成することによって、

40

50

loxP部位で標的化される組換え事象を開始させる。次いで、creリコンビナーゼは、スパーサー領域中のDNAを切断し、シナプス化したloxP部位の間での鎖交換を開始させる。このことは、停止コドン、ならびにIg 遺伝子およびIg 遺伝子を介するプロモーターからの転写の欠失を生じる。同様な方法が、M. Lasko et al., "Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice," PNAS, 89, 6232-6236, July 1992 (その全体が本明細書中に援用される)によって詳述される。これは、cre/lox系を使用する唯一の方法であるが、同様の結果が、プラスミドまたはウイルスベクターへのIg 遺伝子およびIg 10 遺伝子を、プロモーターに対して逆方向に、そして逆方向(pro-loxP-Ig - Ig - loxP)でloxP部位の間に挿入することによって達成され得る。このシナリオにおいて、一旦組換え事象が開始されると、遺伝子は、転写を可能にする逆方向(pro-Ig - Ig)であり得る。この例示が、M. Mitsou et al., "Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen," Nature 407, 636-642, Oct. 5, 2000 (その全体が本明細書中に援用される)に実証される。Mx-Creトランスジェニックマウス、および誘発因子としての1型IFNの使用は、R. Kuhn et al., "Inducible gene 20 targeting in mice," Science, 269(5229):1427-1429, Sept. 8, 1995 (その全体が本明細書中に参考として援用される)によって公開された。

【0221】

別のアプローチにおいて、インタクトなpro-loxP-停止-loxP-Ig - Ig を有する動物由来のB細胞は、インビトロで細胞透過性Creリコンビナーゼタンパク質(例えば、Jo et al. "Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase," Nature Biotechnology, 19:929-933, 2001 (その全体が本明細書中に参考として援用される)によって記載される)で処理される。

【0222】

本発明のトランスジェニック動物はまた、テトラサイクリン系を利用し得、ここで、目的の遺伝子(Ig および/またはIg)がテトラサイクリン応答プロモーター(TRE)に隣接するプラスミドまたはウイルスベクターに挿入される。別のプラスミドにおいて、テトラサイクリン制御トランス活性化因子(rtTA)は、B細胞に発現を指向し得るプロモーターまたは構成的プロモーターの次に挿入される。cre-lox系同様に、トランスジェニック動物は、前核のマイクロインジェクションまたは幹細胞形質転換によって作製され得る。生じたF1動物は、遺伝子についてスクリーニングされる。pro-rtTA配列を保有する動物を、ホモ接合性に交配させ、次いで、インタクトなTRE-Ig - Ig を有する動物と交配させる。次いで、生じたF1動物を、両方の導入遺伝子を有する個体についてスクリーニングする。導入遺伝子の発現は、テトラサイクリンまたは適切な誘導体(例えば、ドキシサイクリン)の注入によって達成される。doxは、rtTAに結合して、TREへの結合ならびにIg 遺伝子および/またはIg 遺伝子の転写促進を可能にする。テトラサイクリン誘導性系の使用は、D. Y. Ho et al., "Inducible gene expression from defective herpes simplex virus vectors using the tetracycline-responsive promoter system," Brain Res. Mol. Brain Res. 41(1-2):200-209, Sept. 5, 1996; Y. Yoshida et al., "VSV-G-pseudotyped retroviral packaging through 40 adenovirus-mediated inducible gene expr 50

ession, "Biochem. Biophys. Res. Commun. 232(2): 379-382, Mar. 17, 1997; A. Hoffman et al., "Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette," PNAS, 93(11): 5185-5190, May, 28, 1996; and B. Massie et al., "Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette," J Virol. 72(3): 2289-2296, Mar. 1998 (これらは、その全体が参考として本明細書中に援用される)に例証される。 10

【0223】

また、特定の抗原を認識するモノクローナル抗体を産生する細胞を同定する方法が、本発明によって提供され、この方法は、以下の工程を包含する：a)ベクターを含有するB細胞を含むトランスジェニック動物を免疫する工程であって、ここで、このベクターは、Ig およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現された抗体レセプターをコードする核酸を含む、工程；b)工程a)の動物からB細胞を単離する工程；c)工程b)の細胞を、抗原と接触させる工程であって、ここで、この抗原は、検出可能な標識細胞を得るためにモノクローナル抗体に結合する、工程；および、d)この検出可能な標識細胞を単離して、よって、特定の抗原を認識するモノクローナル抗体を産生する細胞を同定する工程。 20

【0224】

本発明はまた、ベクターを含有する造血幹細胞を提供し、ここで、このベクターは、Ig およびIg からなる群より選択される少なくとも1つの表面発現された抗体レセプターをコードする核酸を含む。

【0225】

本発明は、以下の実施例により詳細に記載される。この実施例は、その中の多くの改変および変更が当業者に明らかであるので、例示的としてのみ意図される。

【実施例】

【0226】

本発明は、ハイブリドーマにおける抗体の表面提示の主要な限定である、抗体レセプターIg および/またはIg の欠損を示す。抗体の膜形態は、図1に示すような全長重鎖のC末端(mHC)上の膜にわたるドメイン(membrane spanning domain)を介する、これらの2つのレセプターを結合する。ほとんどの骨髓腫は、Ig および/またはIg の産生能を喪失しており、生じたハイブリドーマ融合物は、もはや表面mAbを提示しない。なぜなら、これらは、Ig レセプター、またはIg レセプターおよびIg レセプターを欠くからである(Kanavarnos et al., 1995)。多くのハイブリドーマは、これら自体は表面mAbを提示する初期段階または中期段階(mid stage)のB細胞由来であるが、骨髓腫は、抗体の表面提示のこの欠損を、ほとんどのハイブリドーマ細胞株に伝達する(Milcarek et al., 1996)。 30 40

【0227】

(Ig および/またはIg の構成的発現の操作)
2つのレセプター配列Ig およびIg をコードするcDNAを、マウス脾臓cDNAライブラリー(Clontech)からPCR増幅した。制限エンドヌクレアーゼクロニング部位を、図2Aに示すようにPCR増幅に使用するオリゴヌクレオチドプライマーの一部として付加し、そして適切なサイズのPCR産物を得た(図2B)。Ig およびIg についてPCR増幅したレセプターを確認した配列を、それぞれ図3および図4に示す。Ig を含むPCR産物を、HindIIIおよびEcoRIで消化し、そして真核生物発現ベクターpcDNA3.1(Neo)(Invitrogen, Inc.)の 50

対応する置換領域にクローニングした。I g 配列を含むPCR産物を、H i n d I I I およびX h o Iで消化し、そして真核生物発現ベクターp c D N A 3 . 1 / Z e o (I n v i t r o g e n , I n c .)の対応する置換領域にクローニングした。これら2つの関連するp c D N A 3 . 1 発現ベクターの構造を、それぞれ図5および図6に示す。これら2つのベクターは、それぞれネオマイシンG 4 1 8 およびZ e o c i n に対する耐性マーカーを保有することのみ異なる。生じたプラスミドを、それぞれp 3 . 1 N e o I g およびp 3 . 1 Z e o I g と称した。両方のp c D N A 3 . 1 ベクターは、強力な構成的C M V プロモーターおよびB G H ターミネーターの制御下で、クローニングされた配列を発現する。組換えプラスミドDNAを、トランスフェクションについての調製において、エンドトキシンのない精製キット(Q i a g e n , I n c .)を介して精製した。

10

【0228】

十分に特徴付けられたハイブリドーマ細胞株であるH G S 1 (S p 2 / 0 とマウスB細胞との融合物)を、利用した(クローニングされた株12G7)。この株は、以前に記載されたように、E . c o l i グルタチオン合成酵素(G S)に対するモノクローナル抗体を作製する。この抗体は、G S 配列または全長G S タンパク質から設計された合成ペプチドの両方と十分反応する。

【0229】

骨髓腫細胞株S p 2 / 0 は、ハイブリドーマを産生する際に、U n i v e r s i t y o f G e o r g i a のモノクローナル設備で10年にわたって使用されている標準的融合物パートナーを形成する。S p 2 / 0 および誘導体化されたハイブリドーマを、20%仔ウシ胎児血清(A t l a n t a B i o l o g i c a l s , I n c .)で補充したR P M I 培地(R P M I - 1 6 4 0 , S i g m a , I n c .)で増殖させ、そして5% C O₂にて37℃で増殖させた。

20

【0230】

(トランスフェクションおよび選択の最適化)

構成的 - ガラクトシダーゼ(- g a l) レポータープラスミド(p c D N A 3 . 1 / l a c Z , I n v i t r o g e n)を利用して、H G S 1 ハイブリドーマおよびS p 2 / 0 骨髓腫細胞株でのリポフェクション技術を最適化および定量化した。6 ~ 8 μ l のL i p o f e c t A M I N E 試薬(G i b c o B R L)を、1 ~ 2 μ g のプラスミドDNAと、血清を減少させたO p t i - M E M I (G i b c o B R L)培地1 m l 中で37℃で5時間混合することによって、トランスフェクションを行った。生じたりポフェクション頻度は比較的low、平均して500,000個の細胞当たり約30個の形質転換体であったが、骨髓腫細胞について以前に報告されているもの(O i e t a l . , 1 9 8 3 ; S u n e t a l . , 1 9 9 1)よりも高かった。2つのDNAの同時トランスフェクション頻度を、平均して500,000個当たり約6 ~ 10個の細胞と決定した。いくつかのトランスフェクションにおいて、トランスフェクトする頻度または線状化プラスミドDNAもしくはスーパーコイル化したプラスミドDNAを発現する頻度の間に、ほとんど差異はなかった。従って、スーパーコイル化したDNAを、引き続き実験に使用した。ネオマイシン(N e o)(G 4 1 8 , G i b c o B R L)およびZ e o c i n (I n v i t r o g e n)の殺傷曲線を、同一の細胞で確立し、750 μ g / m l G 4 1 8 および750 m g / m l Z e o c i n に対するコントロール細胞の100%殺傷は、7日間を超えて生じる。この選択の最初の期間の後、G 4 1 8 濃度は、同一であり続けるが、Z e o c i n 濃度を、450 μ g / m l に減少させる。細胞を、連続選択下で増殖させる。

30

40

【0231】

(I g レセプター遺伝子のトランスフェクションおよび発現)

レセプタータンパク質レベルを、S D S - P A G E によって分離した粗抽出物のウエスタンブロットで評価した。2つのレセプターに対するウサギポリクローナル抗体は、D r . L i n d a M a t s u u c h i (U n i v . V a n c o u v e r)によって提供された。強力なレセプター発現を、図7に示すような脾臓細胞コントロール(S C)について30 ~ 40 k D a の範囲で観察するが、より高い分子量バンドは、バックグラウンドを示す

50

。ネオマイシンおよび Zeocin の二重薬物選択を使用して、単離されたいくつかの、独立して、安定に同時トランスフェクトした細胞株 (HGS1-1 - HGS1-16) を、単離した。これらの細胞株は、2つの構築物 p3.1NeoIg および p3.1ZeoIg を含有する。これらの細胞株のいくつかを、ウエスタンブロットで Ig および Ig の発現について試験した。測定可能なレベルの Ig タンパク質を産生する、5つの株のうち2つ (HGS1-Ig-2 および HGS1-Ig-5) を、本発明者らの実験において試験した (図7)。この実験はまた、試験した全ての細胞株が、pNeo3.1Ig 構築物および p3.1ZeoIg 構築物でのトランスフェクションを行ってかまたは行わないで、有意な量の Ig を産生したことを、示した。Ig のこのバックグラウンド発現を、骨髄腫 Sp2/0、ハイブリドーマ株 HGS1 (Sp2/0 とマウス B 細胞との間の融合由来)、HGS1 由来の全ての株、および Sp2/0 由来の他のハイブリドーマ株において観察した。

10

【0232】

(トランスフェクトしたハイブリドーマ株において増加した抗体の表面提示)
p3.1NeoIg からの Ig を高レベルで発現する株を、図8で抗体の表面提示について試験した。FITC 標識されたヒツジポリクローナル抗マウス抗体 (Sigma) を使用して、コントロール細胞 HGS1a の表面上のマウス抗体の基準レベルを測定した。低頻度のコントロール細胞は、図8A~Bに示されるいくつかの実験から典型的な結果を伴う抗体を示す。顕著には、両方のレセプタープラスミド (6、7、9、10) でトランスフェクトした6つの HGS1 細胞株のうち4つが、それぞれ図8C、D、F および G に示すように、これらの細胞の100%の表面上に多量の抗体を提示する。各野 (field) において、わずかな細胞が、焦点外であるが、この野の細胞の焦点試験は、4つの集団の各々における細胞の99%が検出可能なレベルの表面抗体を提示することを示す。明らかに、これらの細胞集団の試験は、抗体を提示する細胞のコントロール HGS1 細胞に関する頻度の有意な増加、および発現レベルの増加を示す。G418耐性および Zeocin 耐性にトランスフェクトされた2つの細胞株 (8、11) は、有意な抗体の表面提示を示さなかった (図8E および 8H)。驚くことに、これらの細胞株は、コントロール細胞より低い表面の抗体を提示し、試験した100個以上 (plus) の細胞のいずれも、検出可能な表面発現を示さなかった。

20

【0233】

(表面抗体を提示するハイブリドーマ細胞における Ig レセプター発現の試験)
図8で試験した同一の細胞サンプルのアリコート、引き続きレセプタータンパク質レベルの試験のために凍結した。コントロール HGS1、ならびにトランスフェクトした HGS1 細胞株における Ig レセプタータンパク質および Ig レセプタータンパク質の発現を比較した最初の結果を、それぞれ図9および10に示す。Ig レセプタープラスミドの4つをトランスフェクトした HGS1 細胞株は、コントロール HGS1 細胞における検出可能でないレベルと比較してより多い Ig レセプターを発現する。Ig を発現するこれらの細胞株は、100%の抗体の表面提示を図8に示す同一の株である (C6、D7、F9、G10)。7株は、強力な表面発現を示す他の3つの株より有意に低い Ig タンパク質発現を示した。7株は、試験した基本的に全ての細胞において抗体の表面発現を示した (図8D、7) が、他の3つの表面発現株よりも低い強度であった。このことは、Ig レベルと表面提示との間の直接的定量的関係を示す。2つの HGS1 細胞株は、ウエスタンで Ig タンパク質発現を示さず (8 および 11)、これら2つは、コントロールよりも表面提示が低いことを示した。Ig 活性の同時抑制のいくつかの形態がこれら2つのネガティブ株において生じた可能性があるようである。高レベルの Ig タンパク質を、試験した細胞株由来の HGS1 全てにおいて検出し、そしてこれらのレベルは、抗体の表面提示と関連しなかった (図10)。よって、HGS1 株上の増加した表面抗体提示は、Ig レセプタータンパク質発現と直接関連し、そして半定量的である。

40

【0234】

50

各集団における50個の細胞の平均蛍光強度の定量は、図11Aに示すように、トランスジェニックIg 発現細胞(6、7、9および10)が、コントロール細胞よりも約5倍多い抗体を提示することを、示す。Ig を強く発現する細胞の高パーセント(60~80%)は、Ig を発現しない細胞についての平均よりも3倍強い平均蛍光強度を示す(図11B)。コントロール細胞の0~6%のみが、このレベルの強度に達する。これらのデータの定量は、Ig を発現する細胞の蛍光の実際の増加を過小評価した。これらのアッセイは、ほとんどの蛍光トランスジェニック細胞を測定するための、本発明者らの装置(instrumentation)のダイナミックレンジ、および単一の焦点平面において全ての細胞をアッセイする能力がないことによって制限される(すなわち、多くのIg 細胞が、本発明者らの装置の能力を超えて明るい)。さらに、本発明者らは、標識細胞中の低レベルの自己蛍光、およびFITC標識コントロール抗体で処理した細胞中での弱いバックグラウンド蛍光を観察する。このバックグラウンドは、コントロール細胞で見られるいくつかの蛍光の原因であり得る(図8AおよびB)。

10

【0235】

さらなる実験は、Ig レセプターの過剰発現、および抗体の増加した表面提示が、ハイブリドーマ細胞からの正常な抗体分泌を妨げないことを示した。図8~11で試験した8つの細胞株からの細胞上清での最初のアッセイは、各細胞株が、有意なレベルのmAb GS1モノクローナル抗体をなお分泌することを示した。

【0236】

(骨髄腫)

上記で利用する、ハイブリドーマ細胞での同一の遺伝子変更を、標準的骨髄腫融合パートナーSp2/0で行った。Sp2/0は、マウス(Mus musculus(BALB/c))より得られた骨髄腫細胞株である。Sp2/0は、ハイブリドーマ融合物を作製するために使用されるファウンダー(founding)骨髄腫細胞株の1つである(Fraser and Venter, 1980; Greene et al., 1980; Hurwitz et al., 1980)。第一に、Sp2/0細胞を、p3.1NeoIg 構築物およびp3.1ZeoIg 構築物で同時トランスフェクトし、そしてG418耐性およびZeocin耐性について選択して、新たな細胞株Sp2 1、Sp2 2などを産生させた。これらのSp2 株を、図12に示すように、ウエスタンブロットでIg レセプター発現およびIg レセプター発現について特徴付けした。Sp2 1株およびSp2 2株は、Ig の強い発現を示し、そして骨髄腫細胞におけるレセプター発現を増加させる転写後バリアは存在しないことを実証する。これは、コントロールSp2/0コントロール細胞においてIg が測定可能なレベルですでに発現されていることを示す。これらの骨髄腫細胞株を、ハイブリドーマを作製するためにB細胞と容易に融合する。当該分野における標準法によって、骨髄腫細胞を、B細胞または他の抗体産生細胞に融合し得る。

20

30

【0237】

(蛍光活性化細胞ソーティングは、表面抗体提示の増加をさらに定量化し、Ig 発現に連結される)

HGS1細胞およびHGS1 10細胞の表面上の全ての抗体をFITC標識し、そしてこれらの細胞を、図13に示すように、FITC蛍光に基づいてソートした。パネルAとBとの比較は、HGS1Ig 10細胞の平均蛍光が、HGS1コントロール細胞の蛍光より約10倍高い(すなわち、BにおけるHGS1 10細胞のFL1レベルは、AにおけるコントロールHGS1細胞の右へ約1ログ(log)シフトする)ことを示す。パネルCは、これらの細胞の混合物のソーティングを試験し、同様の結果を示す。蛍光の平均レベルにおけるこの差異は、図11に対して、Ig 発現の効果の独立した定量として働く。Ig 発現の増加は、ハイブリドーマ細胞におけるマウス抗体の表面提示の増加を生じる。脾臓B細胞から新鮮に調製した正常ハイブリドーマ細胞集団のソーティングにおいて、GS抗体提示に起因するバックグラウンド蛍光はなかった(Aにおけるピークの右肩)。なぜなら、ほとんどの細胞は、GS以外の抗原に対する抗体を作製するからで

40

50

ある。結論として、I g 発現に起因する蛍光の明らかな増加は、D I S Hがハイブリドーマの直接選択に使用され得ることを実証する。

【 0 2 3 8 】

本出願を通して、種々の刊行物が、参照される。これらの刊行物の開示は、本発明が関連する分野の状態をより完全に記載するために、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【 0 2 3 9 】

【 表 1 】

参考文献

Antczak, D.F. (1982). Monoclonal antibodies: technology and potential use. *J Am Vet Med Assoc* **181**, 1005-10.

Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 [comment] [see comments]. *Science* **277**, 1453-74.

Condon, C., Hourihane, S.L., Dang-Lawson, M., Escribano, J., and Matsuuchi, L. (2000). Aberrant trafficking of the B cell receptor Ig-alpha beta subunit in a B lymphoma cell line. *J Immunol* **165**, 1427-37.

Coursen, J.D., Bennett, W.P., Gollahon, L., Shay, J.W., and Harris, C.C. (1997). Genomic instability and telomerase activity in human bronchial epithelial cells during immortalization by human papillomavirus-16 E6 and E7 genes. *Exp Cell Res* **235**, 245-53.

10

20

- Dickson, M.A., Hahn, W.C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J.Y., Weinberg, R.A., Louis, D.N., Li, F.P., and Rheinwald, J.G.** (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* **20**, 1436-47.
- Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B.A., Chissov, S., Hunt, A.R., Collins, J.E., Bruskiewich, R., Beare, D.M., Clamp, M., Smink, L.J., Ainscough, R., Almeida, J.P., Babbage, A., Bagguley, C., Bailey, J., Barlow, K., Bates, K.N., Beasley, O., Bird, C.P., Blakey, S., Bridgeman, A.M., Buck, D., Burgess, J., Burrill, W.D., O'Brien, K.P., and et al.** (1999). The DNA sequence of human chromosome 22 [see comments] [published erratum appears in *Nature* 2000 Apr 20;404(6780):904]. *Nature* **402**, 489-95. 10
- Edwards-Gilbert, G., and Milcarek, C.** (1995). The binding of a subunit of the general polyadenylation factor cleavage polyadenylation specificity factor (CPSF) to polyadenylation sites changes during B cell development. *Nucleic Acids Symposium Series* **33**, 229-233
- Edwards-Gilbert, G., and Milcarek, C.** (1995). Regulation of poly(A) site use during mouse B-cell development involves a change in the binding of a general polyadenylation factor in a B-cell stage-specific manner. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 6420-6429. 20
- Edwards-Gilbert, G., Veraldi, K., and Milcarek, C.** (1997). Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* **25**, 2547-2561.
- Flaspohler, J. A., Boczkowski, D., Hall, B. L., and Milcarek, C.** (1995). The 3'-untranslated region of membrane exon 2 from the gamma 2a immunoglobulin gene contributes to efficient transcription termination. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 11903-11.
- Flaspohler, J. A., and Milcarek, C.** (1990). Myelomas and lymphomas expressing the IgG2a H chain gene have similar transcription termination regions. *Journal of Immunology* **144**, 2802-2810. 30
- Fraser, C.M., and Venter, J.C.** (1980). Monoclonal antibodies to beta-adrenergic receptors: use in purification and molecular characterization of beta receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7034-8.

- Galibert, F., Alexandraki, D., Baur, A., Boles, E., Chalwatzis, N., Chuat, J.C., Coster, F., Cziepluch, C., De Haan, M., Domdey, H., Durand, P., Entian, K.D., Gatus, M., Goffeau, A., Grivell, L.A., Hennemann, A., Herbert, C.J., Heumann, K., Hilger, F., Hollenberg, C.P., Huang, M.E., Jacq, C., Jauniaux, J.C., Katsoulou, C., Karpfinger-Hartl, L., and et al. (1996).** Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *Embo J* **15**, 2031-49.
- Galli, G., Guise, J. W., McDevitt, M. A., Tucker, P. W., and Nevins, J. R. (1987).** Relative position and strengths of poly(A) sites as well as transcription termination are critical to membrane vs secreted mu-chain expression during B-cell development. *Genes & Dev* **1**, 471-481. 10
- Genovese, C., Harrold, S., and Milcarek, C. (1991).** Differential mRNA stabilities affect mRNA levels in mutant mouse myeloma cells. *Somat Cell Mol Genet* **17**, 69-81.
- Genovese, C., and Milcarek, C. (1990).** Increased half-life of mu immunoglobulin mRNA during mouse B cell development increases its abundance. *Mol Immunol* **27**, 733-43.
- Glennie, M.J., and Johnson, P.W. (2000).** Clinical trials of antibody therapy. *Immunol Today* **21**, 403-10.
- Greenberg, R.A., O'Hagan, R.C., Deng, H., Xiao, Q., Hann, S.R., Adams, R.R., Lichtsteiner, S., Chin, L., Morin, G.B., and DePinho, R.A. (1999).** Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* **18**, 1219-26. 20
- Greene, G.L., Nolan, C., Engler, J.P., and Jensen, E.V. (1980).** Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 5115-9.
- Guise, J., Lim, P., Yuan, D., and Tucker, P. (1988).** Alternative expression of secreted and membrane forms of immunoglobulin μ -chain is regulated by transcriptional termination in stable plasmacytoma transfectants. *Journal of Immunology* **140**, 3988-3994.
- Hall, B. L., and Milcarek, C. (1989).** Sequence and polyadenylation site determination of murine immunoglobulin gamma 2a membrane 3' untranslated region. *Mol Immunol* **26**, 819-826. 30

- Hashimoto, S., Chiorazzi, N., and Gregersen, P.K.** (1995). Alternative splicing of *CD79a (Ig-alpha/mb-1)* and *CD79b (Ig-beta/B29)* RNA transcripts in human B cells. *Mol Immunol* **32**, 651-9.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H.S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D.K., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T., Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J., Kumpf, K., Lehmann, R., Patterson, D., Reichwald, K., Rump, A., Schillhabel, M., and Schudy, A.** (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. The chromosome 21 mapping and sequencing consortium [see comments]. *Nature* **405**, 311-9. 10
- Hombach, J., Lottspeich, F., and Reth, M.** (1990a). Identification of the genes encoding the IgM-alpha and Ig-beta components of the IgM antigen receptor complex by amino-terminal sequencing. *Eur J Immunol* **20**, 2795-9.
- Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., and Reth, M.** (1990b). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* **343**, 760-2.
- Hurwitz, J.L., Coleclough, C., and Cebra, J.J.** (1980). CH gene rearrangements in IgM-bearing B cells and in the normal splenic DNA component of hybridomas making different isotypes of antibody. *Cell* **22**, 349-59. 20
- Janeway, C. A., and Travers, P.** (1994). *Immunobiology. The immune system in health and disease* (New York: Garland Publishing, Inc).
- Kanavaros, P., Gaulard, P., Charlotte, F., Martin, N., Ducos, C., Lebezu, M., and Mason, D.Y.** (1995). Discordant expression of immunoglobulin and its associated molecule mb-1/CD79a is frequently found in mediastinal large B cell lymphomas. *Am J Pathol* **146**, 735-41.
- Kandasamy, M.K., McKinney, E., and Meagher, R.B.** (1999). The late pollen specific actins in angiosperms. *Plant J* **18**, 681-691.
- Kelly, D. E., and Perry, R. P.** (1986). Transcriptional and post-transcriptional control of Ig mRNA production during B lymphocyte development. *Nucleic Acids Research* **14**, 5431-5441. 30
- Kim, H.S., Shin, J.Y., Yun, J.Y., Ahn, D.K., and Le, J.Y.** (2001). immortalization of human embryonic fibroblasts by overexpression of c- myc and simian virus 40 large T antigen. *Exp Mol Med* **33**, 293-8.

- Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A., and Klingelutz, A.J.** (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**, 84-8.
- Kohler, G., and Milstein, C.** (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495.
- Kobrin, B. J., Milcarek, C., and Morrison, S. L.** (1986). Sequences near the 3' secretion-specific polyadenylation site influence levels of secretion-specific and membrane-specific IgG2b mRNA in myeloma cells. *Molecular and Cellular Biology* **6**, 1687-1697.
- Konstantinos, N.S., and al., e.** (1999). Use of monoclonal antibodies for the diagnosis and treatment of bladder cancer. *Hybridoma* **18**, 219-224. 10
- Lassman, C. R., and Milcarek, C.** (1992). Regulated expression of the mouse $\gamma 2b$ Ig H chain gene is influenced by polyA site order and strength. *J Immunol* **148**, 2578-2585.
- Lassman, C.R., Matis, S., Hall, B.L., Toppmeyer, D.L., and Milcarek, C.** (1992). Plasma cell-regulated polyadenylation at the Ig gamma 2b secretion-specific poly(A) site. *J Immunol* **148**, 1251-60.
- Lebman, D. A., Park, M. J., Fatica, R., and Zhang, Z.** (1992). Regulation of usage of membrane and secreted 3' termini of alpha mRNA differs from mu mRNA. *Journal of Immunology* **148**, 3282-3289. 20
- Li, Y., Kandasamy, M.K., and Meagher, R.B.** (2001). Rapid isolation of monoclonal antibodies: monitoring enzymes in the phytochelatin synthesis pathway. *Plant Physiol* in press.
- Lockhart, D.J., and Winzeler, E.A.** (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**, 827-36.
- MacBeath, G., and Schreiber, S.L.** (2000). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination [see comments]. *Science* **289**, 1760-3
- Matis, S.A., Martincic, K., and Milcarek, C.** (1996). B-lineage regulated polyadenylation occurs on weak poly(A) sites regardless of sequence composition at the cleavage and downstream regions. *Nucleic Acids Res* **24**, 4684-92. 30
- McClelland, M., and Wilson, R.K.** (1998). Comparison of sample sequences of the *Salmonella typhi* genome to the sequence of the complete *Escherichia coli* K-12 genome. *Infect Immun* **66**, 4305-12.

- Meilhoc, E., Witttrup, K.D., and Bailey, J.E.** (1989). Application of flow cytometric measurement of surface IgG in kinetic analysis of monoclonal antibody synthesis and secretion by murine hybridoma cells. *J Immunol Methods* **121**, 167-74.
- Milcarek, C., and Hall, B.** (1985). Cell-specific expression of secreted versus membrane forms of immunoglobulin gamma 2b mRNA involves selective use of alternate polyadenylation sites. *Mol Cell Biol* **5**, 2514-2520.
- Milcarek, C., Hartman, M., and Croll, S.** (1996). Changes in abundance of IgG 2a mRNA in the nucleus and cytoplasm of a murine B-lymphoma before and after fusion to a myeloma cell. *Mol Immunol* **33**, 691-701.
- Milcarek, C., Suda-Hartman, M., and Croll, S.C.** (1996). Changes in abundance of IgG 2a mRNA in the nucleus and cytoplasm of a murine B-lymphoma before and after fusion to a myeloma cell. *Mol Immunol* **33**, 691-701. 10
- Miller, R.A., Maloney, D.G., Warnke, R., and Levy, R.** (1982). Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *N Engl J Med* **306**, 517-22.
- Milstein, C.** (2000). *With the benefit of hindsight.* *Immunol Today* **21**, 359-64.
- Morio, T., Urushihara, H., Saito, T., Ugawa, Y., Mizuno, H., Yoshida, M., Yoshino, R., Mitra, B.N., Pi, M., Sato, T., Takemoto, K., Yasukawa, H., Williams, J., Maeda, M., Takeuchi, I., Ochiai, H., and Tanaka, Y.** (1998). The *Dictyostelium* developmental cDNA project: generation and analysis of expressed sequence tags from the first-finger stage of development. *DNA Res* **5**, 335-40. 20
- Mullner, S., Neumann, T., and Lottspeich, F.** (1998). Proteomics—a new way for drug target discovery. *Arzneimittelforschung* **48**, 93-5.
- O'Reilly, L.A., Cullen, L., Moriishi, K., O'Connor, L., Huang, D.C., and Strasser, A.** (1998). Rapid hybridoma screening method for the identification of monoclonal antibodies to low-abundance cytoplasmic proteins. *Biotechniques* **25**, 824-30.
- Oi, V.T., Morrison, S.L., Herzenberg, L.A., and Berg, P.** (1983). Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 825-9.
- Opitz, O.G., Suliman, Y., Hahn, W.C., Harada, H., Blum, H.E., and Rustgi, A.K.** (2001). Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism. *J Clin Invest* **108**, 725-32. 30
- Pandey, A., and Mann, M.** (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837-46.

- Pandey, A., Podtelejnikov, A.V., Blagoev, B., Bustelo, X.R., Mann, M., and Lodish, H.F.** (2000). Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 179-84.
- Parks, D.R., Bryan, V.M., Oi, V.T., and Herzenberg, L.A.** (1979). Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1962-6.
- Persidis, A.** (1998). Proteomics. *Nat Biotechnol* **16**, 393-4.
- Price, C.P., and Newman, D.J.** (1997). *Principles and practice of Immunoassay*, 10
- Richards, J.D., Gold, M.R., Hourihane, S.L., DeFranco, A.L., and Matsuuchi, L.** (1996). Reconstitution of B cell antigen receptor-induced signaling events in a nonlymphoid cell line by expressing the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **271**, 6458-66.
- Russo, I., Silver, A.R., Cuthbert, A.P., Griffin, D.K., Trott, D.A., and Newbold, R.F.** (1998). A telomere-independent senescence mechanism is the sole barrier to Syrian hamster cell immortalization. *Oncogene* **17**, 3417-26.
- Sakaguchi, N., Kashiwamura, S., Kimoto, M., Thalmann, P., and Melchers, F.** (1988). B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. *Embo J* **7**, 3457-64. 20
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Katoh, T., Asamizu, E., Kotani, H., and Tabata, S.** (2000). Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. X. Sequence features of the regions of 3,076,755 bp covered by sixty P1 and TAC clones. *DNA Res* **7**, 31-63.
- Signals.** (2000). Companies load up on magic bullets, *Signals Magazine* **October**, 1-9 (<http://www.recap.com/signalsma>).
- Sun, L.K., Liou, R.S., Sun, N.C., Gossett, L.A., Sun, C., Davis, F.M., MacGlashan, D.W., Jr., and Chang, T.W.** (1991). Transfectomas expressing both secreted and membrane-bound forms of chimeric IgE with anti-viral specificity. *J Immunol* **146**, 199-205. 30
- Yuan, D., and Tucker, P. W.** (1984). Transcriptional regulation of the mu-delta heavy chain locus in normal murine B-lymphocytes. *J Exp Medicine* **160**, 564-572.

【図面の簡単な説明】

【0240】

【図1】図1は、B細胞におけるmIgMのような抗体の表面提示が、1種または2種の膜レセプター（Igおよび/またはIg）の存在を必要とすることを示す。B細胞において、これらのレセプターは、mIgMのような抗体の重鎖（mHC、濃い灰色）部分の膜形態の膜ドメインに結合する。小さい免疫グロブリン軽鎖に、黒く線を引いた。ほとんどの骨髓腫において、ここに示すIg（白）レセプターは、欠如しているか、非常に低いレベルで発現されている。いくつかの骨髓腫において、Igおよび/またはIgは、存在しないか、または低レベルで発現され得る。結果として、ほとんどのハイブリドーマは、その表面上に有意な量のmIgMを提示できない。 40

【図2】図2は、プライマーオリゴヌクレオチドならびにIg cDNAおよびIg cDNAのPCR増幅を示す。(A) IgおよびIgをコードするcDNAを増幅するために使用される、センス(S)プライマーおよびアンチセンス(A)プライマーの配列。これらのオリゴは、重要な制限エンドヌクレアーゼクロニング部位および5'翻訳シグナル(GCCACC)を、レセプター配列に付加する。(B)予測された大きさの 50

PCR増幅産物を、塩基対 (bp) で示す。分子量標準が、PCR産物に隣接する。

【図3】図3は、Ig 発現プラスミド p3.1NeoIg を構築するために使用した、PCR改変された、HindIIIクローニング部位からEcoRIクローニング部位にわたるマウスIg cDNAの配列を示す。タンパク質配列を、DNA配列の上に示す。Ig についてGenBankに列挙される主なDNA配列およびタンパク質配列は、それぞれ、登録番号NM_007655およびNP_031681を有する。得られたcDNA配列は、この元のIg 配列とは小領域で一致しないが、Sakiguchiら (「B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties」EMBO J. 7:3457-64 (1988)) によって与えられたデータとは一致して、太字で列挙した6アミノ酸をコードする配列を有するタンパク質をコードする。 10

【図4】図4は、Ig 発現プラスミド p3.1NeoIg を構築するために使用した、PCR改変された、HindIIIクローニング部位からEcoRIクローニング部位にわたるマウスIg cDNAの配列を示す。タンパク質配列を、DNA配列の上に示す。Ig についてGenBankに列挙される主な配列は、登録番号NM_008339を有する。

【図5】図5は、トランスジェニック細胞においてIg レセプタータンパク質を発現するために使用した、pcDNA3.1NeoRベクター (Invitrogen, Inc. Life Sciences Division) の構造を示す。 20

【図6】図6は、トランスジェニック細胞においてIg レセプタータンパク質を発現するために使用した、pcDNA3.1ZeoRベクター (Invitrogen, Inc. Life Sciences Division) の構造を示す。

【図7】図7は、Ig タンパク質およびIg タンパク質のレベルについての、ウエスタンブロットでのトランスフェクトされたHGS細胞のスクリーニングを示す。タンパク質サンプル (SDSサンプル緩衝液中、25 μgの総細胞タンパク質) を、12%のアクリルアミドゲルで分解し、Immobilon膜 (Millipore) に移し、ウサギポリクローナル抗マウスIg 抗体 (A) またはIg 抗体 (B) と反応させ、次いでロバ抗ウサギ抗体西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体と反応させ、そして公開されたプロトコールに従って発色させた (Kandasamyら、1999)。分子量標準 (MW Standards) の位置を、左側に示す。Ig の種々の改変形態のMW範囲を、括弧で示す。他のより高いバンドおよびコントロールWTレーン中のバンドは、バックグラウンドであるようである。細胞株からの抽出物を、以下のように命名する: SC、脾臓細胞抽出物; HGS1、GSに対する抗体を産生する親ハイブリドーマ細胞株; そしてHGS1 1~5およびECS1 1~3は、レセプター遺伝子がトランスフェクトされた細胞株である。UGAのMeagher研究室の研究ノートにおける、株の名称に対するこれらの単純化した記号の言及は、以下の通りである: HGS1 1、GS-TSC; HGS1 2、GS-TSC-1C; HGS1 3、GS-TE4; HGS1 4、GS-T5D-L; およびHGS1 5、GS-TSC-3D。Ig およびIg に特異的なウサギポリクローナル抗体 (それぞれ、抗MB-1およびSF2B) を、Linda Matsuuuchi博士 (University of British Columbia, Vancouver, Canada) から得た (Condonら、2000)。抗体を、Ig の細胞質テイルおよびIg のドメイン外 (ecto-domain) に対する合成ペプチドに対して調製した。 30 40

【図8-1】図8は、トランスジェニックIgレセプターを発現するハイブリドーマ細胞における抗体の増加した表面提示の顕微鏡試験を示す。示される全ての細胞を、FITC標識したヤギ抗マウス抗血清で処理した。40xZeissレンズおよびHamamatsuデジタルカメラ (モデルC-4742-95) を用いて、同一の照明および露光条件の下で、全てのプレートの写真を撮影した。非標識抗体で処理した細胞は、有意なレベルの自己蛍光を有さない。示される細胞株は、ラボノートの名称を参照して示される。Aお 50

よび B . 非トランスフェクト HGS 1 コントロール細胞 ; D ~ H . p c D N A 3 . 1 - I g および p c D N A 3 . 1 - I g でトランスフェクトした細胞。C HGS 1 6、SC - 1 C # 2 ; D HGS 1 7、SC - 1 C F 2 ; E . HGS 1 8、SC - 1 C # 3 ; F . HGS 1 9、SC - 3 D F 3 ; G . HGS 1 10、SC - 3 D F 4 ; H . HGS 1 11、SC - F 1。(I)最も明るい細胞は、図 8 A の細胞の領域 (HGS 1 a コントロールハイブリドーマ細胞) から拡大し、そして矢印で示した。(J)最も明るい細胞は、図 8 C の細胞の領域 (HGS 1 6 レセプターでトランスフェクトしたハイブリドーマ細胞) から拡大し、そして矢印で示した。

【図 8 - 2】図 8 は、トランスジェニック I g レセプターを発現するハイブリドーマ細胞における抗体の増加した表面提示の顕微鏡試験を示す。示される全ての細胞を、FITC 標識したヤギ抗マウス抗血清で処理した。40x Zeiss レンズおよび Hamamatsu デジタルカメラ (モデル C - 4742 - 95) を用いて、同一の照明および露光条件の下で、全てのプレートの写真を撮影した。非標識抗体で処理した細胞は、有意なレベルの自己蛍光を有さない。示される細胞株は、ラボノートの名称を参照して示される。A および B . 非トランスフェクト HGS 1 コントロール細胞 ; D ~ H . p c D N A 3 . 1 - I g および p c D N A 3 . 1 - I g でトランスフェクトした細胞。C HGS 1 6、SC - 1 C # 2 ; D HGS 1 7、SC - 1 C F 2 ; E . HGS 1 8、SC - 1 C # 3 ; F . HGS 1 9、SC - 3 D F 3 ; G . HGS 1 10、SC - 3 D F 4 ; H . HGS 1 11、SC - F 1。(I)最も明るい細胞は、図 8 A の細胞の領域 (HGS 1 a コントロールハイブリドーマ細胞) から拡大し、そして矢印で示した。(J)最も明るい細胞は、図 8 C の細胞の領域 (HGS 1 6 レセプターでトランスフェクトしたハイブリドーマ細胞) から拡大し、そして矢印で示した。

【図 9】図 9 は、HGS 1 WT および図 8 において表面提示抗体が示された HGS 1 細胞のアリコートにおける I g タンパク質レベルを示す。タンパク質サンプルを、PAGE により分離し、そして I g タンパク質レベルを、図 7 A におけるように、マウス I g に対するウサギ抗体を用いたウエスタンにおいて測定した。二連サンプルの (A) I g ウエスタン (B) クマシー染色ゲル (充填されたタンパク質の相対レベルを示す) 。染色された分子量標準 (MW Stds) を、左側にキロダルトン (kDa) で示す。種々の改変形態の I g の MW の範囲を括弧で示す。Meagher Laboratory notebook において議論された細胞株由来の抽出物の名称は、以下の通りである : WT、HGS 1 非トランスフェクトコントロール ; HGS 1 6、SC - 1 C # 2 ; HGS 1 7、SC - 1 C F 2 ; HGS 1 8、SC - 1 C # 3 ; HGS 1 9、SC - 3 D F 3 ; HGS 1 10、SC - 3 D F 4 ; および HGS 1 11、SC - F 1。図 8 において 100% の抗体の表面提示を示す細胞株をプラス + で示し、提示しないものをマイナスで示し、そして 1 ~ 5% 提示を有する HGS 1 ハイブリドーマ WT コントロールを + / - で示す。I g アイソフォームの移動範囲を括弧で示す。

【図 10】図 10 は、図 8 において示される HGS 1 細胞および HGS 1 細胞のアリコートにおける I g 発現を試験したウエスタンプロットを示す。タンパク質サンプルを、PAGE により分離し、そして I g タンパク質レベルを、図 7 B におけるように I g に対する抗体を用いたウエスタンにおいて測定した。タンパク質サンプルは、図 10 A および 10 B において示されるものと同じのアリコートである。I g アイソフォームの移動範囲を括弧で示す。

【図 11】図 11 は、I g 発現ハイブリドーマにおける抗体の表面提示の定量を示す。(A) 蛍光強度を HGS 1 細胞と、検出可能なレベルの I g レセプターを発現するトランスジェニック細胞または発現しないトランスジェニック細胞との間で比較した。平均蛍光強度 (MFI) を、OpenLab ソフトウェア (Improvisation, Inc., Boston, MA) を用いて、図 8 において撮られた画像と同様の画像から、顕微鏡領域において個々の細胞について測定した。各々の集団における個々の細胞の間の MFI の標準誤差を示す。MFI は、コントロールとトランスジェニック細胞との間の実際の強度の差を過小評価する。なぜならば、最も明るい細胞の 10% が電子カメラのダイナミッ

クレンジを超過し、そしていくつかの細胞は焦点面から外れ、MFIは、正確に測定できないからである。8つの細胞集団の各々についてn = 50細胞を試験した。(B)コントロールHGS1細胞(89MFI)についての平均よりも3倍高い強度を有する各集団における個々の細胞の頻度。

【図12】図12は、トランスフェクトされた骨髓腫細胞株におけるIgおよびIgのタンパク質レベルを試験したウエスタンブロットを示す。(A)Igおよび(B)Igの免疫検出を、図7に記載されるように実施した。試験した細胞株は以下の通りである：SC、脾臓細胞；IgおよびIgをコードする遺伝子(1、M-T4；2、M-T4D；3、M-T6；4、M-T4-3A；5、M-T3SC；6、M-T1SC；および7、M-T4D-6)でトランスフェクトされたSp2/0骨髓腫野生型(WT)またはSp2/0由来株。IgおよびIgの移動範囲を括弧で示す。より高い分子量のバンドは、抗体におけるバックグラウンドの活性に起因する。

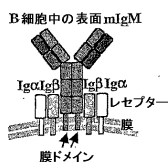
10

【図13】図13は、Ig発現が抗体表面提示を8倍増大することを実証する蛍光活性化細胞分離(FACS)を示す。HGS1およびHGS1 10細胞を図8に示すように調製し、そしてFITC標識したヤギ抗マウス抗体で標識した。以下の細胞の200μlのサンプルを、A₅₂₀発光(FL1)を用いてFACSにより計数した(カウント)。底軸における完全スケールは、蛍光強度の4-logを表す。A.HGS1 WTコントロール細胞。B.HGS1 10細胞。C.HGS1およびHGS1 10細胞の混合物。

20

【図1】

Figure 1



【図2】

Figure 2

A

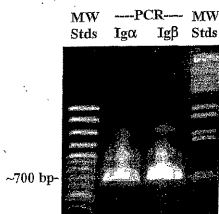
Igα-1S (SpeIおよびHindIIIクローニング部位を含む、Igαについてのセンスオリゴ)
 5' TAG TGA ACT AGT AAG CTT GCC ACC ATG CCA GGG GGT CTA GAA GCC CTC A 3'

Igα-221A (EcoRIおよびClaIクローニング部位を含む、Igαについてのアンチセンスオリゴ)
 5' GTC TAG ATC GAT GAA TTC TCA TGG CTT TTC CAG CTG GGC ATC 3'

Igβ-1S (SpeIおよびHindIIIクローニング部位を含む、Igβについてのセンスオリゴ)
 5' TAG TGA ACT AGT AAG CTT GCC ACC ATG GCC ACA CTG GTG CTG TCT TCC ATG 3'

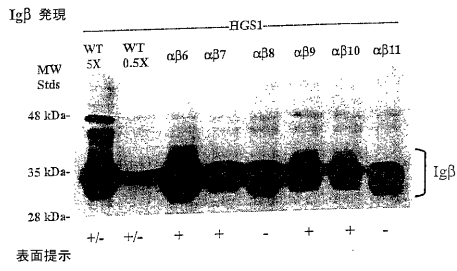
Igβ-229A (XhoIおよびClaIクローニング部位を含む、Igβについてのアンチセンスオリゴ)
 5' GTC TAG ATC GAT CTC GAG TCA TTC CTG GCC TGG ATG CTC TCC TAC CGA 3'

B.



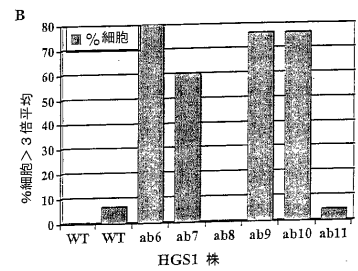
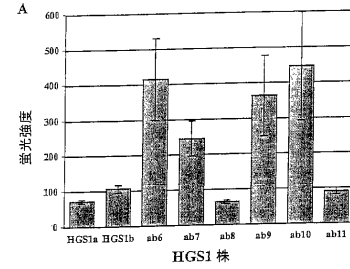
【 図 1 0 】

Figure 10



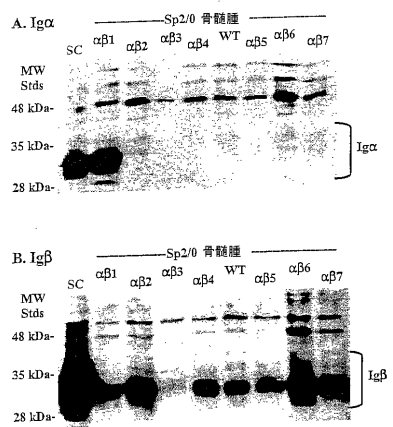
【 図 1 1 】

Figure 11



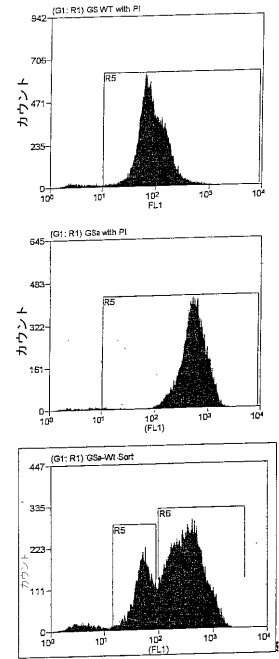
【 図 1 2 】

Figure 12



【 図 1 3 】

Figure 13



【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
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066618 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 5/00, 5/06, 5/10, 5/12, 15/00, 15/02, 15/13, 15/63, 15/85, G01N 33/00, 33/53
- (21) International Application Number: PCT/US02/04936
- (22) International Filing Date: 20 February 2002 (20.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/270,322 20 February 2001 (20.02.2001) US
- (71) Applicants: UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC. [US/US]; 630 Boyd Graduate Studies Research Center, Athens, GA 30602-7411 (US); ABEOME CORPORATION [US/US]; 610 Webster Drive, Decatur, GA 30033 (US).
- (72) Inventors: MEAGHER, Richard, B.; 635 Sandstone Drive, Athens, GA 30605 (US); LATERZA, Vince; 610 Webster Drive, Decatur, GA 30033 (US).
- (74) Agents: MILLER, Mary, L. et al.; Needle & Rosenberg, P.C., Suite 1200, The Candler Building, 127 Peachtree Street, N.E, Atlanta, GA 30303-1811 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- 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 02/066618 A1

(54) Title: RAPID PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention relates to genetically altered hybridomas, myelomas and B cells. The invention also relates to utilizing genetically altered hybridomas, myelomas and B cells in methods of making monoclonal antibodies. The present invention also provides populations of hybridomas and B cells that can be utilized to make a monoclonal antibody of interest.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

RAPID PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES

This application claims priority to U.S. Provisional Application No. 60/270,322 filed on February 20, 2001, which is hereby incorporated by this reference in its
5 entirety.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to genetically altered hybridomas, myelomas and B cells. The invention also relates to utilizing genetically altered hybridomas,
10 myelomas and B cells in methods of making monoclonal antibodies.

BACKGROUND

Major efforts in functional genomics and proteomics are creating an
15 unprecedented demand for monoclonal antibodies to be used for protein function studies. Monoclonal antibodies can be used in every stage of research involving protein target discovery and characterization including purification, quantification, and organ and cellular localization. Recent advances in proteomics are creating a need for large
20 numbers of antibodies for use in high throughput studies and on protein chips.

Monoclonal antibodies have been used for decades as key reagents in clinical
25 diagnostics and they are emerging as an important new class of therapeutics agents.

Hybridoma technology is the most commonly used method for accessing
monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies are secreted from hybridoma cells, created by fusing normal antibody producing splenic B-cells with immortal myeloma
25 cells or other immortal cells. Hybridoma production has changed little since its inception 26 years ago (Kohler and Milstein, 1975).

A typical protocol for hybridoma generation involves: (i) immunizing an animal
(e.g., mouse, rat or rabbit) with a purified protein antigen; (ii) harvesting antibody
30 producing B-cells, typically from the spleen; (iii) fusing B-cells with a non-secretory myeloma cell line deficient for the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (e.g., x63-Ag 8.653 from a BALB/c mouse strain); (iv) growing hybridoma cells in a selection medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine (HAT) and (v) screening for cells that produce the desired antibody and (vi) limit

WO 02/066618

PCT/US02/04936

dilution cloning to obtain a homogenous cell line that secretes the antibody (Antczak, 1982).

Conventional hybridoma technology does not allow researchers to access large numbers of antibodies to different antigens or large numbers of antibodies to a single target antigen in an efficient manner. Hybridoma cell cloning by limit dilution is perhaps the most problematic, time consuming and labor intensive step in generating monoclonal antibodies (O'Reilly et al., 1998). In this step, cells are repeatedly diluted out to low cell numbers and their supernatants assayed for secreted monoclonal antibody. Screening must be artfully performed to ensure that desired hybridomas are not lost. In the case of rapidly growing hybridomas, cells may die in the microtiter wells from exhaustion of nutrients if they are not moved to larger vessels or fresh medium quickly. Also, in typical wells containing several hybridomas, undesirable hybridomas may continuously overgrow desired hybridomas. This can cause the limit dilution step to be extended weeks or months and may even result in loss of important hybridomas. If the hybridomas have not grown to a reasonable size by the time of assay, they may not have produced sufficient antibody for detection. Therefore, a time for screening supernatants must be chosen carefully. The available "window" for initial screening is not large and usually extends over two to three days (Antczak, 1982). Once started, the limit dilution isolation of pure cell lines typically goes on for 3-4 weeks for any one hybridoma.

There is a need for more rapid methods of isolating desired hybridoma cells. At least two laboratories attempted to sort normal hybridomas based on traces of surface presentation of antibody (Parks et al., 1979; Meilhoc et al., 1989). They showed that a subset of hybridoma cells in any population presented a small but measurable number (~ 20) of surface antibody molecules. This was enough to sort these cells when labeled with antigen, if the antigen was coupled to highly fluorescent microspheres to increase the fluorescence signal. Even with these highly fluorescent spheres the signal was only a few-fold above the background.

There is a need for a significant increase in the presentation of surface antibody on hybridoma cells as well as a need for a significant increase in the percentage of hybridoma cells presenting surface antibody in any population to enable rapid screening. The present invention provides both by providing DISH (Direct Screening of Hybridoma Cells). The DISH technology of the present invention provides a simple, rapid and reliable selection of hybridoma cells that may be accomplished in a matter of

WO 02/066618

PCT/US02/04936

hours instead of weeks. DISH provides several significant improvements over conventional hybridoma technology that allow researchers to access much larger repertoires of antibodies in an efficient manner. Using current hybridoma protocols approximately 40,000 fusions are typically prepared. A main reason more fusions are not made is the difficulty encountered in isolating desired clones using limit dilution. DISH enables very rapid, high throughput cell selection using fluorescence activated cell sorting (FACS) and other modalities. Since FACS technology permits millions of cells to be sorted in a matter of hours, the number of hybridoma fusions one can screen using DISH technology is orders of magnitude larger than by limit dilution. Significantly, FACS sorting allows for single cell deposition of desired hybridomas into discrete wells. Hence, the problem of desirable, but slow growing cells being lost is eliminated using DISH. Thus, DISH replaces current antibody screening and limit dilution procedures with a rapid, high throughput, selection process. The present invention can also be utilized to provide populations of plasma cells that surface present adequate immunoglobulin to enable high throughput fluorescence activated cell sorting technology to be used to determine whether single plasma cells produce immunoglobulin that reacts with target antigens.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a population of hybridoma cells wherein greater than 15 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 25 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface.

Further provided is a population of hybridoma cells wherein greater than 50% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 75% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface.

The present invention also provides a hybridoma cell, wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

The present invention further provides a hybridoma cell, wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.

5 Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein greater than one hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.

Further provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein greater than two hundred and fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.

10 Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein greater than five hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

15 Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 25% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

25 The present invention also provides a population of hybridoma cells wherein greater than 25% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

5 Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

10 Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

15 Also provided by the present invention is a hybridoma cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .

Further provided by the present invention is a hybridoma cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid is linked to an inducible functional expression sequence.

20 The present invention also provides a method for making a hybridoma cell comprising at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β comprising fusing a myeloma cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , with a B cell to
25 produce a hybridoma cell comprising at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .

The present invention also provides a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .

30 Also provided by the present invention is a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the vector comprises a nucleic acid encoding Ig α and Ig β and wherein the vector is integrated into the genome of the B cell.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

The present invention also provides a myeloma cell comprising at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding
5 the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

Also provided by the present invention is a myeloma cell comprising at least one nucleic acid functionally encoding at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid
10 encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

Also provided by the present invention is a method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the cells in the population express monoclonal antibody that is
15 bound to the cell surface with an antigen linked to a detectable label, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled hybridoma cell; b) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces the monoclonal antibody of interest; and c) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.

Also provided by the present invention is a method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the cells in the population express monoclonal antibody that is
20 bound to the cell surface with an antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody; b) adding a detectable label to the antigen to yield a detectably labeled hybridoma cell; c) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a
25 hybridoma cell that produces the monoclonal antibody of interest; and d) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.

Further provided by the present invention is a method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a hybridoma cell, wherein greater than
30 twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface with an antigen linked to a detectable label, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled hybridoma cell; b) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces the monoclonal

WO 02/066618

PCT/US02/04936

antibody of interest; and c) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.

Also provided by the present invention is a method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a hybridoma cell, wherein greater than
5 twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface with an antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody; b) adding a detectable label to the antigen to yield a detectably labeled hybridoma cell; c) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces the monoclonal antibody of interest; and d) making the monoclonal antibody of interest
10 from the hybridoma cell.

Also provided by the present invention is a method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β with an antigen linked to a
15 detectable label, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled B cell; b) isolating the detectably labeled B cell, thus identifying a B cell that produces the monoclonal antibody of interest; and c) making the monoclonal antibody of interest.

The present invention also provides a method of making a monoclonal antibody
20 of interest comprising: a) contacting a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β with an antigen; b) adding a detectable label that binds to the antigen to yield a detectably labeled B cell; c) isolating the detectably labeled B cell, thus identifying a B cell that produces the monoclonal
25 antibody of interest; and d) making the monoclonal antibody of interest.

Also provided is a method of making a hybridoma cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a selected antigen comprising: a) immunizing a mouse with the antigen; b) fusing a B cell from the immunized mouse with a myeloma cell that comprises at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-
30 expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β to produce a monoclonal antibody producing hybridoma cell, wherein the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface; c) contacting the monoclonal antibody producing hybridoma cell with the antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody on the cell surface to produce a

WO 02/066618

PCT/US02/04936

detectable hybridoma cell, d) detecting the hybridoma cell and; e) isolating the hybridoma cell, thus making a hybridoma cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a specific antigen.

5 The present invention also provides a transgenic animal comprising B cells comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .

The present invention also provides a hematopoietic stem cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .

10 The invention further provides a population of hybridoma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

15 The present invention also provides a population of plasma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence the fluorescence intensity of the population of cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that does not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

20 The present invention also provides a population of hybridoma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

25 Further provided by the present invention a population of plasma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

WO 02/066618

PCT/US02/04936

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows that the surface presentation of antibody such as mIgM in B-cells requires the presence of one or two membrane receptors, Ig α and/or Ig β . In B-cells these receptors bind the membrane domain of the membrane form of the heavy chain (mHC, dark gray) portion of an antibody such as mIgM. The small immunoglobulin light chain is drawn in black. In most myelomas the Ig α (white) receptor shown here is missing or expressed at very low levels. In some myelomas Ig α and/or Ig β may be absent or expressed at low levels. As a result, most hybridomas cannot present significant amounts of mIgM on their surface.

Figure 2 shows the Primer oligonucleotides and PCR amplification of Ig α and Ig β cDNAs. (A) The sequences of the sense (S) and antisense (A) primers used to amplify cDNAs encoding Ig α and Ig β . These oligos add important restriction endonuclease cloning sites and 5' translation signals (GCCACC) to the receptor sequences. (B) PCR amplification products of the expected sizes in base pairs (bp). Molecular weight standards flank the PCR products.

Figure 3 shows the sequence of PCR modified mouse Ig α cDNA extending from the HindIII to EcoRI cloning sites used to construct Ig α expression plasmid p3.1NeoIg α . The Protein sequence is shown above the DNA sequence. The main DNA and protein sequence listings in GenBank for Ig α have the accession numbers NM_007655 and NP_031681, respectively. The cDNA sequence obtained was inconsistent with this original Ig α sequence in a small region, but agrees with the data given by Sakaguchi et al. ("B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties" *EMBO J.* 7:3457-64 (1988)) encoding a protein with the sequence encoding six amino acids listed in bold.

Figure 4 shows the sequence of PCR modified mouse Ig β cDNA extending from the HindIII to EcoRI cloning sites used to construct Ig β expression plasmid p3.1NeoIg β . Protein sequence is shown above the DNA sequence. The main sequence listing in GenBank for Ig β has the accession number NM_008339.

Figure 5 shows the structure of pcDNA3.1 NeoR vector (Invitrogen, Inc. Life Sciences Division) used to express Ig α receptor protein in transgenic cells.

Figure 6 shows the structure of pcDNA3.1 Zeo vector (Invitrogen, Inc. Life Sciences Division) used to express Ig β receptor protein in transgenic cells.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

Figure 7 shows the screening of transfected HGS cell lines for Ig α and Ig β protein levels on western blots. Protein samples (25 μ g of total cell protein in SDS sample buffer) were resolved on a 12% acrylamide gel, transferred to an Immobilon membrane (Millipore), reacted with rabbit polyclonal anti mouse Ig α antibody (A) or 5 Ig β antibody (B), then with donkey anti-rabbit horse antibody radish peroxidase conjugate, and developed following published protocols (Kandasamy et al., 1999). Positions of molecular weight standards (MW Stds) are shown on the left. The range of MWs of the various modified forms of Ig α are shown with a bracket. Other higher bands and bands in control WT lanes appear to be background. Extracts from cell lines 10 are named as follows: SC, spleen cell extract; HGS1, parental hybridoma cell line producing antibodies to GS; and HGS1 α β 1-5 and ECS1 α β 1-3 are the receptor gene transfected cell lines. References of these simplified designations to strain names in laboratory notebooks in the Meagher laboratory at UGA are as follows: HGS1 α β 1, GS-TSC; HGS1 α β 2, GS-TSC-1C; HGS1 α β 3, GS-TE4; HGS1 α β 4, GS-T5D-L; and 15 HGS1 α β 5, GS-TSC-3D. The Ig α and Ig β specific rabbit polyclonal antibodies, anti-MB-1 and SF2B, respectively, were obtained from Dr. Linda Matsuuchi (University of British Columbia, Vancouver, Canada)(Condon et al., 2000). Antibodies were prepared against synthetic peptides to the cytoplasmic tail of Ig α and the ecto-domain of Ig β .

Figure 8 shows microscopic examination of increased surface presentation of 20 antibody on hybridoma cells expressing transgenic Ig receptors. All cells shown were treated with FITC labeled goat anti mouse antiserum. All plates were photographed using a 40X Zeiss lens and Hamamatsu digital camera (model C-4742-95) under the same illumination and exposure conditions. Cells treated with an unlabeled antibody have insignificant levels of auto-fluorescence. Cell lines shown are indicated with 25 reference to names in lab notebooks. A & B. Non-transfected HGS1 control cells; D-H. pcDNA3.1-Ig α and -Ig β transfected cells. C HGS1 α β 6, SC-1C#2; D HGS1 α β 7, SC-1CF2; E. HGS1 α β 8, SC-1C#3; F. HGS1 α β 9, SC-3DF3; G. HGS1 α β 10, SC-3DF4; H. HGS1 α β 11, SC-F1. (I) brightest cell enlarged from field of cells in Figure 8A (HGS1a control hybridoma cells) and indicated by an arrow. (J) Brightest cell 30 enlarged from field of cells in Figure 8C (HGS1 α β 6 receptor transfected hybridoma cells) and indicated by an arrow.

Figure 9 shows Ig α protein levels in aliquots of HGS1 WT and HGS1 α β cells shown surface presenting antibody in Figure 8. Protein samples were resolved by

WO 02/066618

PCT/US02/04936

PAGE and Ig α protein levels measured on Westerns using rabbit antibody to mouse Ig α as in Figure 7A. (A) Ig α western (B) Coomassie stained gel of duplicate samples showing relative level of protein loading. Stained molecular weight standards (MW Stds) are shown on the left in kilo-Daltons (kDa). The range of MWs of the various modified forms of Ig α are shown with a bracket. Extracts from cell lines discussed in Meagher laboratory notebooks are named as follows: WT, HGS1 non transfected control; HGS1 $\alpha\beta$ 6, SC-1C#2; HGS1 $\alpha\beta$ 7, SC-1CF2; HGS1 $\alpha\beta$ 8, SC-1C#3; HGS1 $\alpha\beta$ 9, SC-3DF3; HGS1 $\alpha\beta$ 10, SC-3DF4; and HGS1 $\alpha\beta$ 11, SC-F1. Cell lines showing 100% surface presentation of antibody in Figure 8 are designated plus +, those not presenting as minus, and HGS1 hybridoma WT controls with 1-5% presentation as +/- . Mobility range of Ig α isoforms are shown with a bracket.

Figure 10 shows a western blot examining Ig β expression in aliquots of HGS1 and HGS1 $\alpha\beta$ cells shown in Figure 8. Protein samples were resolved by PAGE and Ig β protein levels measured on Westerns using antibody to Ig β as in Figure 7B. Protein samples are identical aliquots to those shown in Figure 10A and 10B. Mobility range of Ig β isoforms are shown with a bracket.

Figure 11 shows quantification of surface presentation of antibody in Ig α expressing hybridomas. (A) The fluorescence intensity was compared among HGS1 cells and transgenic cells expressing or not expressing detectable levels of Ig α receptor. Mean fluorescence intensity (MFI) was measured for individual cells in a microscopic field from images like those taken in Figure 8, using OpenLab software (Improvision, Inc., Boston, MA). Standard errors in MFI among individual cells in each population are indicated. MFI underestimates the actual intensity differences between control and transgenic cells, because 10% of the brightest cells exceed the dynamic range of the electronic camera and some cells are out of the focal plane, where MFI cannot be accurately measured. n = 50 cells for each of the eight cell populations examined. (B) The frequency of individual cells in each population with 3 times greater intensity than the mean for control HGS1 cells (89 MFI).

Figure 12 shows western blot examining Ig α and Ig β protein levels in transfected myeloma cell lines. Immunodetection of (A) Ig α and (B) Ig β performed as described in Figure 7. Cell lines examined are as follows: SC, spleen cells; Sp2/0 myeloma wild-type (WT) or Sp2/0 derived lines transfected with genes encoding Ig α and Ig β ($\alpha\beta$ 1, M-T4; $\alpha\beta$ 2, M-T4D; $\alpha\beta$ 3, M-T6; $\alpha\beta$ 4, M-T4-3A; $\alpha\beta$ 5, M-T3SC; $\alpha\beta$ 6,

WO 02/066618

PCT/US02/04936

M-T15C; and $\alpha\beta 7$, M-T4D-6). Mobility ranges of Ig α and Ig β are shown with brackets. Higher molecular weight bands are due to background activity in antibody.

Figure 13 shows fluorescent activated cell sorting (FACS) demonstrating that Ig α expression increases antibody surface presentation eight fold. HGS1 and HGS1 $\alpha\beta 10$ cells were prepared as shown in Figure 8 and labeled with FITC labeled goat anti-mouse antibody. 200 μ l samples of the following cells were counted (Counts) by FACS using A₅₂₀ emission (FL1). The full scale on the bottom axis represents 4-logs of fluorescence intensity. A. HGS1 WT control cells. B. HGS1 $\alpha\beta 10$ cells. C. Mixture of HGS1 and HGS1 $\alpha\beta 10$ cells.

10

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention may be understood more readily by reference to the following detailed description of the preferred embodiments of the invention.

Before the present methods are disclosed and described, it is to be understood that this invention is not limited to specific constructs, molecules and methods, as such may of course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only and is not intended to be limiting.

It must be noted that, as used in the specification and the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. For example, a cell can mean a single cell or more than one cell.

Hybridomas

25

The present invention provides a population of hybridoma cells wherein greater than 15 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or numbers in between, of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface.

As used herein, "hybridoma" is a cell or a cell line that is produced by fusing an antibody producing cell, e.g. a B cell, and an immortalized cell, e.g. a myeloma cell.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

As used herein "B cell" means an immature B cell, a mature naïve B cell, a mature activated B cell, a memory B cell, a B lineage lymphocyte, a plasma cell or any other B lineage cell of human origin or from non-human animal sources. The hybridomas of this invention can be made by fusing a B cell of human origin or from non-human animal sources, with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (*Goding*, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice" Academic Press, (1986) pp. 59-103).

In order to obtain the B cells for the production of a hybridoma, a mouse or other appropriate host animal, is typically immunized with an immunizing agent or antigen to elicit B cells that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent or antigen. Alternatively, the B cells may be immunized *in vitro*. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells may be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, although HAT is not necessary for DISH, typically, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium. The immortalized cell line can be sensitive to HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. and the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (*Kozbor, J. Immunol.*, 133:3001 (1984) and *Brodeur et al.*, "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications" Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63). For example, the following myeloma cell lines can be obtained from the ATCC: MOPC-31C, RPMI 8226, IM-9, MPC-11, CCL-189, HK-PEG-1, HS-Sultan, A2B5 clone 105, P3X63Ag8.653, Sp2/0-Ag14, Sp2/0-Ag14/SF, P3X63Ag8U.1, HFN-36.3 HFN 7.1, 45.6.TG1.7, ARH-77, Y3-Ag 1.2.3, SJK-132-20, SJK-287-38 and SJK-237-71.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

The hybridoma cells of the present invention can be assayed for surface expression and the culture medium in which the hybridoma cells are cultured can be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against a desired immunogen by methods known in the art such as ELISA, western blot, FACS, magnetic separation etc. The binding specificity of monoclonal antibodies secreted by the hybridoma cells can be, for example, determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of *Munson et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

After a desired hybridoma cell is identified, either by assaying surface expression or by assaying the culture medium, the selected hybridoma cell can be grown by standard methods. Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium.

Alternatively, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

As used herein, "a population of hybridoma cells" means a sufficient number of cells such that a percentage of the cells expressing antibody can be determined. The hybridoma cells of the population can be cells from a pure hybridoma cell line where all of the cells of the line produce only one monoclonal antibody specific for a particular antigen or a mixture of cells wherein multiple monoclonal antibodies are produced. Thus, a population of hybridoma cells can produce more than one monoclonal antibody such that some cells produce a monoclonal antibody that recognize one antigen and other cells in the population produce monoclonal antibody that recognizes a second antigen and other cells in the population produce a monoclonal antibody that recognizes a third antigen etc.

As used herein, "express" means that the monoclonal antibody can be detected by means standard in the art such as Western blot, ELISA, immunofluorescence, hemolytic assay, fluorescence activated cell sorting (FACS) as they are currently practiced in the art.

Antibodies are typically proteins which exhibit binding specificity to a specific antigen. Native antibodies are usually heterotetrameric glycoproteins, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Typically, each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies between the heavy chains of different immunoglobulin

WO 02/066618

PCT/US02/04936

isotypes. Each heavy and light chain can have regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain can have at one end a variable domain ($V(H)$) followed by a number of constant domains. Each light chain can have a variable domain at one end ($V(L)$) and a constant domain at its other end; the constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light and heavy chain variable domains. The light chains of antibodies from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains. Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There currently are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG-1, IgG-2, IgG-3, and IgG-4; IgA-1 and IgA-2. The present invention provides the presentation of all of the immunoglobulin classes via binding to Ig α and/or Ig β . The heavy chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively.

The Immunoglobulin (Ig) heavy chain genes are typically complex transcription units with multiple poly(A) sites in which changes in the cleavage and polyadenylation machinery can play an important role in B-cell, stage-specific expression. Ig μ heavy chains can be expressed in pre, immature, and mature-B-cells and IgM+ plasma cells. The α , ϵ , and γ heavy chains can be expressed in memory and IgA+, IgE+, and IgG+ plasma cells, respectively (Janeway and Travers, 1994). RNA from each of the five classes of Ig heavy chain genes (α , δ , ϵ , γ , μ) can be alternatively processed to produce two types of mRNAs: one encodes the secreted form of the Ig protein and is produced by use of the promoter-proximal, weak Ig sec (secretory-specific) poly(A) site in plasma cells; the other mRNA encodes the membrane-bound (mb) receptor for antigen on the surface of mature or memory B-cells and can be produced by use of the downstream, strong Ig membrane poly(A) site [Alt, 1980; Rogers, 1980; Rogers, 1981].

There can be a 2-5-fold change in the transcription rate of the Ig genes in different B-cell stages (Kelly and Perry, 1986). The site of termination can vary in the μ (Galli et al., 1987; Guise et al., 1988; Yuan and Tucker, 1984) but not the γ and α genes (Flaspohler et al., 1995; Flaspohler and Milcarek., 1990; Lebman et al., 1992). RNA processing events can play the major role in determining the ratios of the two forms of IgG heavy chain mRNA as first shown in 1985 (Milcarek and Hall, 1985). The crucial

WO 02/066618

PCT/US02/04936

role for RNA processing has been further substantiated (See Edwalds-Gilbert and Milcarek, 1995; Edwalds-Gilbert and Milcarek, 1995; Flaspohler et al., 1995; Flaspohler and Milcarek, 1990; Genovese et al., 1991; Genovese and Milcarek, 1990; Hall and Milcarek, 1989; Kobrin et al., 1986; Lassman et al., 1992; Lassman and
5 Milcarek, 1992; Matis et al., 1996; Milcarek et al., 1996). See also (Edwalds-Gilbert et al., 1997). Polyadenylation at the weak secretory-specific poly(A) site, which is promoter proximal to the membrane specific poly(A) site, and splicing to the membrane-specific exons at the sub-optimal splice site, in the last secretory-specific exon, can be mutually exclusive events. It has been shown that changes in the cleavage
10 and polyadenylation of the precursor RNA tip the balance in plasma cells to the use of the first, weak poly(A) site.

The term "variable" is used herein to describe certain portions of the variable domains which differ in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the
15 variability is not usually evenly distributed through the variable domains of antibodies. It is typically concentrated in three segments called complementarity determining regions (CDRs) or hypervariable regions both in the light chain and the heavy chain variable domains. The more highly conserved portions of the variable domains are called the framework (FR). The variable domains of native heavy and light chains can
20 each comprise four FR regions, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three CDRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The CDRs in each chain can be held together in close proximity by the FR regions and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen binding site of antibodies (see *Kabat E. A. et al.*, "Sequences of Proteins of
25 Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)). The constant domains are not typically involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody-dependent cellular toxicity.

As used herein, "monoclonal antibody" refers to an antibody that is produced by
30 cells that are all derived from a single antibody-producing cell type and has a specific affinity for an antigen. Monoclonal antibodies are obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be

WO 02/066618

PCT/US02/04936

present in minor amounts. The monoclonal antibodies secreted by the hybridoma cells of the present invention can be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

Once hybridomas are isolated by the present invention, the antibody coding regions of the hybridomas can be used to make monoclonal antibodies by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Pat. No. 4,816,567 or U.S. Pat. No. 6,331,415. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Pat. No. 4,816,567) or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody comprising one antigen-combining site having specificity for one antigen and second antigen-combining site having specificity for a different antigen.

The present invention also provides a hybridoma cell, wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface. Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface. Further provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein greater than one hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface. The present invention also provides a hybridoma cell, wherein greater than two hundred and fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell

WO 02/066618

PCT/US02/04936

surface. Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein greater than five hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface. Numbers of antibodies in between these numbers are also provided.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells
5 wherein greater than 15% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells
10 wherein greater than 15% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells
15 wherein greater than 15% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than one hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

The present invention also provides a population of hybridoma cells wherein
20 greater than 15% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than two hundred and fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells
25 wherein greater than 15% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than five hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells
30 wherein greater than 25% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 25% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that
5 express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 25% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than one hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the
10 population that express monoclonal antibody.

The present invention also provides a population of hybridoma cells wherein greater than 25% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than two hundred and fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the
15 population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 25% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than five hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the
20 population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 50% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that
25 express monoclonal antibody.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 50% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that
30 express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 50% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than one hundred monoclonal

WO 02/066618

PCT/US02/04936

antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

The present invention also provides a population of hybridoma cells wherein greater than 50% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than two hundred and fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 50% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than five hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 75% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 75% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 75% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than one hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

The present invention also provides a population of hybridoma cells wherein greater than 75% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than two hundred and fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 75% of the cells in the population express monoclonal antibody

WO 02/066618

PCT/US02/04936

that is bound to the cell surface and wherein greater than five hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells
5 wherein greater than 90% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells
10 wherein greater than 90% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells
15 wherein greater than 90% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than one hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

The present invention also provides a population of hybridoma cells wherein
20 greater than 90% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than two hundred and fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells
25 wherein greater than 90% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than five hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about
30 0.001% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

Any combinations of the above percentages of cells and number of antibodies per cell is also provided as well as numbers in between the specifically listed percentages of cell and number of antibodies per cell.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

The total amount of monoclonal antibody produced by a cell can be determined by any of the standard methods in the art, including, but not limited to, Western blot, ELISA, immunofluorescence and FACS. These methods are utilized to measure the amount of antibody secreted into the medium by the cell, the amount of antibody bound to the cell surface and the amount of intracellular antibody present in the cells. One of skill in the art would know how to measure these amounts utilizing the above techniques or others known to the skilled artisan to obtain a total amount of antibody produced by a cell, such that a percentage of the total amount of antibody that is expressed and bound to the cell surface is obtained.

10 Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 10% to about 20% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

15 Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 20% to about 30% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 20 30% to about 40% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 40% to about 50% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

25 Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 50% to about 60% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 60% to about 70% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

30 Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 70% to about 80% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 80% to about 90% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a hybridoma cell, wherein from about 5 90% to about 100% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the 10 hybridoma cells on the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 10% to about 20% of the total amount of monoclonal antibody produced by the 15 hybridoma cells on the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 20 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 10% to about 20% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 25 20% to about 30% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 20% to about 30% of the total amount of monoclonal 30 antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 30% to about 40% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface. Also provided by this invention is a population of

WO 02/066618

PCT/US02/04936

hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 30% to about 40% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

5 Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 40% to about 50% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%,
10 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 40% to about 50% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about
15 50% to about 60% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 50% to about 60% of the total amount of monoclonal
20 antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 60% to about 70% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface. Also provided by this invention is a population of
25 hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 60% to about 70% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells
30 wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 70% to about 80% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the

WO 02/066618

PCT/US02/04936

population express from about 70% to about 80% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about
5 80% to about 90% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the
10 population express from about 80% to about 90% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about
90% to about 100% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface. Also provided by this invention is a population of
15 hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 90% to about 100% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells
20 wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%,
25 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,
30 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about
10% to about 20% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal

WO 02/066618

PCT/US02/04936

antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 10% to about 20% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 20% to about 30% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 20% to about 30% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 30% to about 40% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 30% to about 40% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about

WO 02/066618

PCT/US02/04936

40% to about 50% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 5 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 40% to about 50% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than twenty 10 monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 50% to about 60% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal 15 antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 50% to about 60% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 20 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 25 60% to about 70% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma 30 cells in the population express from about 60% to about 70% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 70% to about 80% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 70% to about 80% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 80% to about 90% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 80% to about 90% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 90% to about 100% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 90% to about 100% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

WO 02/066618

PCT/US02/04936

85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 5 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than 15% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 10 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells 15 wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 20 10% to about 20% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than 15% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 10% to about 20% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells 30 wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 20% to about 30% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than 15% of the population are

WO 02/066618

PCT/US02/04936

hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 20% to about 30% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 30% to about 40% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than 15% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 30% to about 40% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 40% to about 50% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than 15% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 40% to about 50% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell

WO 02/066618

PCT/US02/04936

surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

5 Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 50% to about 60% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than 15% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five
10 hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 50% to about 60% of
15 the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred
monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells
20 wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 60% to about 70% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than 15% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five
hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the
25 cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 60% to about 70% of the total amount of monoclonal antibody produced by the
hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%,
30 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 70% to about 80% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than 15% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 70% to about 80% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 80% to about 90% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than 15% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 80% to about 90% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by the present invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 90% to about 100% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than 15% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface. Also

WO 02/066618

PCT/US02/04936

provided by this invention is a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the hybridoma cells in the population express from about 90% to about 100% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface and wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the population are hybridoma cells wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

Also provided by this invention is a population of hybridoma cells comprising monoclonal antibodies bound to the cell surface having about two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten times more antibody on the cell surface than control cells, i.e. standard hybridoma cells.

Further provided by this invention is a population of hybridoma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of the population of cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

The invention also provides a population of hybridoma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of the population of cells is at least two fold, three fold, four fold, five fold, six fold, seven fold, eight fold, nine fold, ten fold, fifteen fold, twenty fold, thirty fold, forty fold, fifty fold, sixty fold, seventy fold, eighty fold, ninety fold, one hundred fold, two hundred and fifty fold, five hundred fold or one thousand fold greater than the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β . The fold increase in fluorescence intensity can also be any amount in between the fold increases listed above. The fold increase in fluorescence intensity can be measured by methods standard in the art and is described herein in the Examples.

The population of hybridoma cells utilized to measure fluorescence intensity can be between 25 and 500 cells. Therefore, the population can be about 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 cells or any number of cells in between these values.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

The hybridomas in the population can comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α .

Further provided by the present invention is a population of hybridoma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

The present invention also provides a population of hybridoma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of at least 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% or any percentage in between of the cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

The present invention also provides a population of hybridoma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of at least 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% or any percentage in between of the cells is at least two fold, three fold, five fold, six fold, seven fold, eight fold, nine fold, ten fold, twenty fold, thirty fold, forty fold, fifty fold, sixty fold, seventy fold, eight fold, ninety fold, one hundred fold, two hundred and fifty fold, five hundred fold, one thousand fold or any amount in between, greater than the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

Further provided by the present invention is a hybridoma cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .

Therefore, the hybridoma can comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α , or the hybridoma can comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig β , or the hybridoma can comprise a vector comprising a nucleic acid encoding both Ig α and a nucleic acid encoding Ig β . The nucleic acids encoding Ig α or Ig β can be present in a single vector or in multiple vectors. For example, the hybridoma can comprise a vector

WO 02/066618

PCT/US02/04936

comprising a nucleic acid encoding Ig α and a vector comprising a nucleic acid encoding Ig β or a vector comprising the nucleic acid sequences for both Ig α and Ig β . Any of the vectors can be integrated into the genome of the cell or carried extrachromosomally to allow transient expression of Ig α and/or Ig β .

5 As used herein, the term "nucleic acid" refers to single-or multiple stranded molecules which may be DNA or RNA, or any combination thereof, including modifications to those nucleic acids. The nucleic acid may represent a coding strand or its complement, or any combination thereof. Nucleic acids may be identical in sequence to the sequences which are naturally occurring for the Ig α and Ig β receptors
10 discussed herein or may include alternative codons which encode the same amino acid as that which is found in the naturally occurring sequence. Also contemplated are nucleic acid sequences encoding Ig α and Ig β that contain deletions, substitutions, mutations and combinations thereof as long as the nucleic acid encodes a functional receptor. These nucleic acids can also be modified from their typical structure. Such
15 modifications include, but are not limited to, methylated nucleic acids, the substitution of a non-bridging oxygen on the phosphate residue with either a sulfur (yielding phosphorothioate deoxynucleotides), selenium (yielding phosphorselenoate deoxynucleotides), or methyl groups (yielding methylphosphonate deoxynucleotides).

The nucleic acid sequence for the Ig α receptor is available from GenBank via
20 Accession No. NM_007655 and the polypeptide encoded by this nucleic acid sequence is available from GenBank via Accession Number NP_031681. The nucleic acid sequence encoding Ig α that was utilized in the Examples described herein differs from the original Ig α receptor available from GenBank via Accession No. NM_007655, but is consistent with the sequence provided by Sakaguchi et al. This sequence is provided
25 in Figure 3.

A nucleic acid molecule encoding Ig α and a nucleic acid encoding Ig β can be isolated from the organism in which it is normally found. For example, a genomic DNA or cDNA library can be constructed and screened for the presence of the nucleic acid of interest. Methods of constructing and screening such libraries are well known
30 in the art and kits for performing the construction and screening steps are commercially available (for example, Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). Once isolated, the nucleic acid can be directly cloned into an appropriate vector, or if necessary, be modified to facilitate the subsequent cloning steps. Such modification steps are routine, an example of which is the addition of oligonucleotide linkers which contain restriction

WO 02/066618

PCT/US02/04936

sites to the termini of the nucleic acid. General methods are set forth in *Sambrook et al.*, "Molecular Cloning, a Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

5 Once the nucleic acid sequence of the desired *Igα* and/or *Igβ* is obtained, the sequence encoding specific amino acids can be modified or changed at any particular amino acid position by techniques well known in the art. For example, PCR primers can be designed which span the amino acid position or positions and which can substitute any amino acid for another amino acid. Then a nucleic acid can be amplified and inserted into the wild-type receptor coding sequence in order to obtain any of a
10 number of possible combinations of amino acids at any position of the receptors. Alternatively, one skilled in the art can introduce specific mutations at any point in a particular nucleic acid sequence through techniques for point mutagenesis. General methods are set forth in *Smith, M.* "In vitro mutagenesis" *Ann. Rev. Gen.*, 19:423-462 (1985) and *Zoller, M.J.* "New molecular biology methods for protein engineering" *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1:605-610 (1991). Techniques such as these can be used to alter the coding sequence without altering the amino acid sequence that is encoded.

Another example of a method of obtaining a DNA molecule encoding *Igα* is to synthesize a recombinant DNA molecule which encodes *Igα*. A nucleic acid encoding *Igβ* can also be obtained in this manner. For example, oligonucleotide synthesis
20 procedures are routine in the art and oligonucleotides coding for a particular protein region are readily obtainable through automated DNA synthesis. A nucleic acid for one strand of a double-stranded molecule can be synthesized and hybridized to its complementary strand. One can design these oligonucleotides such that the resulting double-stranded molecule has either internal restriction sites or appropriate 5' or 3'
25 overhangs at the termini for cloning into an appropriate vector. Double-stranded molecules coding for relatively large proteins can readily be synthesized by first constructing several different double-stranded molecules that code for particular regions of the protein, followed by ligating these DNA molecules together. For example, *Cunningham, et al.*, "Receptor and Antibody Epitopes in Human Growth
30 Hormone Identified by Homolog-Scanning Mutagenesis," *Science*, 243:1330-1336 (1989), have constructed a synthetic gene encoding the human growth hormone gene by first constructing overlapping and complementary synthetic oligonucleotides and ligating these fragments together. See also, *Ferretti, et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82:599-603 (1986), wherein synthesis of a 1057 base pair synthetic bovine rhodopsin

WO 02/066618

PCT/US02/04936

gene from synthetic oligonucleotides is disclosed. By constructing a nucleic acid in this manner, one skilled in the art can readily obtain any particular Ig α or Ig β with desired amino acids at any particular position or positions within the Ig α or Ig β . See also, U.S. Patent No. 5,503,995 which describes an enzyme template reaction method of making synthetic genes. Techniques such as this are routine in the art and are well documented. These nucleic acids or fragments of a nucleic acid encoding Ig α or Ig β can then be expressed *in vivo* or *in vitro* as discussed below. Similarly, nucleic acids or fragments of a nucleic acid encoding can be expressed *in vivo* or *in vitro*.

Once a nucleic acid encoding Ig α or a region of that nucleic acid, is constructed, modified, or isolated, that nucleic acid can then be cloned into an appropriate vector, which can direct the *in vivo* or *in vitro* synthesis of that wild-type and/or modified Ig α receptor protein. Also, once a nucleic acid encoding Ig β or a region of that nucleic acid, is constructed, modified, or isolated, that nucleic acid can then be cloned into an appropriate vector, which can direct the *in vivo* or *in vitro* synthesis of that wild-type and/or modified Ig β receptor protein. The vector is contemplated to have the necessary functional elements that direct and regulate transcription of the inserted gene, or nucleic acid. These functional elements include, but are not limited to, a promoter, regions upstream or downstream of the promoter, such as enhancers that may regulate the transcriptional activity of the promoter, an origin of replication, appropriate restriction sites to facilitate cloning of inserts adjacent to the promoter, antibiotic resistance genes or other markers which can serve to select for cells containing the vector or the vector containing the insert, RNA splice junctions, a transcription termination region, or any other region which may serve to facilitate the expression of the inserted gene or hybrid gene. (See generally, *Sambrook et al.*). One could also transfect DNA or RNA encoding an extra copy of Ig α and/or Ig β directly into the cell in the absence of additional functional elements, e.g. as naked DNA or RNA, as long as the Ig α and/or Ig β resulted in increased expression of the receptor.

The vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and Ig β of the present invention can be any vector suitable for expression of a nucleic acid in a eukaryotic cell as are known in the art. For example, pcDNA3.1 NeoR vector or pcDNA 3.1 Zeo can be utilized (Invitrogen, Inc. Life Sciences Division). Other vectors include, but are not limited to, a two vector inducible system from Invitrogen (pIND and pVgRXXR plasmids), a two vector inducible system from Clontech (pTet-ON or pTet-Off and pTRE2 plasmids), single plasmids for constitutive expression from Promega (pCI or

WO 02/066618

PCT/US02/04936

pSI plasmids), a two vector inducible system from Stratagene (pCMVLacI and pOPRSVI/MCS plasmids), single plasmid inducible systems from Stratagene (pERV3 or pEGSH plasmids) and single retroviral inducible systems from Stratagene (pCFB-EGSH or pFB-ERV retroviral vectors). The vector can also be a viral vector such as an
5 adenoviral vector, an adeno-associated viral vector, a retroviral vector, a lentiviral vector, a pseudotyped retroviral vector, or a pox virus vector, such as a vaccinia virus vector.

The present invention also provides a hybridoma cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one mutated surface-
10 expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β . Thus, the present invention provides a hybridoma cell comprising a vector that comprises a nucleic acid encoding a mutant Ig α receptor, a hybridoma cell comprising a vector that comprises a nucleic acid encoding a mutant Ig β receptor, and a hybridoma cell that
15 comprises a vector that comprises both a nucleic acid encoding mutant Ig α receptor and a nucleic acid encoding a mutant Ig β receptor.

The mutant Ig α and Ig β receptors include non-signalling receptors with altered cytoplasmic domains. An example of such a mutant receptor is an Ig α receptor comprising mutations at amino acid residues 176, 182, 193 and 204. The mutated Ig α receptors of the present invention also include a mutated Ig α that comprises one or
20 more mutations selected from the group consisting of Y176F, Y182F, Y193F and Y204F. Further provided by the present invention is a mutated Ig α receptor that comprises a deletion of amino acid residues 176-220. Another example of a mutant surface expressed antibody receptor is a mutated Ig β receptor comprising mutations at amino acid residues 190 and 206. The mutated Ig β receptors of the present invention
25 also include a mutated Ig β receptor comprising one or more mutations selected from the group consisting of Y190F and Y206F. The mutations described herein for the Ig α and the Ig β are designed such that the receptors retain the ability to bind antibodies, but are unable to act as signaling receptors. One of skill in the art would know how to manipulate the nucleic acids encoding Ig α and Ig β as described above as well as other
30 techniques known in the art to obtain the mutant receptors described herein as well as other mutant receptors.

Also provided by the present invention is a hybridoma cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one chimeric surface-
expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β . As used

WO 02/066618

PCT/US02/04936

throughout this application, "chimeric" means that the cell surface receptor can comprise a sequence derived from a receptor sequence of one species, e.g. human, and a receptor sequence derived from another species. For example, a chimeric Ig α can comprise a human Ig α extracellular domain and a mouse Ig α transmembrane domain and mouse intracellular (cytoplasmic) domain or a chimeric Ig α can comprise a human Ig α extracellular domain and a human transmembrane domain and a mouse intracellular domain. Similarly, a chimeric Ig β can comprise a human Ig β extracellular domain and a mouse Ig β transmembrane and mouse intracellular domain or a chimeric Ig β can comprise a human Ig β extracellular domain and a human Ig β transmembrane and a mouse intracellular domain. Receptor sequences from other species such as chicken, dog, rabbit, rat, gerbil and hamster can also be utilized to make the chimeric receptors of the present invention. Other examples of chimeric receptors include, but are not limited to a chimeric Ig α or Ig β receptor comprising a rabbit N-terminal extracellular domain, a mouse transmembrane domain and a mouse C-terminal intracellular domain; a chimeric receptor comprising a chicken N-terminal domain, a mouse transmembrane domain and a mouse C-terminal domain; a chimeric receptor comprising a mouse N-terminal extracellular domain, a chicken transmembrane domain and a chicken C-terminal intracellular signaling domain; a chimeric receptor comprising a mouse N-terminal extracellular domain, a rabbit transmembrane domain and a human C-terminal intracellular signaling domain; a chimeric receptor comprising a mouse N-terminal extracellular domain a human transmembrane domain and a mutant C-terminal intracellular non-signaling domain from mouse."

The chimeric receptors of this invention also include chimeric receptors comprising a sequence derived from Ig α or Ig β and another non-related sequence. For example, the present invention contemplates a chimeric Ig α receptor comprising an extracellular domain from a non-related protein, such as CDS or any other protein with an extracellular domain and a transmembrane Ig α domain and an intracellular Ig α domain.

The present invention further provides a hybridoma cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid is linked to an inducible functional expression sequence.

All of the sequences encoding Ig α and Ig β can be functionally linked to an expression sequence. The expression sequences can include a promoter, an enhancer, a

WO 02/066618

PCT/US02/04936

silencer and necessary information processing sites, such as ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites and transcriptional terminator sequences. The promoters utilized can be constitutive promoters or inducible promoters.

5 The inducible expression systems that can be used for the compositions and methods of the present invention include the IPTG based regulatory system, a tetracycline based regulatory system, CID based regulatory system, an ecdysone based regulatory system, and an estrogen-based regulatory system. Burcin et al., "A Regulatory System for Target Gene Expression" *Frontiers in Bioscience*, 3:1-7 (1998) describes these systems in detail and is incorporated herein in its entirety for the
10 purposes of describing these inducible expression systems. Another inducible system that can be utilized is the cre-lox system (See Lakso "Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice." *Proc. Natl Acad Sci USA* 89: 6861-65 (1992); Orban et al., "Tissue and site-specific DNA recombination in transgenic mice" *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6861-65 (1992); Gu et al., "Deletion of a DNA polymerase
15 beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting" *Science* 265: 103-106 (1994)). The nucleic acids of the present invention can also be under the control of an inducible metallothioneine promoter (See Cox and Maness "Neurite extension and protein tyrosine phosphorylation elicited by inducible expression of the v-src oncogene in a PC12 cell line" *Exp Cell Res* 195: 423-31 (1991)).

20 In addition to comprising vectors comprising a nucleic acid encoding at least one surface expressed antibody receptor selected from the group consisting of Iga and Igb, the hybridomas of the present invention can also comprise a vector comprising a nucleic acid encoding U1A, an enzyme involved in inhibiting the expression of the secretory form of immunoglobulin M (See Philips et al., "Regulation of nuclear poly
25 (A) addition controls the expression of immunoglobulin M secretory mRNA, *EMBO* 22:6443-6452 (2001)).

All of the hybridoma cells described in this application can be utilized in the methods described herein to make a monoclonal antibody of interest.

30 Methods of Making Hybridomas

Also provided by the present invention is a method for making a hybridoma cell comprising at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Iga and Igb comprising fusing a myeloma cell comprising a vector,

WO 02/066618

PCT/US02/04936

wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and/or Ig β , with a B cell to produce a hybridoma cell comprising at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .

5 In the methods of making the hybridoma cells of the present invention, the vector can integrate into the genome of the cell. The vector may also be carried extrachromosomally in the cell, thus allowing transient expression of Ig α and Ig β . In the methods of making the hybridomas of the present invention, the nucleic acids encoding Ig α and Ig β can be functionally linked to an inducible expression sequence.

10 Inducible expression systems are discussed above.

The myeloma cells of the present invention can comprise at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression
15 sequence. The myeloma cells of the present invention can also comprise a nucleic acid encoding a mutated Ig α receptor and/or a mutated Ig β receptor. An example of such a mutant receptor is an Ig α receptor comprising mutations at amino acid residues 176, 182, 193 and 204. The mutated Ig α receptors of the present invention also include a mutated Ig α that comprises one or more mutations selected from the group consisting
20 of Y176F, Y182F, Y193F and Y204F. Further provided by the present invention is a myeloma cell comprising a nucleic acid encoding a mutated Ig α receptor that comprises a deletion of amino acid residues 176-220. Another example of a mutant surface expressed antibody receptor is a mutated Ig β receptor comprising mutations at amino acid residues 190 and 206. The mutated Ig β receptors of the present invention also
25 include a mutated Ig β receptor comprising one or more mutations selected from the group consisting of Y190F and Y206F. The myeloma cell of the present invention can be a myeloma cell comprising a vector that encodes a mutant Ig α receptor, a myeloma cell comprising a vector that comprises a mutant Ig β receptor, or a myeloma cell that comprises a mutant Ig α receptor and a mutant Ig β receptor.

30 The myeloma cell utilized in the methods of the present invention can also comprise a nucleic acid encoding a chimeric Ig α receptor and/or a chimeric Ig β receptor.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

B cells

The present invention also provides a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β . Therefore, the B cells of this invention can comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α , or a vector comprising a nucleic acid encoding Ig β , or a vector comprising a nucleic acid encoding both Ig α and Ig β .

The B cells of the present invention can also comprise a vector comprising a nucleic acid encoding a mutated Ig α receptor and/or a mutated Ig β receptor. An example of such a mutant receptor is an Ig α receptor comprising mutations at amino acid residues 176, 182, 193 and 204. The mutated Ig α receptors of the present invention also include a mutated Ig α that comprises one or more mutations selected from the group consisting of Y176F, Y182F, Y193F and Y204F. Further provided by the present invention is a B cell comprising a vector comprising a nucleic acid encoding a mutated Ig α receptor that comprises a deletion of amino acid residues 176-220. Another example of a mutant surface expressed antibody receptor is a mutated Ig β receptor comprising mutations at amino acid residues 190 and 206. The mutated Ig β receptors of the present invention also include a mutated Ig β receptor comprising one or more mutations selected from the group consisting of Y190F and Y206F. The B cell of the present invention can be a B cell comprising a vector that encodes a mutant Ig α receptor, a B cell comprising a vector that encodes a mutant Ig β receptor, or a B cell that comprises a vector encoding a mutant Ig α receptor and a mutant Ig β receptor. The B cells of the present invention can also comprise a nucleic acid encoding a chimeric Ig α receptor and/or a chimeric Ig β receptor.

The present invention also provides a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding Ig α and Ig β is functionally linked to an inducible expression sequence and wherein the nucleic acid encoding Ig α and Ig β is integrated into the genome of the cell. Such a B cell can be obtained from the transgenic animals described herein.

The present invention also provides a method of making a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β comprising the steps of transfecting a B cell with a vector comprising at least one

WO 02/066618

PCT/US02/04936

nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an expression sequence. In the methods of making the B cells of the present invention, the nucleic acids encoding Ig α and Ig β can be functionally linked to an inducible expression sequence. In the methods of making the B cells of the present invention, the vector comprising at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β can be integrated into the genome of the B cell. Alternatively, the vector does not integrate into the genome of the cell and the vector is carried extrachromosomally to allow transient expression of Ig α and/or Ig β .

The vectors of the present invention can be transfected into cells using any technique known in the art. For example, lipofectamine transfection, microinjection, electroporation, liposomal delivery and particle gun bombardment can all be utilized to effect vector delivery to cells.

In order to transfect B cells removed from an animal's spleen, B cells can be propagated for 24-48 hours in culture so that they divide. A retroviral vector comprising a nucleic acid encoding comprising at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β can then be transfected into the cells. In order to promote proliferation, cytokines can be added to the culture. Cytokines that can be utilized in these methods include, but are not limited to, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , and/or TGF- β . B cells that produce antibodies bound to their cell surface can then be detected by methods known in the art and described herein, such as FACS, cell panning, ELISA etc. Alternatively, a viral vector such as an adenoviral vector, a lentiviral vector, an adeno-associated vector, a vaccinia virus vector, a pseudotyped retroviral vector can be utilized to transfect B cells. One of skill in the art would know how to test B cells for their ability to be transfected by a vector and select the vector that is most suitable for the introduction of nucleic acids into these cells. One of skill in the art can also engineer the B cells of the present invention to produce a cell surface receptor that would be recognized by a particular vector. For example, the B cells of the present invention could be engineered such that a cell-surface receptor for adenovirus is present on the cell surface of the B cells in order to facilitate entry of the adenoviral vector into the B cells. Alternatively, a viral vector comprising a ligand that binds to a receptor

WO 02/066618

PCT/US02/04936

(other than Ig α and Ig β) that has been introduced into the B cell can also be utilized to effect vector transfer. The presence of these cell surface receptors can be controlled by an inducible expression system described herein or elsewhere in the art, such that after transfection, expression of the cell surface receptor necessary for viral entry is no longer induced and thus the receptor is no longer expressed on the cell surface of the B cell. These B cells can then be fused to an immortalized cell, such as a naturally occurring myeloma or a genetically altered myeloma cell, such as those provided herein to make a hybridoma cell line expressing a monoclonal antibody of interest. Alternatively the amino acid sequence of the antibody or desired portion thereof, such as a variable region made by such B cell, or the nucleic acid (cDNA) that codes for such antibody or portion thereof, may be determined or isolated. Such DNA sequence may then be incorporated into a vector which directs the expression and secretion of such antibody and such vector transfected into a host cell, such as a myeloma or other appropriate immortal cell. Techniques for determining transfecting and expressing such antibody sequences are described in U.S. Pat. No. 5,627,052 and U.S. Pat. No. 6,331,415.

The B cells of the present invention can further comprise a detectable label.

The present invention also provides an immortalized B cell made by transfecting the B cell with a nucleic acid encoding telomerase. (See Bunk "Immortalizing Human Cells, *The Scientist* 14:19 (2000)). Immortalized B cells can also be made by inactivating pRB/p16 (INK4a) in addition to enhanced telomerase expression (See Kiyono et al., 1998; Dickson et al., 2000). Furthermore, immortalized cells can be made by overexpressing c-myc and simian virus 40 large T antigen (Greenberg et al., 1999; Kim et al., 2001). Immortalized B cells can also be made by overexpressing Cyclin D1 and inactivating p 53 (See Opitz et al., 2001) or by overexpressing SV40 large T antigen alone (Russo et al., 1998). Other methods of immortalizing B cells include overexpressing *ras* genes and overexpressing human papillomavirus 16E6 and E7 genes (See Coursen et al., 1997). Another combination of genes that can be utilized is hTERT, sv40 large T oncoprotein and an onco-allele of H-ras.

For some applications it may be desirable to generate B cells that are capable of expressing one or more Ig receptors and are also immortal. One means of achieving this is to use embryos derived from an animal that is transgenic for one or more

WO 02/066618

PCT/US02/04936

immortalizing genes. One such animal is an IMMORTOMOUSE® mouse, commercially available through Charles River Laboratories. Such mice have a temperature sensitive SV40 T antigen gene in most cells. Those of ordinary skill in the art will recognize that immortal B cells may also be obtained by using transgenic
5 animals that carry additional genes known to immortalize cells as described above such as hTERT or H-ras.

In addition to comprising vectors comprising a nucleic acid encoding at least one surface expressed antibody receptor selected from the group consisting of Igα and Igβ, the B cells of the present invention can also comprise a vector comprising a nucleic
10 acid encoding U1A, an enzyme involved in inhibiting the expression of the secretory form of immunoglobulin M (See Philips et al., "Regulation of nuclear poly (A) addition controls the expression of immunoglobulin M secretory mRNA, *EMBO* 22:6443-6452 (2001).

All of the B cells comprising vectors described herein can be fused to a
15 myeloma cell or other immortal cell line to make a hybridoma cell. The resulting hybridoma cell can be utilized in the methods of making a monoclonal antibody of interest described herein.

Plasma cells

20 There are approximately 10^8 B cells in a typical mouse spleen. About 99% of such B cells surface present antibody. However 1%, or 10^6 of such cells are plasma cells and typically surface present only trace amounts of antibody. Plasma cells are known to produce immunoglobulin that is highly specific and of strong affinity for particular target
25 antigens. This invention provides populations of plasma cells that surface present adequate immunoglobulin to enable high throughput fluorescence activated cell sorting technology to be used to determine whether single cells produce immunoglobulin that react with target antigens. Such plasma cells may be obtained from any animal such as the transgenic animals provided herein and can produce fully human immunoglobulin, if
30 isolated from a transgenic animal that expresses a nucleic acid coding for human antibodies in its B cells.

As stated above, plasma cells make very specific, high affinity antibodies to target antigens. Therefore, it is desirable to isolate plasma cells from among a larger population of B cells prior to sorting the plasma cells to identify cells that produce

WO 02/066618

PCT/US02/04936

desired antibodies. The marker SYNDECAN-1 is expressed to a higher degree on plasma cells than on other B cells. In addition, plasma cells do not express IGD or B220, whereas other B cells do express both markers. Commercial antibodies for SYNDECAN, IGD and B220 are available and the three markers may be used by those
5 of ordinary skill in the art to segregate plasma cells from among B cell populations by methods known in the art. Plasma cells may also be separated from other cells by density-based centrifugation where the fraction containing plasma cells is collected using an elutriator. Alternatively, a purified plasma cell population may be achieved using separation/purification columns such as those that utilizing magnetic beads.

10 The present invention provides a population of plasma cells wherein greater than 5 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface. Also provided by this invention is a population of plasma cells wherein greater than 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of the cells in the population express monoclonal
15 antibody that is bound to the cell surface.

The present invention also provides a plasma cell, wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface. Also provided by the present invention is a plasma cell, wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface. Further
20 provided by the present invention is a plasma cell, wherein greater than one hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface. The present invention also provides a plasma cell, wherein greater than two hundred and fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface. Also
25 provided by the present invention is a plasma cell, wherein greater than five hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.

Further provided by this invention is a population of plasma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of the population of cells is at least two fold
30 greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

The invention also provides a population of plasma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by

WO 02/066618

PCT/US02/04936

fluorescence, the fluorescence intensity of the population of cells is at least two fold, three fold, four fold, five fold, six fold, seven fold, eight fold, nine fold, ten fold, fifteen fold, twenty fold, thirty fold, forty fold, fifty fold, sixty fold, seventy fold, eighty fold, ninety fold, one hundred fold, two hundred and fifty fold, five hundred fold, one
5 hundred fold, two hundred and fifty fold, five hundred fold or one thousand fold greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β . The fold increase in fluorescence intensity can also be any amount in between the fold increases listed above. The fold increase in fluorescence intensity can be measured by methods
10 standard in the art and is described herein in the Examples.

The population of plasma cells utilized to measure fluorescence intensity can be between 25 and 500 cells. Therefore, the population can be about 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 cells or any number of cells in between these values.

15 The plasma cells in the population can comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α .

Further provided by the present invention is a population of plasma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody
20 is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

The present invention also provides a population of plasma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal
25 antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of at least 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% or any percentage in between of the cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

30 The present invention also provides a population of plasma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of at least 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% or any percentage in between of the cells is at least two fold,

WO 02/066618

PCT/US02/04936

three fold, five fold, six fold, seven fold, eight fold, nine fold, ten fold, twenty fold, thirty fold, forty fold, fifty fold, sixty fold, seventy fold, eighty fold, ninety fold, one hundred fold, two hundred and fifty fold, five hundred fold, one thousand fold or any amount in between, greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

All of the populations of plasma cells described herein can be utilized in the methods of making antibodies provide by the present invention such that the plasma cells of the present invention can be contacted with an antigen/antigens in order to identify monoclonal antibody producing cells which can be isolated and subsequently produced.

Myeloma cells

The present invention also provides a myeloma cell that comprises at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

Further provided by the present invention is a myeloma cell that comprises at least one nucleic acid functionally encoding at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

Also provided by the present invention is a myeloma cell that comprises a nucleic acid functionally encoding a mutated Ig α receptor having a deletion of amino acid residues 176- 220, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

Further provided by this invention is a myeloma cell that comprises a nucleic acid functionally encoding a mutated Ig α receptor having one or more mutations selected from the group consisting of: Y176F, Y182F, Y193F, Y204F, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

The present invention further provides a myeloma cell that comprises a nucleic acid functionally encoding a mutated Ig β receptor having one or more mutations

WO 02/066618

PCT/US02/04936

selected from the group consisting of: Y190F and Y206F, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

5 Any of the myeloma cells comprising vectors provided by the present invention can be fused to a B cell, including a B cell comprising a vector of the present invention, to make a hybridoma cell. The resulting hybridoma cell can then be used in the methods of making monoclonal antibodies described herein.

The present invention also provides a method of making a myeloma cell that comprises at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence comprising the steps of transfecting a myeloma cell with at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

The present invention also provides a method of making a myeloma cell that comprises at least one nucleic acid functionally encoding at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence comprising transfecting a myeloma cell with at least one nucleic acid functionally encoding at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

Also provided by the present invention is a method of making a myeloma cell that comprises a nucleic acid functionally encoding a mutated $Ig\alpha$ receptor having one or more mutations selected from the group consisting of: Y176F, Y182F, Y193F, Y204F, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence comprising transfecting a myeloma cell with a nucleic acid functionally encoding a mutated $Ig\alpha$ receptor having one or more mutations selected from the group consisting of: Y176F, Y182F, Y193F, Y204F, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

The present invention provides a method of making a myeloma cell that comprises a nucleic acid functionally encoding a mutated Ig β receptor having one or more mutations selected from the group consisting of: Y190F and Y206F, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence comprising transfecting a myeloma cell with a nucleic acid functionally encoding a mutated Ig β receptor having one or more mutations selected from the group consisting of: Y190F and Y206F, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

10 The present invention provides a method of making a myeloma cell that comprises a nucleic acid functionally encoding a mutated Ig α receptor having a deletion of amino acid residues 176- 220, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence comprising transfecting a myeloma cell with a nucleic acid functionally encoding a mutated Ig α receptor having a deletion of amino acid residues 176- 220, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.

In addition to comprising vectors comprising a nucleic acid encoding at least one surface expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , the myeloma cells of the present invention can also comprise a vector comprising a nucleic acid encoding U1A, an enzyme involved in inhibiting the expression of the secretory form of immunoglobulin M (See Philips et al., "Regulation of nuclear poly (A) addition controls the expression of immunoglobulin M secretory mRNA, *EMBO* 22:6443-6452 (2001).

25 The present invention also provides a method of screening myeloma cells or other other immortal cells for the presence of Ig α and Ig β on their surface. If a myeloma cell or an immortal cell naturally expressing Ig α and Ig β is identified, this cell can be fused to B cells to produce hybridoma cells expressing monoclonal antibodies on their cell surface. If a myeloma cell or an immortal cell naturally expressing Ig α is identified, this cell can be fused to the B cells of the present invention to produce hybridoma cells expressing monoclonal antibodies on their cell surface. Alternatively, this cell can be transfected with a vector comprising a nucleic acid encoding Ig β and then fused to a B cell in order to produce hybridoma cells expressing monoclonal antibodies on their cell surface. If a myeloma cell or an immortal cell

WO 02/066618

PCT/US02/04936

naturally expressing Ig β is identified, this cell can be fused to the B cells of the present invention to produce hybridoma cells expressing monoclonal antibodies on their cell surface. Alternatively, this cell can be transfected with a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and then fused to a B cell in order to produce hybridoma cells
5 expressing monoclonal antibodies on their cell surface.

Myeloma cells can also be screened to determine which of the myeloma cells is a suitable fusion partner for making hybridomas. One of skill in the art would know how to test myelomas for desirable fusion characteristics either before or after
10 screening for the presence of Ig α and/or Ig β in order to determine which ones are best suited for fusion with B cells. Alternatively, once a myeloma cell or immortalized cell is deemed to be suitable for fusion, this myeloma cell can be transfected with Ig α and/or Ig β prior to fusion with a B cell. In addition, since HAT selection is not required, the investigator's choice of the cell to be used as a fusion partner for B cells in
15 a given protocol is greatly expanded. Using DISH, myelomas or other candidate fusion partners can be identified that are more cell sparing or offer other advantages over standard myelomas in use today.

Methods of Making Monoclonal Antibodies

20 The present invention provides method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a population of hybridoma cells wherein greater than 15 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface with an antigen linked to a detectable label, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled hybridoma cell; b) isolating the
25 detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces the monoclonal antibody of interest; c) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.

Also provided is a method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a population of hybridoma cells wherein greater than 15 % of
30 the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface with an antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody ; b) adding a detectable label to the antigen to yield a detectably labeled hybridoma cell; c) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces

WO 02/066618

PCT/US02/04936

the monoclonal antibody of interest; d) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.

In the methods of making a monoclonal antibody described herein, conditions whereby an antigen/antibody complex can form as well as assays for the detection of the formation of an antigen/antibody complex and quantitation of the detected protein are standard in the art. Such assays can include, but are not limited to, Western blotting, immunoprecipitation, immunofluorescence, immunocytochemistry, immunohistochemistry, fluorescence activated cell sorting (FACS), fluorescence in situ hybridization (FISH), immunomagnetic assays, ELISA, ELISPOT (Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Wiley, New York (1995)), agglutination assays, flocculation assays, cell panning, magnetic separation etc., as are well known to those of skill in the art.

The antigen of this invention can be bound to a substrate (e.g., beads, tubes, slides, plates, nitrocellulose sheets, etc.) or conjugated with a detectable label (moiety) or both bound and conjugated. The detectable moieties contemplated for the present invention can include, but are not limited to, an immunofluorescence moiety (e.g., fluorescein, rhodamine), a radioactive moiety (e.g., ^{32}P , ^{125}I , ^{35}S), an enzyme moiety (e.g., horseradish peroxidase, alkaline phosphatase), a colloidal gold moiety, a dye and a biotin moiety. Such conjugation techniques are standard in the art (see, e.g., Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988); Yang et al., *Nature* 382: 319-324 (1996)). Labels can be coupled either directly or indirectly to the antigens. One example of indirect coupling is by use of a spacer moiety. These spacer moieties, in turn, can be either insoluble or soluble (Diener et al., *Science* 231: 148 (1986)).

There are many different labels and methods of labeling known to those of ordinary skill in the art. Examples of the types of labels which can be used in the present invention include enzymes, radioisotopes, fluorescent compounds, chemiluminescent compounds, microspheres dyes and bioluminescent compounds. Furthermore, the binding of these labels to the antigens required for practice of the invention can be done using standard techniques common to those of ordinary skill in the art.

Since the populations of hybridomas described herein can produce more than one monoclonal antibody, the present invention provides for methods of making monoclonal antibodies, wherein the population of cells is contacted with more than one

WO 02/066618

PCT/US02/04936

antigen. Once each antigen binds a monoclonal antibody of interest, each one can be detected by a separate label, thus identifying more than one monoclonal antibody of interest in a population of cells. For example, the population can be contacted with three antigens, wherein each antigen is labeled either directly or indirectly with a different fluorescent label. The monoclonal antibody producing cells can be detected and the three different monoclonal antibody producing cells can be distinguished based on the differences in fluorescence associated with the different labels. Therefore, the present invention allows the isolation and production of more than one monoclonal antibody from a population of cells. This same approach can be applied to the isolation and production of multiple monoclonal antibodies from the B cells of this invention, including the isolation and production of monoclonal antibodies from the plasma cells of this invention.

In the above methods of making a monoclonal antibody of interest, a population of hybridoma cells wherein greater than 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% can be contacted with the antigen.

A method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a hybridoma cell, wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface with an antigen linked to a detectable label, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled hybridoma cell; b) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces the monoclonal antibody of interest; c) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.

A method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a hybridoma cell, wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface with an antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody; b) adding a detectable label to the antigen to yield a detectably labeled hybridoma cell; c) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces the monoclonal antibody of interest; d) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.

In the above methods of making a monoclonal antibody of interest, a hybridoma cell wherein greater than fifty, one hundred, two hundred and fifty or five hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface can be contacted with the antigen.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

In all of the methods of making a monoclonal antibody of interest, the hybridoma cells can comprise a vector comprising a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β . The nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β can be a mutated Ig α and/or mutated Ig β , a chimeric Ig α and/or chimeric Ig β as described above.

The present invention also provides a method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β with an antigen linked to a detectable label, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled B cell; b) isolating the detectably labeled B cell, thus identifying a B cell that produces the monoclonal antibody of interest; and c) making the monoclonal antibody of interest.

The present invention also provides a method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β with an antigen; b) add a detectable label that binds to the antigen to yield a detectably labeled B cell; c) isolating the detectably labeled B cell, thus identifying a B cell that produces the monoclonal antibody of interest; and d) making the monoclonal antibody of interest.

The invention further provides a method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β with an antigen linked to a detectable label, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled B cell; b) isolating the detectably labeled B cell, thus identifying a B cell that produces the monoclonal antibody of interest; c) determining the amino acid sequence of the variable region of the monoclonal antibody; and d) making the monoclonal antibody of interest. The amino acid sequence of the variable region of the monoclonal antibody can be determined by obtaining RNA from an antibody producing cell, such as a B cell, constructing a cDNA, amplifying the cDNA by utilizing primers

WO 02/066618

PCT/US02/04936

corresponding to a DNA sequence in the variable region of the immunoglobulin chain, determining the nucleotide sequence and translating the nucleotide sequence in order to obtain an amino acid sequence for the variable region of the monoclonal antibody. For the purposes of determining the amino acid sequence of the variable region of a
5 monoclonal antibody, please see, U.S. Patent 5,627,052 which is hereby incorporated in its entirety by this reference.

The invention further provides a method of making a monoclonal antibody of interest comprising: a) contacting a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor
10 selected from the group consisting of Ig α and Ig β with an antigen linked to a detectable label, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled B cell; b) isolating the detectably labeled B cell, thus identifying a B cell that produces the monoclonal antibody of interest; c) obtaining a nucleic acid encoding the variable region of the monoclonal antibody and d) making the monoclonal antibody of
15 interest. A nucleic acid encoding the variable region of the monoclonal antibody can be obtained by isolating DNA from an antibody producing cell, such as a B cell. Once DNA is isolated, the DNA sequences encoding the rearranged variable regions, including the complementarity determining regions are amplified by PCR and the resulting amplification product sequenced. For the purposes of obtaining a nucleic acid
20 encoding the variable region of a monoclonal antibody, please see U.S. Patent 5, 627, 052 which is hereby incorporated in its entirety by this reference.

In all of the methods of making a monoclonal antibody of interest from B cells, the B cells can comprise a vector comprising a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .
25 The nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β can be a mutated Ig α and/or mutated Ig β , a chimeric Ig α and/or chimeric Ig β .

The present invention also provides a method of making a hybridoma cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a selected antigen comprising: a)
30 immunizing a mouse with the antigen; b) fusing a B cell from the immunized mouse with a myeloma cell that comprises at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β to produce a monoclonal antibody producing hybridoma cell, wherein the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the

WO 02/066618

PCT/US02/04936

cell surface; c) contacting the monoclonal antibody producing hybridoma cell with the antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody on the cell surface to produce a detectable hybridoma cell, and d) isolating the detectable hybridoma cell, thus making a hybridoma cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a specific antigen. In this method, the antigen can be directly labeled to yield a detectably labeled hybridoma cell.

As used herein, an "antigen" can be a peptide, a polypeptide, a recombinant polypeptide, a carbohydrate, a nucleic acid, a lipid, a fragment of a polypeptide, such as a C-terminal fragment or an N-terminal fragment, an organic compound, a synthetic compound, a naturally occurring compound derived from bacterial, plant, animal, protist or fungal source. The antigen can also comprise the binding site of a cell surface receptor such that monoclonal antibodies against that particular site can be made to target a cell surface receptor.

A method of making a hybridoma cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a selected antigen comprising: a) contacting a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$ with an antigen wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectable B cell; b) isolating the detectable B cell, thus identifying a B cell that produces the monoclonal antibody of interest and; c) fusing the B cell that produces the monoclonal antibody of interest to a myeloma cell to produce a hybridoma cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a selected antigen. In this method, the antigen can be directly labeled to yield a detectably labeled B cell.

Also provided by this invention is a transgenic animal comprising B cells comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$ functionally linked to expression sequences, including but not limited to a promoter, intronic sequences and poly-adenylation signal sequences. The B cells comprising a vector can comprise at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$. The B cells comprising a vector can comprise at least one chimeric surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$. The B cells comprising a vector can comprise a mutated $Ig\alpha$ receptor comprising one or more mutations selected from the group

WO 02/066618

PCT/US02/04936

consisting of: Y176F, Y182F, Y193F, Y204F. The B cells comprising a vector can comprise a mutated Ig β receptor comprising one or more mutations selected from the group consisting of: Y190F and Y206F.

5 The transgenic animals of this invention can be made by methods known in the art. For the purposes of generating a transgenic animal, screening the transgenic animal for the presence of a transgene and other methodology regarding transgenic animals, please see U.S. Patent No. 6,111,166 which is incorporated by this reference in its entirety. For example, the transgenic animals of this invention can be made by a) 10 injecting a transgene comprising a nucleic acid encoding Ig α functionally linked to an expression sequence and/or a transgene comprising a nucleic acid encoding Ig β functionally linked to an expression sequence into an embryo and b) allowing the embryo to develop into an animal. This can further comprise crossing the animal with a second animal to produce a third animal. B cells comprising a transgene, wherein the transgene comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody 15 receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β can be isolated from the transgenic animal of this invention. The transgenic animals of the present invention include, but are not limited to, mouse, rat, rabbit, guinea pig.

In the transgenic animals of the present invention, the transgene can be expressed in immature B cells, mature naive B cells, mature activated B cells, memory 20 B cells, B lineage lymphocytes and/or plasma cells. Therefore, the expression sequences can be selected such that expression of the transgene is directed to B cells, but not exclusively to B cells. The expression sequence can direct expression to one, more than one or all of the following types of B cells: immature B cells, mature naive B cells, mature activated B cells, memory B cells, B lineage lymphocytes and plasma 25 cells.

In the transgenic animals of the present invention, expression of the transgene can be controlled by an inducible promoter. The transgenic animal of this invention can utilize an inducible expression system such as the *cre-lox*, metallothioneine, or tetracycline-regulated transactivator system. Using the example of the *cre-lox* system, 30 the genes of interest (Ig α and Ig β) are inserted onto a plasmid or suitable viral vector containing a stop codon flanked by locus of crossing over (*loxP*) sites which comprise two 13 base pair inverted repeats separated by an 8 base pair spacer region. This cassette is under control of a specific promoter such as the immunoglobulin kappa,

WO 02/066618

PCT/US02/04936

immunoglobulin lambda, CD19, CD45R/B220, CD81 (TAPA-1), or CD138 (syndecan-1) promoter. The genes of interest are inserted in the plasmid on the opposite side of the *loxP*-stop-*loxP* region from the cell specific promoter. In another plasmid, *cre*-recombinase is inserted next to a promoter whose expression may be controlled (proI).

5 Each plasmid is micro-injected into the pronuclei of separate embryos and the embryos implanted into a pseudopregnant female. Additionally, the plasmids may be used to transform embryonic stem cells from a suitable animal. The latter will thereafter be combined with blastocysts from the same or similar non-human animal and re-

10 implanted into pseudopregnant foster mothers to generate chimeric animals comprising the plasmid comprising the transgene. Further methods of generating transgenic animals well known in the art, such as lipofectin or viral transfection of embryonic stem cells or pre-implantation embryos, may also be used. Alternatively, mice bearing a proI-*cre* transgene may include already established mice such as the interferon inducible 'Mx-Cre' mouse by Kuhn et al. (see below).

15 Transgenic animals are mated and the resulting F1 animals are screened for the gene via PCR and/or Southern blot analysis. After homozygosity for the transgene is established, animals possessing the proI-*cre* sequence are then mated with animals with an intact pro-*loxP*-stop-*loxP*-Ig α -Ig β . The resulting F1 animals are then screened for individuals possessing both transgenes by PCR and/or Southern blot analysis. In the

20 case of the 'Mx-Cre' *cre* recombinase transgene, expression of the pro-*loxP*-stop-*loxP*-Ig α -Ig β transgene is achieved by initiating expression of the *cre* recombinase such as through the injection of type-I interferon (IFN) as is the case with the 'Mx-Cre' *cre* recombinase transgene. The *cre*-recombinase will then initiate a recombination event targeted at the *loxP* sites by binding at the inverted repeats of one *lox* site and forming a

25 synapse with the second site. *Cre*-recombinase will then cleave the DNA in the spacer region and initiate strand exchange between the synapsed *loxP* sites. This will result in the deletion of the stop codon and transcription from the promoter through the Ig α and Ig β genes. A similar method is detailed by M. Lasko et al., in "Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice," PNAS, 89, 6232-6236, July 1992, and is included herein in its entirety. Though this is only one method of

30 using the *cre/lox* system similar results may be achieved by inserting the Ig α and Ig β genes onto a plasmid or viral vector in reverse orientation to the promoter and between *loxP* sites in opposite orientation (pro-*loxP*-Ig β -Ig α -*loxP*). In this scenario, once a

WO 02/066618

PCT/US02/04936

recombination event is initiated the genes may reverse orientation (pro-Ig α -Ig β) allowing transcription. An example of this is documented in M. Mitsou et al., "Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen," *Nature* 407, 636-642, Oct. 5, 2000 and included herein in its entirety. The use of Mx-Cre transgenic mouse and type-I IFN as an inducer was published by R. Kuhn et al., "Inducible gene targeting in mice," *Science*, 269(5229): 1427-1429, Sept. 8, 1995, and is included herein by reference in its entirety.

In another approach, B cells from animals with an intact pro-*loxP*-stop-*loxP*-Ig α -Ig β will be treated *in vitro* with a cell permeable Cre recombinase protein such as that described by Jo et al., "Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase," *Nature Biotechnology*, 19: 929-933, 2001, and is included herein by reference in its entirety.

The transgenic animals of the present invention can also utilize a tetracycline system where the genes of interest (Ig α and/or Ig β) are inserted into a plasmid or viral vector adjacent to a tetracycline-responsive promoter (TRE). In another plasmid, tetracycline-controlled transactivator (rtTA) is inserted next to a promoter that can direct expression to B cells or a constitutive promoter. As with the cre-lox system transgenic animals may be made by micro-injection of pronuclei or stem cell transformation. The resulting F1 animals are screened for the gene. Animals possessing the pro-rtTA sequence are bred to homozygosity and then mated with animals with an intact TRE- Ig α -Ig β . The resulting F1 animals are then screened for individuals possessing both transgenes. Expression of the transgene is achieved by injecting tetracycline or a suitable derivative such as doxycycline. The dox will bind to the rtTA allowing binding to the TRE and promoting transcription of the Ig α and/or Ig β genes. Use of the tetracycline inducible system is exemplified in D.Y. Ho et al., "Inducible gene expression from defective herpes simplex virus vectors using the tetracycline-responsive promoter system," *Brain Res. Mol. Brain Res.* 41(1-2): 200-209, Sept. 5, 1996; Y. Yoshida et al., "VSV-G-pseudotyped retroviral packaging through adenovirus-mediated inducible gene expression," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232(2): 379-382, Mar. 17, 1997; A. Hoffman et al., "Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette," *PNAS*, 93(11): 5185-5190, May, 28, 1996; and B. Massie et al., "Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette," *J.*

WO 02/066618

PCT/US02/04936

Virology, 72(3): 2289-2296, Mar. 1998, all of which are incorporated herein in their entireties by this reference.

Also provided by the present invention is a method of identifying a cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a specific antigen comprising: a) immunizing a transgenic animal comprising B cells comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β ; b) isolating the B cells from the animal of step a); c) contacting the cells of step b) with the antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectable labeled cell; and d) isolating the detectably labeled cell, thus identifying a cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a specific antigen.

The present invention also provides a hematopoietic stem cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .

The present invention is more particularly described in the following examples which are intended as illustrative only since numerous modifications and variations therein will be apparent to those skilled in the art.

EXAMPLES

20

This invention shows that the lack of antibody receptors Ig α and/or Ig β , is the major limitation to surface presentation of antibody in hybridomas. The membrane form of antibody binds these two receptors through the membrane spanning domain that is on the C-terminus of the full-length heavy chain (mHC) as shown in **Figure 1**.

Most myelomas have lost the ability to produce Ig α and/or Ig β , and the resulting hybridoma fusions no longer present surface mAb because they lack the the Ig α receptor or the Ig α and Ig β receptors (Kanavaros et al., 1995). Myelomas impart this lack of surface presentation of antibody to most hybridoma cell lines, even though many hybridomas are derived from early or mid-stage B-cells, which themselves present surface mAbs (Milcarek et al., 1996).

Engineering the constitutive expression of Ig α and/or Ig β : The cDNAs encoding the two receptor sequences Ig α and Ig β were PCR amplified from a mouse spleen cDNA library (Clontech). Restriction endonuclease cloning sites were added as part of

WO 02/066618

PCT/US02/04936

the oligonucleotide primers used in the PCR amplification as shown in **Figure 2A** and the appropriate-sized PCR products were obtained (**Figure 2B**). The confirmed sequences of the PCR-amplified receptor for Ig α and Ig β are shown in **Figures 3 and 4**, respectively. The PCR product containing Ig α was digested with *Hind*III and *Eco*RI and cloned into the corresponding replacement region of the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (Neo) (Invitrogen, Inc.). The PCR product containing the Ig β sequence was digested with *Hind*III and *Xho*I and cloned into the corresponding replacement regions of the eukaryotic expression vector pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen, Inc.). The structure of these two related pcDNA3.1 expression vectors are shown in **Figures 5 and 6**, respectively. The two vectors differ only in carrying resistance markers for Neomycin G418 and Zeocin, respectively. The resulting plasmids are termed p3.1NeoIg α and p3.1ZeoIg β , respectively. Both pcDNA3.1 vectors express cloned sequences under the control of the strong constitutive CMV promoter and BGH terminator. Recombinant plasmid DNA was purified over an endotoxin free purification kit (Qiagen, Inc.) in preparation for transfection.

A well-characterized hybridoma cell line, HGS1 (fusion of Sp2/0 and a mouse B cell) was utilized (cloned line 12G7). This line makes monoclonal antibodies to *E. coli* glutathione synthetase (GS) as described previously. The antibody reacts well with both a synthetic peptide designed from the GS sequence or the full-length GS protein. The myeloma cell line Sp2/0 forms the standard fusion partner used for over a decade at University of Georgia's monoclonal facility in producing hybridomas. Sp2/0 and derived hybridomas are grown on RPMI medium (RPMI-1640, Sigma, Inc.) supplemented with 20% fetal Bovine serum (Atlanta Biologicals, Inc.) and grown at 37°C with 5% CO₂.

Optimizing transfection and selection: A constitutive β -galactosidase (β -gal) reporter plasmid (pcDNA3.1/lacZ, Invitrogen) was utilized to optimize and quantify lipofection techniques on HGS1 hybridoma and Sp2/0 myeloma cell lines. Transfection was performed by mixing 6-8 μ l of LipofectAMINE reagent (Gibco BRL) with 1-2 μ g of plasmid DNA for 5 hr at 37°C in 1.0 ml of Opti-MEM 1 (GibcoBRL) reduced serum medium. Lipofection frequencies that occurred were relatively low, averaging approximately 30 transfectants per 500,000 cells, but were higher than previously reported for myeloma cells (Oi et al., 1983; Sun et al., 1991). The frequency of co-transfection of two DNAs was determined to average about 6-10 cells per

WO 02/066618

PCT/US02/04936

500,000. There was little difference between the frequency of transfecting or expressing linear or supercoiled plasmid DNA in several transfections, therefore, supercoiled DNA was used for subsequent experiments. Neomycin (Neo) (G418, Gibco BRL) and Zeocin (Invitrogen) kill curves were established on the same cells with 100% killing of control cells occurring over 7 days on 750 $\mu\text{g/ml}$ G418 and 750 mg/ml Zeocin. After this initial period of selection the G418 concentration remains the same, but the Zeocin concentration is reduced to 450 $\mu\text{g/ml}$. Cells are grown under continuous selection.

Transfection and expression of Ig receptor genes: Receptor protein levels were assayed on Western blots of crude extracts resolved by SDS-PAGE. Rabbit polyclonal antibodies to the two receptors were provided by Dr. Linda Matsuuchi (Univ. Vancouver). Strong receptor expression is seen in the 30-40 kDa range for the spleen cell control (SC) as shown in Figure 7, while the higher molecular weight bands appear to be background. Using a double-drug selection for Neomycin and Zeocin isolated several independent and stably co-transfected cell lines (HGS1 $\alpha\beta$ 1-HGS1 $\alpha\beta$ 16) containing the two constructs p3.1NeoI α and p3.1ZeolI β were isolated. Several of these cell lines were examined for I α and I β expression on western blots. Two of five lines examined in one experiment, HGS1-I $\alpha\beta$ 2 and HGS1-I $\alpha\beta$ 5 (Figure 7) produced measurable levels of I α protein. This experiment also revealed that all cell lines examined produced significant amounts of I β with or without transfection with the pNeo3.1I α and p3.1ZeolI β constructs. This background expression of I β was observed in myeloma line Sp2/0, the hybridoma line HGS1 (derived from a fusion between Sp2/0 and a mouse B-cell), all lines derived from HGS1, and other hybridoma lines derived from Sp2/0.

Increased surface presentation of antibody in transfected hybridoma lines: The lines expressing high levels of I α from p3.1NeoI α were examined for surface presentation of antibody in Figure 8. FITC-labeled sheep polyclonal anti-mouse antibody (Sigma) was used to measure the base level of mouse antibody on the surface of control cells, HGS1a. A low frequency of control cells present antibody with the typical result from several experiments being shown in Figure 8A-B. Remarkably, four of the six HGS1 $\alpha\beta$ cell lines transfected with both receptor plasmids ($\alpha\beta$ 6, $\alpha\beta$ 7, $\alpha\beta$ 9, $\alpha\beta$ 10) present large amounts of antibody on the surface of 100% of their cells as shown in Figure 8C, D, F, and G, respectively. A few cells in each field are

WO 02/066618

PCT/US02/04936

out of focus, but a through focus examination of the field of cells reveals that 99% of the cells in each of the four populations present detectable levels of surface antibody. Clearly, examination of these cell populations reveals a significant increase in both the frequency of the cells that present antibody relative to the control cells and increases in the level of expression. Two of the G418 and Zeocin resistant transfected cell lines ($\alpha\beta 8$, $\alpha\beta 11$) showed no significant surface presentation of antibody (**Figure 8E and 8H**). Surprisingly, they presented less surface antibody, even than control HGS1 cells, with none of the 100-plus cells examined showing detectable surface expression.

Examining Ig receptor expression in hybridoma cells presenting surface antibody: The same cell samples examined in **Figure 8** were aliquoted and frozen for subsequent examination of receptor protein levels. Initial results comparing $Ig\alpha$ and $Ig\beta$ receptor protein expression among the control HGS1 and transfected HGS1 $\alpha\beta$ cell lines are shown in **Figure 9 and 10**, respectively. Four of the Ig receptor plasmid transfected HGS1 $\alpha\beta$ cell lines express much more $Ig\alpha$ receptor compared to undetectable levels in control HGS1 cells. These cell lines expressing $Ig\alpha$ are the same lines showing 100% surface presentation of antibody in **Figure 8** (C $\alpha\beta 6$, D $\alpha\beta 7$, F $\alpha\beta 9$, G $\alpha\beta 10$). The $\alpha\beta 7$ line showed significantly less $Ig\alpha$ protein expression than the three other lines showing strong surface expression. The $\alpha\beta 7$ line showed surface expression of antibody in essentially all cells examined (**Figure 8D**, $\alpha\beta 7$), but at lower intensity than the other three surface expressing lines, showing a direct quantitative relationship between $Ig\alpha$ levels and surface presentation. Two HGS1 $\alpha\beta$ cell lines showed no $Ig\alpha$ protein expression on the Western ($\alpha\beta 8$ and $\alpha\beta 11$), and these two showed even less surface presentation than the controls. It seems possible that some form of co-suppression of $Ig\alpha$ activity has occurred in these two negative lines. High levels of $Ig\beta$ protein were detected all HGS1 derived cell lines examined and these levels did not correlate with surface presentation of antibody (**Figure 10**). Thus, increased surface antibody presentation on the HGS1 lines correlates directly and even semi-quantitatively with $Ig\alpha$ receptor protein expression.

Quantification of the mean fluorescence intensity of 50 cells in each population reveals that the transgenic $Ig\alpha$ expressing cells ($\alpha\beta 6$, $\alpha\beta 7$, $\alpha\beta 9$ and $\alpha\beta 10$) present about 5-times more antibody than control cells as shown in **Figure 11A**. A high percentage (60 to 80%) of strong $Ig\alpha$ expressing cells show a mean fluorescence

WO 02/066618

PCT/US02/04936

intensity 3-times greater than the mean for non-Ig α expressing cells (Figure 11B). Only 0-6% of the control cells reach this level of intensity. The quantification of these data probably underestimated the actual increase in fluorescence of Ig α expressing cells. These assays are limited by the dynamic range of our instrumentation for measuring the most fluorescent transgenic cells (i.e., many Ig α cells are so bright they exceed the capacity of our instrumentation) and inability to assay all cells in a single focal plane. In addition, we see a low level of autofluorescence in labeled cells and weak background fluorescence in cells treated with an FITC labeled control antibody. This background may account for some of the fluorescence seen control cells (Figure 8A & B).

Additional experiments showed that Ig receptor overexpression and increased surface presentation of antibody did not prevent normal antibody secretion from hybridoma cells. Initial assays on cell supernatants from the eight lines examined in Figures 8-11 showed that each cell line still secreted significant level of mAbGS1 monoclonal antibody.

Myelomas The same genetic alteration utilized above on hybridoma cells is performed on a standard myeloma fusion partner Sp2/0. Sp2/0 is a myeloma cell line obtained from mice, *Mus musculus* (BALB/c). Sp2/0 is one of the founding myeloma cell lines used to make hybridoma fusions (Fraser and Venter, 1980; Greene et al., 1980; Hurwitz et al., 1980). First, Sp2/0 cells were co-transfected with the p3.1NeoIg α and p3.1ZeoIg β constructs and selected for G418 and Zeocin resistance, to produce new cell lines Sp2 α β 1, Sp2 α β 2, etc. These Sp2 α β lines were characterized for Ig α and Ig β receptor expression on western blots as shown in Figure 12. Lines Sp2 α β 1 and Sp2 α β 2, show strong Ig α expression, and demonstrate that there is no post-transcriptional barrier to increasing receptor expression in myeloma cells. It appears that Ig β is already expressed at measurable levels in the control Sp2/0 control cells. These myeloma cell lines are ready to be fused with B cells in order to make hybridomas. Myeloma cells can be fused to a B cell or other antibody producing cell by methods standard in the art.

Fluorescent activated cell sorting further quantifies the increase in surface antibody presentation is linked to Ig α expression: Total antibody on the surface of HGS1 cells and HGS1 α β 10 cells was FITC labeled and the cells were sorted based on FITC fluorescence as shown in Figure 13. Comparison of panels A and B reveals that

WO 02/066618

PCT/US02/04936

the mean fluorescence of the HGS1Ig α β 10 cells is about 10-times greater than the fluorescence of HGS1 control cells (i.e., FL1 level of HGS1 α β 10 cells in B is shifted about one log to the right of control HGS1 cells in A). Panel C examines the sorting of a mixture of these cells and shows a similar result. This difference in the mean level of fluorescence serves as an independent quantification of the effect of Ig α expression to Figure 11. Increasing Ig α expression results in an increase in surface presentation of mouse antibody in hybridoma cells. In sorting of normal hybridoma cell populations prepared freshly from splenic B-cells there would be none of the background fluorescence due to GS antibody presentation (right hand shoulder on the peak in A), because most cells would be making antibodies to antigens other than GS. In conclusion, this clear increase in fluorescence due to Ig α expression demonstrates that DISH can be used in the direct selection of hybridomas.

Throughout this application, various publications are referenced. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference into this application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

REFERENCES

- 20 Antezak, D.F. (1982). Monoclonal antibodies: technology and potential use. *J Am Vet Med Assoc* **181**, 1005-10.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 [comment] [see comments]. *Science* **277**, 1453-74.
- Condon, C., Hourihane, S.L., Dang-Lawson, M., Escibano, J., and Matsuuchi, L. (2000). Aberrant trafficking of the B cell receptor Ig-alpha beta subunit in a B lymphoma cell line. *J Immunol* **165**, 1427-37.
- 30 Coursen, J.D., Bennett, W.P., Gollahon, L., Shay, J.W., and Harris, C.C. (1997). Genomic instability and telomerase activity in human bronchial epithelial cells during immortalization by human papillomavirus-16 E6 and E7 genes. *Exp Cell Res* **235**, 245-53.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

- Dickson, M.A., Hahn, W.C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J.Y., Weinberg, R.A., Louis, D.N., Li, F.P., and Rheinwald, J.G.** (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* **20**, 1436-47.
- Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B.A., Chissoe, S., Hunt, A.R., Collins, J.E., Bruskiwich, R., Beare, D.M., Clamp, M., Smit, L.J., Ainscough, R., Almeida, J.P., Babbage, A., Bagguley, C., Bailey, J., Barlow, K., Bates, K.N., Beasley, O., Bird, C.P., Blakey, S., Bridgeman, A.M., Buck, D., Burgess, J., Burrill, W.D., O'Brien, K.P., and et al.** (1999). The DNA sequence of human chromosome 22 [see comments] [published erratum appears in *Nature* 2000 Apr 20;404(6780):904]. *Nature* **402**, 489-95.
- Edwards-Gilbert, G., and Milcarek, C.** (1995). The binding of a subunit of the general polyadenylation factor cleavage polyadenylation specificity factor (CPSF) to polyadenylation sites changes during B cell development. *Nucleic Acids Symposium Series* **33**, 229-233.
- Edwards-Gilbert, G., and Milcarek, C.** (1995). Regulation of poly(A) site use during mouse B-cell development involves a change in the binding of a general polyadenylation factor in a B-cell stage-specific manner. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 6420-6429.
- Edwards-Gilbert, G., Veraldi, K., and Milcarek, C.** (1997). Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* **25**, 2547-2561.
- Flaspohler, J. A., Boczkowski, D., Hall, B. L., and Milcarek, C.** (1995). The 3'-untranslated region of membrane exon 2 from the gamma 2a immunoglobulin gene contributes to efficient transcription termination. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 11903-11.
- Flaspohler, J. A., and Milcarek, C.** (1990). Myelomas and lymphomas expressing the IgG2a H chain gene have similar transcription termination regions. *Journal of Immunology* **144**, 2802-2810.
- Fraser, C.M., and Venter, J.C.** (1980). Monoclonal antibodies to beta-adrenergic receptors: use in purification and molecular characterization of beta receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7034-8.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

- Galibert, F., Alexandraki, D., Baur, A., Boles, E., Chalwatzis, N., Chuat, J.C., Coster, F., Cziepluch, C., De Haan, M., Domdey, H., Durand, P., Entian, K.D., Gatus, M., Goffeau, A., Grivell, L.A., Hennemann, A., Herbert, C.J., Heumann, K., Hilger, F., Hollenberg, C.P., Huang, M.E., Jacq, C., Jauniaux, J.C., Katsoulou, C., Karpfinger-Hartl, L., and et al. (1996). Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *Embo J* 15, 2031-49.
- 5
- Galli, G., Guise, J. W., McDevitt, M. A., Tucker, P. W., and Nevins, J. R. (1987). Relative position and strengths of poly(A) sites as well as transcription termination are critical to membrane vs secreted mu-chain expression during B-cell development. *Genes & Dev* 1, 471-481.
- 10
- Genovese, C., Harrold, S., and Milcarek, C. (1991). Differential mRNA stabilities affect mRNA levels in mutant mouse myeloma cells. *Somat Cell Mol Genet* 17, 69-81.
- Genovese, C., and Milcarek, C. (1990). Increased half-life of mu immunoglobulin mRNA during mouse B cell development increases its abundance. *Mol Immunol* 27, 733-43.
- 15
- Glennie, M.J., and Johnson, P.W. (2000). Clinical trials of antibody therapy. *Immunol Today* 21, 403-10.
- Greenberg, R.A., O'Hagan, R.C., Deng, H., Xiao, Q., Hann, S.R., Adams, R.R., Lichtsteiner, S., Chin, L., Morin, G.B., and DePinho, R.A. (1999). Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 18, 1219-26.
- 20
- Greene, G.L., Nolan, C., Engler, J.P., and Jensen, E.V. (1980). Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 5115-9.
- 25
- Guise, J., Lim, P., Yuan, D., and Tucker, P. (1988). Alternative expression of secreted and membrane forms of immunoglobulin mu-chain is regulated by transcriptional termination in stable plasmacytoma transfectants. *Journal of Immunology* 140, 3988-3994.
- Hall, B. L., and Milcarek, C. (1989). Sequence and polyadenylation site determination of murine immunoglobulin gamma 2a membrane 3' untranslated region. *Mol Immunol* 26, 819-826.
- 30

WO 02/066618

PCT/US02/04936

- Hashimoto, S., Chiorazzi, N., and Gregersen, P.K. (1995). Alternative splicing of *CD79a* (*Ig-alpha/mb-1*) and *CD79b* (*Ig-beta/B29*) RNA transcripts in human B cells. *Mol Immunol* **32**, 651-9.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H.S.,
5 Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D.K., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T.,
Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J.,
Kumpf, K., Lehmann, R., Patterson, D., Reichwald, K., Rump, A., Schillhabel,
M., and Schudy, A. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. The
10 chromosome 21 mapping and sequencing consortium [see comments]. *Nature* **405**,
311-9.
- Hombach, J., Lottspeich, F., and Reth, M. (1990a). Identification of the genes
encoding the IgM-alpha and Ig-beta components of the IgM antigen receptor
complex by amino-terminal sequencing. *Eur J Immunol* **20**, 2795-9.
- Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., and Reth, M. (1990b).
15 Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class.
Nature **343**, 760-2.
- Hurwitz, J.L., Coleclough, C., and Cebra, J.J. (1980). CH gene rearrangements in
IgM-bearing B cells and in the normal splenic DNA component of hybridomas
making different isotypes of antibody. *Cell* **22**, 349-59.
- 20 Janeway, C. A., and Travers, P. (1994). *Immunobiology. The immune system in
health and disease* (New York: Garland Publishing, Inc).
- Kanavaros, P., Gaulard, P., Charlotte, F., Martin, N., Ducos, C., Lebezu, M., and
Mason, D.Y. (1995). Discordant expression of immunoglobulin and its associated
molecule mb-1/CD79a is frequently found in mediastinal large B cell lymphomas.
25 *Am J Pathol* **146**, 735-41.
- Kandasamy, M.K., McKinney, E., and Meagher, R.B. (1999). The late pollen
specific actins in angiosperms. *Plant J* **18**, 681-691.
- Kelly, D. E., and Perry, R. P. (1986). Transcriptional and post-transcriptional control
of Ig mRNA production during B lymphocyte development. *Nucleic Acids*
30 *Research* **14**, 5431-5441.
- Kim, H.S., Shin, J.Y., Yun, J.Y., Ahn, D.K., and Le, J.Y. (2001). Immortalization of
human embryonic fibroblasts by overexpression of c- myc and simian virus 40 large
T antigen. *Exp Mol Med* **33**, 293-8.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

- Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.J., McDougall, J.K., Galloway, D.A., and Klingelutz, A.J.** (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**, 84-8.
- Kohler, G., and Milstein, C.** (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495.
- Kobrin, B. J., Milcarek, C., and Morrison, S. L.** (1986). Sequences near the 3' secretion-specific polyadenylation site influence levels of secretion-specific and membrane-specific IgG2b mRNA in myeloma cells. *Molecular and Cellular Biology* **6**, 1687-1697.
- Konstantinos, N.S., and al., e.** (1999). Use of monoclonal antibodies for the diagnosis and treatment of bladder cancer. *Hybridoma* **18**, 219-224.
- Lassman, C. R., and Milcarek, C.** (1992). Regulated expression of the mouse $\gamma 2b$ Ig H chain gene is influenced by polyA site order and strength. *J Immunol* **148**, 2578-2585.
- Lassman, C.R., Matis, S., Hall, B.L., Toppmeyer, D.L., and Milcarek, C.** (1992). Plasma cell-regulated polyadenylation at the Ig gamma 2b secretion-specific poly(A) site. *J Immunol* **148**, 1251-60.
- Lebman, D. A., Park, M. J., Fatica, R., and Zhang, Z.** (1992). Regulation of usage of membrane and secreted 3' termini of alpha mRNA differs from mu mRNA. *Journal of Immunology* **148**, 3282-3289.
- Li, Y., Kandasamy, M.K., and Meagher, R.B.** (2001). Rapid isolation of monoclonal antibodies: monitoring enzymes in the phytochelatin synthesis pathway. *Plant Physiol* in press.
- Lockhart, D.J., and Winzler, E.A.** (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**, 827-36.
- MacBeath, G., and Schreiber, S.L.** (2000). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination [see comments]. *Science* **289**, 1760-3
- Matis, S.A., Martincic, K., and Milcarek, C.** (1996). B-lineage regulated polyadenylation occurs on weak poly(A) sites regardless of sequence composition at the cleavage and downstream regions. *Nucleic Acids Res* **24**, 4684-92.
- McClelland, M., and Wilson, R.K.** (1998). Comparison of sample sequences of the *Salmonella typhi* genome to the sequence of the complete *Escherichia coli* K-12 genome. *Infect Immun* **66**, 4305-12.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

- Meilhoc, E., Wittrup, K.D., and Bailey, J.E.** (1989). Application of flow cytometric measurement of surface IgG in kinetic analysis of monoclonal antibody synthesis and secretion by murine hybridoma cells. *J Immunol Methods* **121**, 167-74.
- Milcarek, C., and Hall, B.** (1985). Cell-specific expression of secreted versus membrane forms of immunoglobulin gamma 2b mRNA involves selective use of alternate polyadenylation sites. *Mol Cell Biol* **5**, 2514-2520.
- Milcarek, C., Hartman, M., and Croll, S.** (1996). Changes in abundance of IgG 2a mRNA in the nucleus and cytoplasm of a murine B-lymphoma before and after fusion to a myeloma cell. *Mol Immunol* **33**, 691-701.
- Milcarek, C., Suda-Hartman, M., and Croll, S.C.** (1996). Changes in abundance of IgG 2a mRNA in the nucleus and cytoplasm of a murine B-lymphoma before and after fusion to a myeloma cell. *Mol Immunol* **33**, 691-701.
- Miller, R.A., Maloney, D.G., Warnke, R., and Levy, R.** (1982). Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med* **306**, 517-22.
- Milstein, C.** (2000). With the benefit of hindsight. *Immunol Today* **21**, 359-64.
- Morio, T., Urushihara, H., Saito, T., Ugawa, Y., Mizuno, H., Yoshida, M., Yoshino, R., Mitra, B.N., Pi, M., Sato, T., Takemoto, K., Yasukawa, H., Williams, J., Maeda, M., Takeuchi, I., Ochiai, H., and Tanaka, Y.** (1998). The *Dictyostelium* developmental cDNA project: generation and analysis of expressed sequence tags from the first-finger stage of development. *DNA Res* **5**, 335-40.
- Mullner, S., Neumann, T., and Lottspeich, F.** (1998). Proteomics--a new way for drug target discovery. *Arzneimittelforschung* **48**, 93-5.
- O'Reilly, L.A., Cullen, L., Moriishi, K., O'Connor, L., Huang, D.C., and Strasser, A.** (1998). Rapid hybridoma screening method for the identification of monoclonal antibodies to low-abundance cytoplasmic proteins. *Biotechniques* **25**, 824-30.
- Oi, V.T., Morrison, S.L., Herzenberg, L.A., and Berg, P.** (1983). Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 825-9.
- Opitz, O.G., Suliman, Y., Hahn, W.C., Harada, H., Blum, H.E., and Rustgi, A.K.** (2001). Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism. *J Clin Invest* **108**, 725-32.
- Pandey, A., and Mann, M.** (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837-46.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

- Pandey, A., Podtelejnikov, A.V., Blagoev, B., Bustelo, X.R., Mann, M., and Lodish, H.F.** (2000). Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 179-84.
- 5 **Parks, D.R., Bryan, V.M., Oi, V.T., and Herzenberg, L.A.** (1979). Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1962-6.
- Persidis, A.** (1998). Proteomics. *Nat Biotechnol* **16**, 393-4.
- Price, C.P., and Newman, D.J.** (1997). *Principles and practice of Immunoassay*,
- 10 **Richards, J.D., Gold, M.R., Hourihane, S.L., DeFranco, A.L., and Matsuuchi, L.** (1996). Reconstitution of B cell antigen receptor-induced signaling events in a nonlymphoid cell line by expressing the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **271**, 6458-66.
- Russo, I., Silver, A.R., Cuthbert, A.P., Griffin, D.K., Trott, D.A., and Newbold,**
- 15 **R.F.** (1998). A telomere-independent senescence mechanism is the sole barrier to Syrian hamster cell immortalization. *Oncogene* **17**, 3417-26.
- Sakaguchi, N., Kashiwamura, S., Kimoto, M., Thalmann, P., and Melchers, F.** (1988). B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. *Embo J* **7**, 3457-64.
- 20 **Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Katoh, T., Asamizu, E., Kotani, H., and Tabata, S.** (2000). Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. X. Sequence features of the regions of 3,076,755 bp covered by sixty P1 and TAC clones. *DNA Res* **7**, 31-63.
- Signals.** (2000). Companies load up on magic bullets, *Signals Magazine* **October**, 1-9
- 25 (<http://www.recap.com/signalsma>).
- Sun, L.K., Liou, R.S., Sun, N.C., Gossett, L.A., Sun, C., Davis, F.M., MacGlashan, D.W., Jr., and Chang, T.W.** (1991). Transfectomas expressing both secreted and membrane-bound forms of chimeric IgE with anti-viral specificity. *J Immunol* **146**, 199-205.
- 30 **Yuan, D., and Tucker, P. W.** (1984). Transcriptional regulation of the mu-delta heavy chain locus in normal murine B-lymphocytes. *J Exp Medicine* **160**, 564-572.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

What is claimed is:

1. A population of hybridoma cells wherein greater than 15 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface.
2. A population of hybridoma cells wherein greater than 25 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface.
3. A population of hybridoma cells wherein greater than 50% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface.
4. A population of hybridoma cells wherein greater than 75% of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface.
5. A hybridoma cell, wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.
6. A hybridoma cell, wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.
7. A hybridoma cell, wherein greater than one hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.
8. A hybridoma cell, wherein greater than two hundred and fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.
9. A hybridoma cell, wherein greater than five hundred monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface.
10. A population of hybridoma cells wherein greater than 15 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

11. A population of hybridoma cells wherein greater than 15 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.
12. A population of hybridoma cells wherein greater than 25 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.
13. A population of hybridoma cells wherein greater than 25 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface and wherein greater than fifty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface of the cells in the population that express monoclonal antibody.
14. A hybridoma cell, wherein from about 0.01 % to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface.
15. A population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface.
16. A population of hybridoma cells wherein greater than 15% of the hybridoma cells in the population express from about 0.01% to about 10% of the total amount of monoclonal antibody produced by the hybridoma cells on the cell surface, and wherein greater than twenty monoclonal antibodies are expressed and bound to the cell surface.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

17. A hybridoma cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .
18. The hybridoma cell of claim 17, comprising at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .
19. The hybridoma cell of claim 17, comprising at least one chimeric surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .
20. The hybridoma cell of claim 17, wherein the hybridoma cell comprises Ig α .
21. The hybridoma cell of claim 17, wherein the hybridoma cell comprises Ig β .
22. The hybridoma cell of claim 17, wherein the hybridoma cell comprises Ig α and Ig β .
23. The hybridoma cell of claim 18, wherein the mutated Ig α receptor comprises one or more mutations selected from the group consisting of: Y176F, Y182F, Y193F, Y204F
24. The hybridoma cell of claim 18, wherein the mutated Ig α receptor comprises one or more mutations selected from the group consisting of: Y176F, Y182F, Y193F, Y204F.
25. The hybridoma cell of claim 18, wherein the mutated Ig α receptor comprises a deletion of amino acid residues 176 – 220.
26. The hybridoma cell of claim 18, wherein the mutated Ig β receptor comprises one or more mutations selected from the group consisting of: Y190F and Y206F.
27. The hybridoma cell of claim 17, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding Ig α .

WO 02/066618

PCT/US02/04936

28. The hybridoma cell of claim 17, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding Ig β .
29. The hybridoma cell of claim 17, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding Ig α and Ig β .
30. The hybridoma cell of claim 17, wherein the nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β is functionally linked to an expression sequence.
31. The hybridoma cell of claim 30, wherein the expression sequence is an inducible expression sequence.
32. The hybridoma cell of claim 17, wherein the vector is integrated into the genome of the cell.
33. The hybridoma cell of claim 17, wherein the vector is not integrated into the genome of the cell.
34. A hybridoma cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid is linked to an inducible functional expression sequence.
35. A method for making a hybridoma cell comprising at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β comprising fusing a myeloma cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , with a B cell to produce a hybridoma cell comprising at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .

WO 02/066618

PCT/US02/04936

36. The method of claim 34, wherein the vector integrates into the genome of the hybridoma cell.
37. The method of claim 34, wherein the vector does not integrate into the genome of the hybridoma cell.
38. The method of claim 34, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.
39. The method of claim 34, wherein the myeloma cell comprises at least one nucleic acid functionally encoding at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$, wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.
40. The method of claim 39, wherein the myeloma cell comprises at least one nucleic acid functionally encoding a mutated $Ig\alpha$ receptor comprising one or more mutations selected from the group consisting of: Y176F, Y182F, Y193F, Y204F.
41. The method of claim 39, wherein the myeloma cell comprises at least one nucleic acid functionally encoding a mutated $Ig\beta$ receptor comprising one or more mutations selected from the group consisting of: Y190F and Y206F.
42. A hybridoma cell produced by the method of claim 35.
43. A B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$.
44. The B cell of claim 43, comprising at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

45. The B cell of claim 43, comprising at least one chimeric surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .
46. The B cell of claim 43, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding Ig α .
47. The B cell of claim 43, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding Ig β .
48. The B cell of claim 43, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding Ig α and Ig β .
49. The B cell of claim 43, wherein the nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β is functionally linked to an expression sequence.
50. The B cell of claim 43, wherein the expression sequence is inducible.
51. The B cell of claim 44, wherein the mutated Ig α receptor comprises one or more mutations selected from the group consisting of: Y176F, Y182F, Y193F, Y204F.
52. The B cell of claim 44, wherein the mutated Ig α receptor comprises a deletion of amino acid residues 176 -220.
53. The B cell of claim 44, wherein the mutated Ig β receptor comprises one or more mutations selected from the group consisting of: Y190F and Y206F.
54. The B cell of claim 43, wherein the vector integrates into the genome of the B cell.
55. A B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the vector comprises a nucleic acid

WO 02/066618

PCT/US02/04936

- encoding Ig α and Ig β and wherein the vector is integrated into the genome of the B cell.
56. A method of making the B cell of claim 43, comprising transfecting a B cell with a vector comprising at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an expression sequence.
57. The method of claim 56, wherein the expression sequence is an inducible expression sequence.
58. The method of claim 56, wherein the vector integrates into the genome of the B cell.
59. A B cell produced by the method of claim 56.
60. A myeloma cell comprising at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.
61. A myeloma cell comprising at least one nucleic acid functionally encoding at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.
62. The myeloma cell of claim 61, wherein the mutated Ig α receptor is a mutated Ig α receptor comprising one or more mutations selected from the group consisting of: Y176F, Y182F, Y193F, Y204F.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

63. The myeloma cell of claim 61, wherein the mutated Ig β receptor is a mutated Ig β receptor comprising one or more mutations selected from the group consisting of: Y190F and Y206F.
64. The myeloma cell of claim 61, wherein the mutated Ig α receptor is an Ig α comprising a deletion of amino acid residues 176-220.
65. The myeloma cell of claim 60, wherein the vector comprising a nucleic acid encoding Ig α .
66. The myeloma cell of claim 60, wherein the vector comprising a nucleic acid encoding Ig β .
67. The myeloma cell of claim 60, wherein the vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and Ig β .
68. A method of making the myeloma of claim 60, comprising transfecting a myeloma cell with at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.
69. A method of making the myeloma of claim 61, comprising transfecting a myeloma cell with at least one nucleic acid functionally encoding at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β , wherein the nucleic acid encoding the surface-expressed antibody receptor is functionally linked to an inducible expression sequence.
70. A method of making a monoclonal antibody of interest comprising:
 - a) contacting a population of hybridoma cells wherein greater than 15 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface with an antigen linked to a detectable label, wherein the

WO 02/066618

PCT/US02/04936

antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled hybridoma cell;

- b) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces the monoclonal antibody of interest; and
- c) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.

- 71. A method of making a monoclonal antibody of interest comprising:
 - a) contacting a population of hybridoma cells wherein greater than 15 % of the cells in the population express monoclonal antibody that is bound to the cell surface with an antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody ;
 - b) adding a detectable label to the antigen to yield a detectably labeled hybridoma cell;
 - c) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces the monoclonal antibody of interest; and
 - d) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.
- 72. The method of claim 70, wherein the detectable label is a fluorescent label, and wherein the hybridoma cell is isolated via fluorescence activated cell sorting.
- 73. The method of claim 71, wherein the detectable label is a fluorescent label, and wherein the hybridoma cell is isolated via fluorescence activated cell sorting
- 74. A monoclonal antibody produced by the method of claim 70.
- 75. A monoclonal antibody produced by the method of claim 71.
- 76. A method of making a monoclonal antibody of interest comprising:
 - a) contacting a hybridoma cell, wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface with an

WO 02/066618

PCT/US02/04936

antigen linked to a detectable label, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled hybridoma cell;

- b) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces the monoclonal antibody of interest;
- c) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.

77. A method of making a monoclonal antibody of interest comprising:

- a) contacting a hybridoma cell, wherein greater than twenty monoclonal antibody molecules are expressed and bound to the cell surface with an antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody;
- b) adding a detectable label to the antigen to yield a detectably labeled hybridoma cell;
- c) isolating the detectably labeled hybridoma cell, thus identifying a hybridoma cell that produces the monoclonal antibody of interest; and
- d) making the monoclonal antibody of interest from the hybridoma cell.

78. The method of claim 76, wherein the detectable label is a fluorescent label, and wherein the hybridoma cell is isolated via fluorescence activated cell sorting.

79. The method of claim 77, wherein the detectable label is a fluorescent label, and wherein the hybridoma cell is isolated via fluorescence activated cell sorting.

80. A monoclonal antibody produced by the method of claim 76.

81. A monoclonal antibody produced by the method of claim 77.

82. The present invention also provides a method of making a monoclonal antibody of interest comprising:

WO 02/066618

PCT/US02/04936

- a) contacting a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β with an antigen linked to a detectable label, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectably labeled B cell;
 - b) isolating the detectably labeled B cell, thus identifying a B cell that produces the monoclonal antibody of interest; and
 - c) making the monoclonal antibody of interest.
83. The present invention also provides a method of making a monoclonal antibody of interest comprising:
- a) contacting a B cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β with an antigen;
 - b) adding a detectable label that binds to the antigen to yield a detectably labeled B cell;
 - c) isolating the detectably labeled B cell, thus identifying a B cell that produces the monoclonal antibody of interest; and
 - d) making the monoclonal antibody of interest.
84. The method of claim 82, wherein the detectable label is a fluorescent label, and wherein the hybridoma cell is isolated via fluorescence activated cell sorting.
85. The method of claim 83, wherein the detectable label is a fluorescent label, and wherein the hybridoma cell is isolated via fluorescence activated cell sorting.
86. A monoclonal antibody produced by the method of claim 82.
87. A monoclonal antibody produced by the method of claim 83.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

88. A method of making a hybridoma cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a selected antigen comprising:
- a) immunizing a mouse with the antigen;
 - b) fusing a B cell from the immunized mouse with a myeloma cell that comprises at least one nucleic acid functionally encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β to produce a monoclonal antibody producing hybridoma cell, wherein the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell is expressed and bound to the cell surface;
 - c) contacting the monoclonal antibody producing hybridoma cell with the antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody on the cell surface to produce a detectable hybridoma cell,
 - d) detecting the hybridoma cell and;
 - e) isolating the hybridoma cell, thus making a hybridoma cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a specific antigen.
89. The method of claim 88, wherein the antigen is linked to a detectable label.
90. A method of making a hybridoma cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a selected antigen comprising:
- a) contacting the B cell of claim 43 with an antigen, wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectable B cell;
 - b) detecting the B cell;
 - c) isolating the B cell, thus identifying a B cell that produces the monoclonal antibody of interest and;
 - d) fusing the B cell that produces the monoclonal antibody of interest to a myeloma cell to produce a hybridoma cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a selected antigen.
91. The method of claim 90, wherein the antigen is linked to a detectable label.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

92. A transgenic animal comprising B cells comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$.
93. The transgenic animal of claim 92, wherein the B cells comprise at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$.
94. The transgenic animal of claim 92, wherein the B cells comprise at least one mutated surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$.
95. The transgenic animal of claim 92, wherein the B cells comprise at least one chimeric surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of $Ig\alpha$ and $Ig\beta$.
96. The transgenic animal of claim 92, wherein the mutated $Ig\alpha$ receptor comprises one or more mutations selected from the group consisting of: Y176F, Y182F, Y193F, Y204F.
97. The transgenic animal of claim 92, wherein the mutated $Ig\beta$ receptor comprises one or more mutations selected from the group consisting of: Y190F and Y206F.
98. A method of generating the transgenic animal of claim 92 comprising:
 - a) injecting a transgene comprising a nucleic acid encoding $Ig\alpha$ functionally linked to an expression sequence and/or a transgene comprising a nucleic acid encoding $Ig\beta$ functionally linked to an expression sequence into an embryo;
 - b) allowing the embryo to develop into an animal.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

99. The method of claim 98 further comprising crossing the animal of claim 73 with a second animal to produce a third animal.
100. The method of claim 98, wherein the animal is a mouse.
101. The method of claim 98, wherein the animal is a rabbit.
102. The method of claim 98, wherein the animal is a rat.
103. The method of claim 98, wherein the animal is a guinea pig.
104. The method of claim 98, wherein the expression of the transgene is inducible.
105. The transgenic animal of claim 92, wherein the expression of the transgene is controlled by the cre-lox expression system.
106. The transgenic animal of claim 92, wherein the expression of the transgene is controlled by an inducible tetracycline promoter system.
107. A method of identifying a cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a specific antigen comprising:
- a) immunizing the animal of claim 92 with the antigen;
 - b) isolating the B cells from the animal of step a);
 - c) contacting the cells of step b) with the antigen wherein the antigen binds to the monoclonal antibody to yield a detectable B cell c) detecting the B cell;
 - d) isolating the detectable B cell, thus identifying a cell that produces a monoclonal antibody that recognizes a specific antigen.
108. The method of claim 107, wherein the detectable label is a fluorescent label, and wherein the hybridoma cell is isolated via fluorescence activated cell sorting.
109. The transgenic animal produced by the method of claim 98.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

110. A B cell obtained from the animal of claim 92.
111. A hematopoietic stem cell comprising a vector, wherein the vector comprises a nucleic acid encoding at least one surface-expressed antibody receptor selected from the group consisting of Ig α and Ig β .
112. A hybridoma cell comprising an extra copy of a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .
113. The hybridoma cell of claim 112, wherein the nucleic acid encodes Ig α .
114. A population of hybridoma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of the population of cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .
115. The population of claim 114, wherein the fluorescence intensity is at least five fold greater.
116. The population of claim 114, wherein the fluorescence intensity is at least ten fold greater.
117. The population of claim 114, wherein the fluorescence intensity is at least twenty five fold greater.
118. The population of claim 114, wherein the fluorescence intensity is at least fifty fold greater.
119. The population of claim 114, wherein the fluorescence intensity is at least one hundred fold greater.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

120. The population of claim 114, wherein the hybridoma cells comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α .
121. The population of claim 114, wherein the population is between 25 and 250 cells.
122. A population of plasma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence the fluorescence intensity of the population of cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that does not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .
123. The population of claim 122, wherein the fluorescence intensity is at least five fold greater.
124. The population of claim 122, wherein the fluorescence intensity is at least ten fold greater.
125. The population of claim 122, wherein the fluorescence intensity is at least twenty five fold greater.
126. The population of claim 122, wherein the fluorescence intensity is at least fifty fold greater.
127. The population of claim 122, wherein the fluorescence intensity is at least one hundred fold greater.
128. The population of claim 122, wherein the hybridoma cells comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α .
129. The population of claim 122, wherein the population is between 25 and 250 cells.

WO 02/066618

PCT/US02/04936

130. A population of hybridoma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence, the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least two fold greater than a the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .
131. The population of claim 130, wherein the fluorescence intensity of at least 25% of the cells is at least two fold greater than a the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .
132. The population of claim 130, wherein the fluorescence intensity of at least 50% of the cells is at least two fold greater than a the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .
133. The population of claim 130, wherein the fluorescence intensity of at least 75% of the cells is at least two fold greater than a the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .
134. The population of claim 130, wherein the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least three fold greater than a the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .
135. The population of claim 130, wherein the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least five fold greater than a the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

WO 02/066618

PCT/US02/04936

136. The population of claim 130, wherein the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least ten fold greater than a the fluorescence intensity of a population of hybridoma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Iga and/or Igβ.
137. The population of claim 130, wherein the hybridoma cells comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Iga.
138. The population of claim 130, wherein the population is 25 to 250 cells.
139. A population of plasma cells comprising a vector comprising a nucleic acid encoding Iga and/or Igβ that expresses monoclonal antibody bound to the cell surface, wherein when the monoclonal antibody is detected by fluorescence the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least two fold greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Iga and/or Igβ.
140. The population of claim 139, wherein the fluorescence intensity of at least 25% of the cells is at least two fold greater than a the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Iga and/or Igβ.
141. The population of claim 139, wherein the fluorescence intensity of at least 50% of the cells is at least two fold greater than a the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Iga and/or Igβ.
142. The population of claim 139, wherein the fluorescence intensity of at least 75% of the cells is at least two fold greater than a the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Iga and/or Igβ.
143. The population of claim 139, wherein the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least three fold greater than a the fluorescence intensity

WO 02/066618

PCT/US02/04936

of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .

144. The population of claim 139, wherein the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least five fold greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .
145. The population of claim 139, wherein the fluorescence intensity of at least 10% of the cells is at least ten fold greater than the fluorescence intensity of a population of plasma cells that do not comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α and/or Ig β .
146. The population of claim 139, wherein the plasma cells comprise a vector comprising a nucleic acid encoding Ig α .
147. The population of claim 139, wherein the population is 25 to 250 cells.

WO 02/066618

2/13

PCT/US02/04936

Figure 2

A

Ig α -1S (sense oligo for Ig α containing and SpeI and HindIII cloning sites)

5' TAG TGA ACT AGT AAG CTT GCC ACC ATG CCA GGG GGT CTA GAA GCC CTC A
3'

Ig α -221A (antisense oligo for Ig α containing EcoRI and ClaI cloning sites)

5' GTC TAG ATC GAT GAA TTC TCA TGG CTT TTC CAG CTG GGC ATC 3'

Ig β -1S (sense oligo for Ig β containing SpeI and HindIII cloning sites)

5' TAG TGA ACT AGT AAG CTT GCC ACC ATG GCC ACA CTG GTG CTG TCT TCC
ATG 3'

Ig β -229A (antisense oligo for Ig β containing XhoI and ClaI cloning sites)

5' GTC TAG ATC GAT CTC GAG TCA TTC CTG GCC TGG ATG CTC TCC TAC CGA 3'

B.

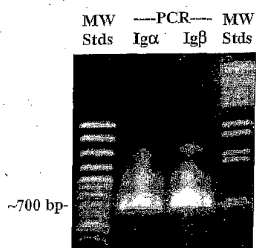


Figure 3

p3.1NeoIg_κ Length: 681
 Translation
 HindIII Signal M P G G L E A L R A L P L
 AACCTT GCCACC ATG CCA GGG GGT CTA GAA GCC CTC AGA GCC CTG CCT CTC
 L L F L S Y A C L G P G C Q A L R
 CTC CTC TTC TTG TCA TAC GGC TGT TTG GGT CCC GGA TGC CAG GCC CTG CCG
 V E G G P P S L T V N L G E E A R
 GAA GAA GGG GGT CCA CCA TCC CTG ACG CTG AAC TTG GGC GAG GAG GCC CCG
 L T C E N N G R N P N I T W W F S
 CTC ACC TTG CAA AAC AAT GGC AGG AAC CCT AAT ATC ACA TGG TGG TTC ACC
 L Q S N I T W P P V P L G P G Q G
 CTT CAG TCT AAT ATC ACA TGG CCC CCA GAG CCA CTG GGT CTT GGC CAG GGT
 T T G Q L F F P E V N K N H R G L
 ACC ACA GGC CAG CTG TTC TTG CCG GAA GTA AAC AAG AAC CAC AGG GGC TTG
 Y W C Q V I E N N I L K R S C G T
 TAC TGG TGC CAA GAG ATA GAA AAC AAC ATA TTA AAA CCG TCC TGT GGT ACT
 Y L R V R N P V P R P F L D M G E
 TAC CTC GGC CTG GCT AAT CCA GTC CCT AAG CCC TTC CTG GAC ATG GGG GAA
 G T K N R I I T A E G I I L L F C
 GGT ACC AAG AAC CCG ATC ATC ACA GCA GAA GGG ATC ATC TTG CTG TTC TGT
 A V V P G T L L L P R K R W Q N E
 GCA GAG GAG CCA GGG AAG CTG CTG CTA TTC AAG AAA CCG TGG CAA AAT GAG
 K F G V D M P D D Y E D E N L Y E
 AAG TTT GGG GAG GAC ATG CCA GAT GAC TTT GAA GAT GAA AAT CTC TAT GAG
 G L N L D D C S M Y E D I S R G L
 GGC CTG AAC CTT GAT GAC TGT TCT AAG TGT GAG GAC ATC TCC AAG GAA CTC
 Q G T Y Q D V G N L H I G D A Q L
 CAG GGC ACC TAC CAG GAT CTG GGC AAC CTC CAC ATT GGA GAT GCC CAG CTG
 E K P * EcoRI
 GAA AAG CCA TCA GAATTC

Figure 4

p3.13eoIg_L Length: 705
 Translation
 HindIII Signal M A T L V L S S M P C H W
 AAGCTT GCCACC ATG GTC ACA CIG GIG CIG TCT TCC AIG CCC TCC CAC TGG
 L L P L L L L P S G E P V P A M T
 CIG TTG TTC CIG CIG CIG CTC TTC TCA GGT GAG CCG GHA CCA GCA AIG ACA
 S S D L P L N F Q G S P C S Q I W
 AEC AGT GAC CIG CCA CIG AAT TTC CAA GGA AGC CCT TGT TCC CAG AUC TGG
 Q H P R F A A K K R S S M V K F H
 CAG CAC CCG AGG TTT GCA GCC AAA AAG CCG ACC TCC ATG GIG AAG TTT CAC
 C Y T N H S G A L T W F R K R G S
 TGC TAT ACA AAC CAC TCA GAT GCA CIG ACC TGG TTC GCA AAG CCA GCG ACC
 Q Q P Q E L V S E E G R I V Q T Q
 CAG CAG CCC CAG GAA CIG GIC TCA GAA GAG CCA CCC AAT GIG CAG AUC CAG
 N G S V Y T L T I Q N I Q Y E D N
 AAT GGC TCT GIC TAC ACC CTC ACT AIC CAA AAC AIC CAG TAC GAG GAT AAT
 G I Y F C K Q K C D S A N H N V T
 GAT AIC TAC TTC TCC AAG CAG AAA TGT GAC ACC GCC AAC CMT AAT GIC ACC
 D S C G T E L L V L G F S T L D Q
 GAC AGC TGT GGC ACC CAA CTT CTA GIC TTA GGA TTC ACC AGC TIG GAC CAA
 L K R R N T L K D G I I L I Q T L
 CIG AAG CCG CCG AAC ACA CIG AAA GAT GGC AAT AIC TIG AUC CAG ACC CTC
 L I I L F I I V F I F L L L D K D
 CTC AIC AIC CTC TTC AIC AAT GIG CCC AIC TTC CIG CTA CTT GAC AAG GAT
 D G K A G M E E D H T Y E G L N I
 GAC GGC AAG GCT GGG AIG GAG GAA GAT CAC ACC TAT GAG GGC TIG AAC AAT
 D Q T A T Y E D I V T L R T G E V
 GAC CAG ACA GCT ACC TAT GAA GAC AIA GIG ACF CTT CCG ACA GGG GAG GHA
 K W S V G E H P G Q E * XhoI
 AAG TGG TCG GCA GCA GAG CMT CCA GGC CAG GAA TCA CTCGAG

Figure 5

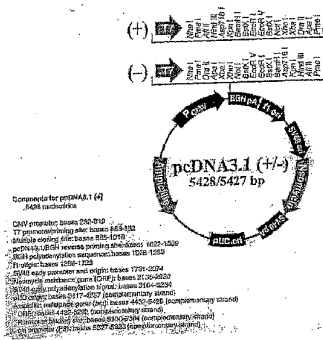


Figure 6

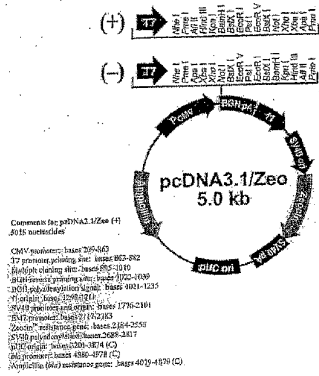


Figure 7.

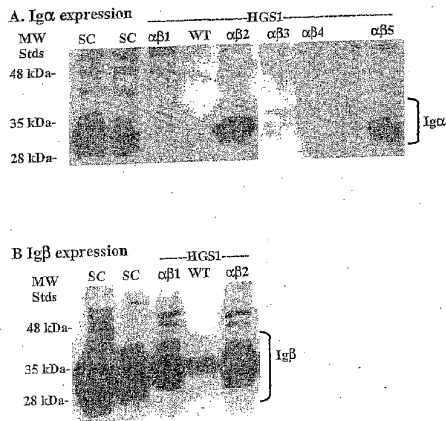


Figure 8

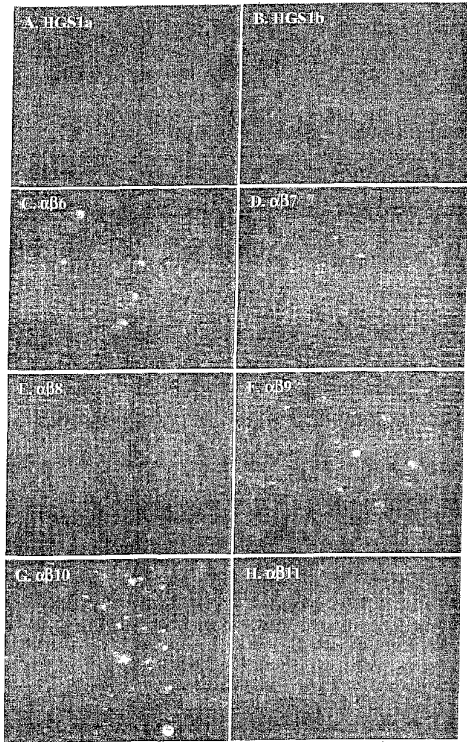


Figure 8 (continued)

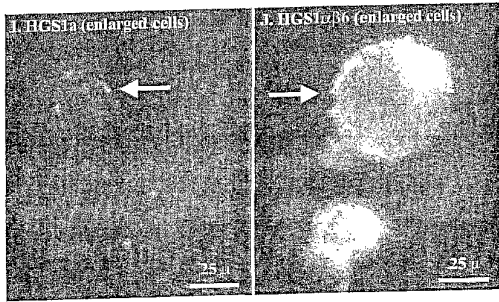
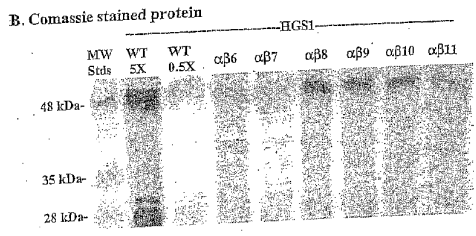
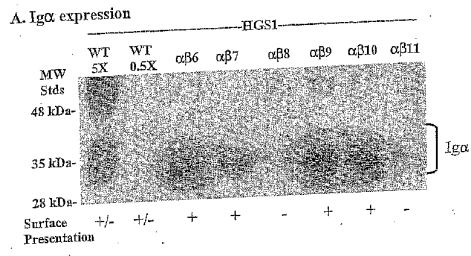


Figure 9



WO 02/066618

10/13

PCT/US02/04936

Figure 10

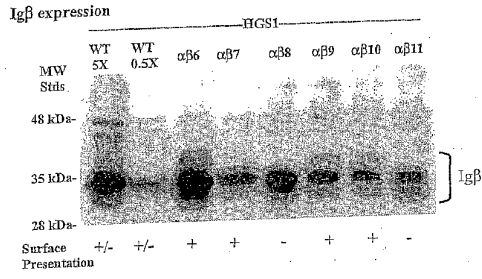


Figure 11

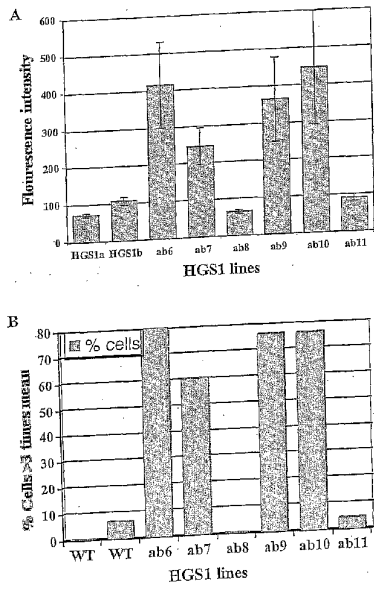


Figure 12

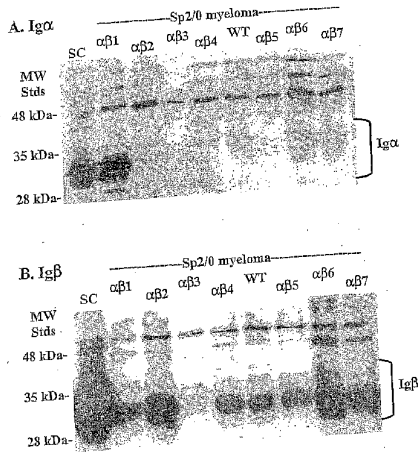
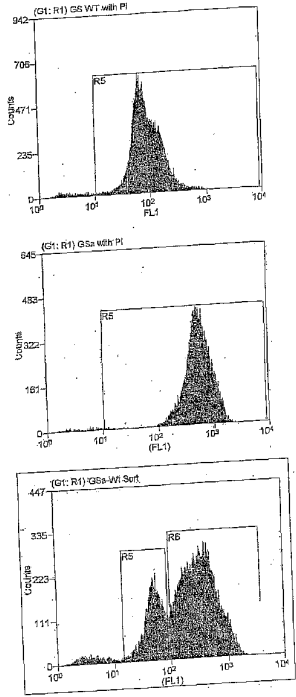


Figure 13



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/04936												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER														
IPC(7) : C12N 5/00, 5/06, 5/10, 5/12, 15/00, 15/02, 15/13, 15/63, 15/85; G01N 33/00, 33/53 US CL : 435/7.1, 69.1, 70.2, 325, 326, 346, 440, 455; 800/4, 6, 13, 21 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) U.S. : 435/7.1, 69.1, 70.2, 325, 326, 346, 440, 455; 800/4, 6, 13, 21														
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	US 5,264,341 A (MACIAK et al.) 23 November 1993 (23.11.1993), see entire document.	1-147												
Y	PARKS et al. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. April 1979, Vol. 76, No. 4, pages 1962-1966, see entire document.	1-147												
Y	REICHLIN et al. B Cell Development Is Arrested at the Immature B Cell Stage in Mice Carrying a Mutation in the Cytoplasmic Domain of Immunoglobulin b. J. Exp. Med. 01 January 2001, Vol. 195, No. 1, pages 13-23, see entire document.	1-147												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>*T* later documents 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</td> </tr> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*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)</td> <td>*Z* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	*T* later documents 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	*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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	*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*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)	*Z* document member of the same patent family	*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	
* Special categories of cited documents:	*T* later documents 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													
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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													
E earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
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)	*Z* document member of the same patent family													
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														
Date of the actual completion of the international search 08 June 2002 (08.06.2002)	Date of mailing of the international search report 15 JUL 2002													
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris for</i> Jessica H. Roark Telephone No. (703) 308-0196													

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/04936

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, MEDLINE, CAPLUS, EMBASE

search terms: hybridoma, surface and antibody or immunoglobulin, Igs, Igh, CD795, Inventor's names

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 21/78	C 4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/04	G 0 1 N 33/48	M 4 H 0 4 5
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 33/483	C
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 33/536	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00	C
G 0 1 N 33/536	C 1 2 N 5/00	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72) 発明者 ミーガー, リチャード ビー.

アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 6 0 5, アセン, サンドストーン ドライブ 6 3 5

(72) 発明者 ラテルザ, ビンス

アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 0 3 3, デカター, ウエップスター ドライブ 6 1 0

F ターム(参考) 2G045 AA24 CB01 CB17 FA16 FB03 FB07 FB12 GC15

2G054 AA08 AB04 CE02 EA03 GA04

4B024 AA01 AA11 AA20 BA41 BA80 CA04 CA20 DA02 EA04 FA01

GA03 GA11 GA12 GA13 HA20

4B063 QA18 QQ08 QR48 QR56 QR72 QR77 QR80 QS33 QX02

4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13

4B065 AA91X AA91Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA04 BA05 BA08 BA25

CA24 CA25 CA43 CA44 CA46

4H045 AA11 AA40 DA76 FA72

专利名称(译)	快速生产单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2004525627A	公开(公告)日	2004-08-26
申请号	JP2002566325	申请日	2002-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	安倍晋三Homet公司		
申请(专利权)人(译)	格鲁吉亚研究的基础上，公司的大学 Abeome公司		
[标]发明人	ミーガーリチャードビー ラテルザピンス		
发明人	ミーガー，リチャードビー. ラテルザ，ピンス		
IPC分类号	A01K67/027 C07K16/00 C07K16/40 C12N5/10 C12N5/16 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/13 C12P21/08 C12Q1/04 G01N21/78 G01N33/48 G01N33/483 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	C12N5/163 C07K16/40 C12N2510/02 C12N2517/02 G01N33/5052 G01N2800/52		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C07K16/00 C12P21/08 C12Q1/04 G01N21/78.C G01N33/48.M G01N33/483.C G01N33/53.Y G01N33/536.D C12N15/00.C C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA12 4B024/GA13 4B024/HA20 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA04 4B065/BA05 4B065/BA08 4B065/BA25 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA40 4H045/DA76 4H045/FA72		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/270322 2001-02-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及遗传改变的杂交瘤，骨髓瘤和B细胞。本发明还涉及在制备单克隆抗体的方法中利用遗传改变的杂交瘤，骨髓瘤和B细胞。本发明还提供了可用于制备目标单克隆抗体的杂交瘤和B细胞群。

		(43) 公表日 平成16年8月26日 (2004. 8. 26)	
(61) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード (参考)	
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A01K 67/027	A01K 67/027		2G054
C07K 16/00	C07K 16/00		4B024
C12N 5/10	C12P 21/08		4B063
C12N 15/02	C12Q 1/04		4B064
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 175 頁) 最終頁に*		
(21) 出願番号	特願2002-566325 (P2002-566325)	(71) 出願人	500182460
(86) (22) 出願日	平成14年2月20日 (2002. 2. 20)		ユニバーシティ・オブ・ジョージア・リ
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月19日 (2003. 8. 19)		ーチ・ファウンデーション・インコーポ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/004936		イテッド
(87) 国際公開番号	W02002/066618		アメリカ合衆国30602-7411ジ
(87) 国際公開日	平成14年8月29日 (2002. 8. 29)		ージア州アセンズ、ボイド・グラデュエ
(81) 優先権主張番号	60/270, 322		ト・スタディーズ・リサーチ・センター
(32) 優先日	平成13年2月20日 (2001. 2. 20)	(71) 出願人	503299608
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アベオメ コーポレイション
			アメリカ合衆国 ジョージア 3003
			, デカター, ウェブスター ドラ
			ップ 610
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀敏