

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01820904.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年3月21日

[11] 授权公告号 CN 1306272C

[22] 申请日 2001.11.14 [21] 申请号 01820904.1

[30] 优先权

[32] 2000.11.17 [33] US [31] 60/249,268

[32] 2001.1.18 [33] US [31] 60/262,067

[32] 2001.2.27 [33] US [31] 60/271,424

[32] 2001.6.15 [33] US [31] 60/298,087

[86] 国际申请 PCT/US2001/043076 2001.11.14

[87] 国际公布 WO2002/102855 英 2002.12.27

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.19

[73] 专利权人 罗切斯特大学

地址 美国纽约州

[72] 发明人 M·佐德尔 E·S·史密斯

[56] 参考文献

CN1301772A 2001.7.4

WO99/30151A1 1999.6.17

US5830721 2001.7.4

US5830721 1998.11.3

CN1087997A 1994.6.15

WO9930151A1 1999.6.17

审查员 边昕

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 13 页 说明书 186 页 附图 18 页

[54] 发明名称

筛选编码抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的方法

[57] 摘要

本发明涉及在真核细胞内表达免疫球蛋白分子的高效方法。本发明进一步涉及特别是利用三分子重组法制备免疫球蛋白重链和轻链文库以便在真核细胞内表达的方法。本发明还提供了选择和筛选抗原特异性免疫球蛋白分子及其抗原特异性片段的方法。本发明还提供了制备、筛选和选择抗原特异性免疫球蛋白分子的试剂盒。最后，本发明提供了通过文中提供的方法制备的免疫球蛋白分子及其抗原特异性片段。

1. 一种选择编码抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的多核苷酸的方法，包括：

(a) 将经过可操纵地连接了转录调控区、编码多种第一免疫球蛋白亚基多肽的第一多核苷酸文库导入到能表达所述免疫球蛋白分子的真核宿主细胞群；其中每个第一免疫球蛋白亚基多肽包含：

(i) 选自重链恒定区和轻链恒定区的第一免疫球蛋白恒定区，

(ii) 与所述第一恒定区对应的免疫球蛋白可变区，以及

(iii) 能够指导所述第一免疫球蛋白亚基多肽的细胞表面表达或分泌的信号肽；

(b) 向所述宿主细胞内导入可操纵地连接了转录调控区的编码多种第二免疫球蛋白亚基多肽的第二多核苷酸文库；其中每个第二免疫球蛋白亚基多肽包含：

(i) 选自重链恒定区和轻链恒定区的第二免疫球蛋白恒定区，其中该第二免疫球蛋白恒定区与第一免疫球蛋白恒定区不同，

(ii) 与所述第二恒定区对应的免疫球蛋白可变区，以及

(iii) 能够指导所述第二免疫球蛋白亚基多肽的细胞表面表达或分泌的信号肽；

其中所述第二免疫球蛋白亚基多肽能与所述第一免疫球蛋白亚基多肽组合形成免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段；

(c) 允许所述宿主细胞表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段；

(d) 将所述免疫球蛋白分子与抗原进行接触；以及

(e) 回收第一多核苷酸文库中编码第一免疫球蛋白亚基多肽的那些多核苷酸，所述第一免疫球蛋白亚基多肽作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分，对所述抗原而言是特异的。

2. 权利要求1的方法，另外包括：

(f) 将所述回收到的多核苷酸导入能表达所述免疫球蛋白分子的宿主细胞群;

(g) 向该宿主细胞导入所述第二多核苷酸文库;

(h) 允许所述宿主细胞表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段;

(i) 将所述宿主细胞与抗原进行接触; 以及

(j) 回收第一多核苷酸文库中编码第一免疫球蛋白亚基多肽的那些多核苷酸, 所述第一免疫球蛋白亚基多肽作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分, 对所述抗原而言是特异的。

3. 权利要求 2 的方法, 另外包括将步骤(f)-(j)重复一或多次, 从而富集所述第一多核苷酸文库中编码第一免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸, 其中该第一免疫球蛋白亚基多肽作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分, 能特异地结合所述抗原。

4. 权利要求 1 的方法, 另外包括分离从所述第一多核苷酸文库中回收到的那些多核苷酸。

5. 权利要求 4 的方法, 另外包括:

(k) 将所述第二多核苷酸文库导入能表达所述免疫球蛋白分子的真核宿主细胞群;

(l) 向该宿主细胞导入分离自第一多核苷酸文库的那些多核苷酸;

(m) 允许所述宿主细胞表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段;

(n) 将该宿主细胞与所述特异抗原进行接触; 以及

(o) 回收所述第二多核苷酸文库中编码第二免疫球蛋白亚基多肽的那些多核苷酸, 所述第二免疫球蛋白亚基多肽作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分, 对所述抗原而言是特异的。

6. 权利要求 5 的方法, 另外包括:

(p) 将所述回收到的多核苷酸导入能够表达所述免疫球蛋白分子的宿主细胞群;

(q) 向该宿主细胞导入分离自第一多核苷酸文库的那些多核苷酸;

(r) 允许宿主细胞表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段;

(s) 将该宿主细胞与所述抗原进行接触, 以及

(t) 回收所述第二多核苷酸文库中编码第二免疫球蛋白亚基多肽的那些多核苷酸, 所述第二免疫球蛋白亚基多肽作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分, 对所述抗原而言是特异的。

7. 权利要求 6 的方法, 另外包括将步骤 (p)-(t) 重复一或多次, 从而富集所述第二多核苷酸文库中编码第二免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸, 其中该第二免疫球蛋白亚基多肽作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分, 能特异地结合所述抗原。

8. 权利要求 7 的方法, 另外包括分离从所述第二多核苷酸文库中回收到的那些多核苷酸。

9. 制备编码抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的第一多核苷酸和第二多核苷酸的方法, 其中包括将按照权利要求 8 的方法分离的编码第一免疫球蛋白亚基多肽或其抗原特异性片段的第一多核苷酸和编码第二免疫球蛋白亚基多肽或其抗原特异性片段的第二多核苷酸相组合。

10. 制备表达抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的宿主细胞的方法, 其中包括将按照权利要求 9 的方法生产的编码第一免疫球蛋白亚基多肽或其抗原特异性片段的第一多核苷酸和编码第二免疫球蛋白亚基多肽或其抗原特异性片段的第二多核苷酸导入能够表达所述多核苷酸的真核宿主细胞中。

11. 按照权利要求 10 的方法制备的宿主细胞。

12. 制备抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的方法, 其中包括:

在所述编码第一免疫球蛋白亚基多肽或其抗原特异性片段的第一多核苷酸和编码第二免疫球蛋白亚基多肽或其抗原特异性片段的第二多核苷酸能发生表达的条件下培养权利要求 11 的宿主细胞; 和

回收所述抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述免疫球蛋白分子是人免疫球蛋白分子。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述第一免疫球蛋白亚基多肽是免疫球蛋白重链，或其抗原特异性片段。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述免疫球蛋白重链是分泌形式的免疫球蛋白重链。

16. 权利要求 14 的方法，其中所述免疫球蛋白重链或其抗原特异性片段是膜结合形式的免疫球蛋白重链。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述免疫球蛋白重链或其抗原特异性片段包含天然的免疫球蛋白跨膜结构域。

18. 权利要求 16 的方法，其中所述免疫球蛋白重链或其抗原特异性片段作为融合蛋白的一部分而附着在所述宿主细胞上。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述融合蛋白包含异源跨膜结构域。

20. 权利要求 18 的方法，其中所述融合蛋白包含 fas 死亡结构域。

21. 权利要求 14 的方法，其中所述免疫球蛋白重链或其抗原特异性片段选自 IgM 重链，IgD 重链，IgG 重链，IgA 重链，IgE 重链，以及任何所述重链的抗原特异性片段。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述免疫球蛋白重链或其抗原特异性片段包含 IgM 重链或其抗原特异性片段。

23. 权利要求 14 的方法，其中所述免疫球蛋白重链恒定区序列包含能支持改变了的免疫效应子功能的修饰。

24. 权利要求 1 的方法，其中所述第二免疫球蛋白亚基多肽是免疫球蛋白轻链，或其抗原特异性片段。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述免疫球蛋白轻链或其抗原特异性片段可与所述免疫球蛋白重链或其抗原特异性片段联合，从而产生免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段。

26. 权利要求 24 的方法，其中所述免疫球蛋白轻链选自 κ 轻链和 λ 轻链。

27. 权利要求 1 的方法，其中所述第一多核苷酸文库构建在真核病毒载体中。

28. 权利要求 1 的方法，其中所述第二多核苷酸文库构建在真核病毒载体中。

29. 权利要求 5 的方法，其中所述分离自第一多核苷酸文库的多核苷酸是利用真核病毒载体导入的。

30. 权利要求 1 的方法，其中所述第二多核苷酸文库构建在质粒载体中。

31. 权利要求 27 的方法，其中所述宿主细胞用 MOI 在大约 1 到 10 的第一多核苷酸文库进行感染，所述第二多核苷酸文库在允许每个被感染宿主细胞能摄取所述第二多核苷酸文库的多达 20 个多核苷酸的情况下被导入。

32. 权利要求 5 的方法，其中所述分离自第一多核苷酸文库的多核苷酸是在质粒载体中导入所述宿主细胞的。

33. 权利要求 27 的方法，其中所述真核病毒载体是动物病毒载体。

34. 权利要求 28 的方法，其中所述真核病毒载体是动物病毒载体。

35. 权利要求 33 的方法，其中所述动物病毒载体能在哺乳动物细胞内产生感染性病毒颗粒。

36. 权利要求 35 的方法，其中所述动物病毒载体的天然基因组是 DNA。

37. 权利要求 35 的方法，其中所述动物病毒载体的天然基因组是 RNA。

38. 权利要求 36 的方法，其中所述动物病毒载体的天然基因组是线性双链 DNA。

39. 权利要求 28 的方法，其中所述真核病毒载体是动物病毒载

体，并且该真核病毒载体是线性双链 DNA。

40. 权利要求 38 的方法，其中所述动物病毒载体选自腺病毒载体，疱疹病毒载体和痘病毒载体。

41. 权利要求 40 的方法，其中所述动物病毒载体是痘病毒载体。

42. 权利要求 41 的方法，其中所述痘病毒载体选自正痘病毒载体，禽痘病毒载体，山羊痘病毒载体，野兔痘病毒载体，昆虫痘病毒载体和猪痘病毒载体。

43. 权利要求 42 的方法，其中所述正痘病毒载体是浣熊痘病毒载体。

44. 权利要求 42 的方法，其中所述宿主细胞允许产生所述病毒的感染性病毒颗粒。

45. 权利要求 40 的方法，其中所述第一多核苷酸文库的转录调控区能在被痘病毒感染的细胞的胞质中发挥作用。

46. 权利要求 30 的方法，其中所述质粒载体通过可操纵地连接转录调控区而指导所述第二免疫球蛋白亚基在被痘病毒感染的细胞的胞质中合成。

47. 权利要求 45 的方法，其中所述转录调控区包含启动子。

48. 权利要求 47 的方法，其中所述启动子是组成型的。

49. 权利要求 48 的方法，其中所述启动子是痘苗病毒 p7.5 启动子。

50. 权利要求 48 的方法，其中所述启动子是合成的早/晚期启动子。

51. 权利要求 47 的方法，其中所述启动子是在表达 T7 RNA 聚合酶的细胞中有活性的 T7 噬菌体启动子。

52. 权利要求 45 的方法，其中所述转录调控区包含转录终止区。

53. 权利要求 38 的方法，其中所述第一多核苷酸文库构建在真核病毒载体中，构建方法包括：

(a) 切割分离的线性 DNA 病毒基因组，从而产生第一病毒片段和第二病毒片段，其中所述第一片段与第二片段没有同源性；

(b) 提供转移质粒群，这些质粒包含与转录调控区可操纵地连接在一起、编码所述免疫球蛋白重链群的所述多核苷酸，侧接有 5' 旁侧区和 3' 旁侧区，其中所述 5' 旁侧区与所述第一病毒片段同源，3' 旁侧区与第二病毒片段同源；并且其中所述转移质粒能够与所述第一和第二病毒片段同源重组，从而形成活的病毒基因组；

(c) 将所述转移质粒以及第一和第二病毒片段，在该转移质粒与病毒片段能进行体内同源重组的条件下导入宿主细胞，从而产生含有编码免疫球蛋白重链之多核苷酸的被修饰的活病毒基因组；以及

(d) 回收所述被修饰的病毒基因组。

54. 权利要求 39 的方法，其中所述第二多核苷酸文库构建在真核病毒载体中，构建方法包括：

(a) 切割分离的线性 DNA 病毒基因组从而产生第一病毒片段和第二病毒片段，其中所述第一片段与第二片段没有同源性；

(b) 提供转移质粒群，这些质粒包含与转录调控区可操纵地连接在一起、编码所述免疫球蛋白轻链群的多核苷酸，侧接有 5' 旁侧区和 3' 旁侧区，其中所述 5' 旁侧区与所述第一病毒片段同源，3' 旁侧区与第二病毒片段同源；并且其中所述转移质粒能够与所述第一和第二病毒片段同源重组，从而形成活的病毒基因组；

(c) 将所述转移质粒以及第一和第二病毒片段，在该转移质粒与病毒片段能进行体内同源重组的条件下导入宿主细胞，从而产生含有编码免疫球蛋白轻链之多核苷酸的被修饰的活病毒基因组；以及

(d) 回收所述被修饰的病毒基因组。

55. 权利要求 1 的方法，其中所述编码抗原特异性免疫球蛋白分子的多核苷酸通过检测以下效果得以鉴定：

(a) 抗原诱导的细胞死亡；

(b) 抗原诱导的信号传递；或者

(c) 抗原特异性结合。

56. 权利要求 5 的方法，其中所述编码抗原特异性免疫球蛋白分子的多核苷酸通过检测以下效果得以鉴定：

- (a) 抗原诱导的细胞死亡；
- (b) 抗原诱导的信号传递；或者
- (c) 抗原特异性结合。

57. 权利要求 55 的方法，其中所述效果是抗原诱导的细胞死亡。

58. 权利要求 56 的方法，其中所述效果是抗原诱导的细胞死亡。

59. 权利要求 57 的方法，其中所述宿主细胞在其表面表达免疫球蛋白分子，这些表达能与所述抗原结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞通过经历细胞凋亡而直接对抗原诱导的所述免疫球蛋白分子交联产生应答。

60. 权利要求 58 的方法，其中所述宿主细胞在其表面表达免疫球蛋白分子，这些表达能与所述抗原结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞通过经历细胞凋亡而直接对抗原诱导的所述免疫球蛋白分子交联产生应答。

61. 权利要求 55 的方法，其中所述效果是抗原诱导的信号传递。

62. 权利要求 56 的方法，其中所述效果是抗原诱导的信号传递。

63. 权利要求 61 的方法，其中所述宿主细胞在其表面表达免疫球蛋白分子，这些表达能与所述抗原结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞通过表达可检测的报道分子而对抗原诱导的免疫球蛋白分子交联产生应答。

64. 权利要求 62 的方法，其中所述宿主细胞在其表面表达免疫球蛋白分子，这些表达能与所述抗原结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞通过表达可检测的报道分子而对抗原诱导的免疫球蛋白分子交联产生应答。

65. 权利要求 63 的方法，其中所述报道分子选自萤光素酶，绿色荧光蛋白和 β -半乳糖苷酶。

66. 权利要求 64 的方法，其中所述报道分子选自萤光素酶，绿色荧光蛋白和 β -半乳糖苷酶。

67. 权利要求 55 的方法，其中所述效果是抗原特异性结合。

68. 权利要求 67 的方法，包括：

(a) 在所述宿主细胞所表达的抗原特异性免疫球蛋白分子能与所述抗原结合的条件下，将宿主细胞池与抗原进行接触；和

(b) 从那些表达与所述抗原发生结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞池或者先前留出的多核苷酸复制池中回收第一多核苷酸文库的多核苷酸。

69. 权利要求 68 的方法，另外包括：

(c) 将所述回收到的多核苷酸分成多个亚池，将这些亚池导入能表达所述免疫球蛋白分子的宿主细胞群；

(d) 允许所述宿主细胞表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段；

(e) 在所述宿主细胞所表达的抗原特异性免疫球蛋白分子能与所述抗原结合的条件下，将所述池与抗原进行接触；以及

(f) 从那些表达与所述抗原发生结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞池或者先前留出的多核苷酸复制池中回收第一多核苷酸文库的多核苷酸。

70. 权利要求 69 的方法，另外包括将步骤(c)-(f)重复一或多次，从而富集所述第一多核苷酸文库中编码第一免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸，其中该第一免疫球蛋白亚基多肽作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分，能特异地结合所述抗原。

71. 权利要求 67 的方法，其中所述抗原附着在基质上，该基质选自合成颗粒，聚合物，磁珠和蛋白质包被的组织培养板。

72. 权利要求 67 的方法，其中所述抗原表达在表达抗原的递呈细胞的表面上，该表达抗原的递呈细胞是通过用可操纵地编码所述抗

原的多核苷酸转染无抗原的递呈细胞来构建的。

73. 权利要求 72 的方法，其中所述表达抗原的递呈细胞构建在选自下组的无抗原递呈细胞中：L 细胞，Cos7 细胞，293 细胞，HeLa 细胞和 NIH 3T3 细胞。

74. 权利要求 68 的方法，其中所述抗原缀合了荧光标签，通过荧光激活细胞分选来鉴定表达可与抗原结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞池。

75. 权利要求 56 的方法，其中所述效果是抗原特异性结合。

76. 权利要求 75 的方法，包括：

(a) 在所述宿主细胞所表达的抗原特异性免疫球蛋白分子能与所述抗原结合的条件下，将宿主细胞池与抗原进行接触；和

(b) 从那些表达与所述抗原发生结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞池或者先前留出的多核苷酸复制池中回收第二多核苷酸文库的多核苷酸。

77. 权利要求 76 的方法，另外包括：

(c) 将所述回收到的多核苷酸分成多个亚池，将这些亚池导入能表达所述免疫球蛋白分子的宿主细胞群；

(d) 允许所述宿主细胞表达免疫球蛋白分子，或其抗原特异性片段；

(e) 在所述宿主细胞所表达的抗原特异性免疫球蛋白分子能与所述抗原结合的条件下，将所述池与抗原进行接触；以及

(f) 从那些表达与所述抗原发生结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞池或者先前留出的多核苷酸复制池中回收第二多核苷酸文库的多核苷酸。

78. 权利要求 77 的方法，另外包括将步骤 (c)-(f) 重复一或多次，从而富集所述第一多核苷酸文库中编码第一免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸，其中该第一免疫球蛋白亚基多肽作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分，能特异地结合所述抗原。

79. 权利要求 75 的方法，其中所述抗原附着在基质上，该基质

选自合成颗粒，聚合物，磁珠和蛋白质包被的组织培养板。

80. 权利要求 75 的方法，其中所述抗原表达在表达抗原的递呈细胞的表面上，该表达抗原的递呈细胞是通过用可操纵地编码所述抗原的多核苷酸转染无抗原的递呈细胞来构建的。

81. 权利要求 80 的方法，其中所述表达抗原的递呈细胞构建在选自下组的无抗原的递呈细胞中：L 细胞，Cos7 细胞，293 细胞，HeLa 细胞和 NIH 3T3 细胞。

82. 权利要求 76 的方法，其中所述抗原缀合了荧光标签，通过荧光激活细胞分选来鉴定表达可与抗原结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞池。

83. 在真核病毒载体中制备编码免疫球蛋白亚基多肽群的多核苷酸文库的方法，该方法包括：

(a) 切割分离的线性 DNA 病毒基因组，从而产生第一病毒片段和第二病毒片段，其中所述第一片段与第二片段没有同源性；

(b) 提供转移质粒群，这些质粒包含与转录调控区可操纵地连接在一起、编码免疫球蛋白亚基多肽群的多核苷酸群，侧接有 5' 旁侧区和 3' 旁侧区，其中所述 5' 旁侧区与所述第一病毒片段同源，3' 旁侧区与第二病毒片段同源；并且其中所述转移质粒能够与所述第一和第二病毒片段同源重组，从而形成活的病毒基因组；

(c) 将所述转移质粒以及第一和第二病毒片段，在该转移质粒与病毒片段能进行体内同源重组的条件下导入宿主细胞，从而产生各含有编码免疫球蛋白亚基多肽之多核苷酸的被修饰的活病毒基因组群；以及

(d) 回收所述被修饰的病毒基因组群。

84. 权利要求 83 的方法，其中每个免疫球蛋白亚基多肽包含：

(a) 选自由重链恒定区和轻链恒定区组成之组的第一免疫球蛋白恒定区；

(b) 对应于所述第一恒定区的免疫球蛋白可变区；和

(c) 能够指导所述第一免疫球蛋白亚基多肽的细胞表面表达或

分泌的信号肽。

85. 一种用于选择在真核宿主细胞内表达的抗原特异性重组免疫球蛋白的试剂盒，其中包含：

(a) 可操纵地连接转录调控区、编码第一免疫球蛋白亚基多肽群的第一多核苷酸文库，其中每个第一免疫球蛋白亚基多肽包含：

(i) 选自由重链恒定区和轻链恒定区组成之组的第一免疫球蛋白恒定区，

(ii) 与所述第一恒定区对应的免疫球蛋白可变区，以及

(iii) 能够指导所述第一免疫球蛋白亚基多肽的细胞表面表达或分泌的信号肽，

其中所述第一多核苷酸文库构建在真核病毒载体中；

(b) 可操纵地连接转录调控区、编码第二免疫球蛋白亚基多肽群的第二多核苷酸文库，其中每个第二免疫球蛋白亚基多肽包含：

(i) 选自由重链恒定区和轻链恒定区组成之组的第二免疫球蛋白恒定区，其中该第二免疫球蛋白恒定区与第一免疫球蛋白恒定区不同，

(ii) 与所述第二恒定区对应的免疫球蛋白可变区，以及

(iii) 能够指导所述第二免疫球蛋白亚基多肽的细胞表面表达或分泌的信号肽，

其中所述第二免疫球蛋白亚基多肽能够与第一免疫球蛋白亚基多肽组合，从而形成免疫球蛋白分子，或其抗原特异性片段，并且该第二多核苷酸文库构建在真核病毒载体中；和

(c) 能够表达所述免疫球蛋白分子的宿主细胞群；

其中所述第一和第二多核苷酸文库都以感染性病毒颗粒和灭活的病毒颗粒两种形式提供，并且所述灭活的病毒颗粒能感染宿主细胞，使它表达第一和第二免疫球蛋白亚基多肽，但不进行病毒复制；并且

所述宿主细胞表达的抗原特异性免疫球蛋白分子是通过与抗原的相互作用被选择的。

86. 由根据权利要求 1 的方法制得的多核苷酸所编码的抗体或其

抗原特异性片段。

87. 一种包含权利要求 86 所述抗体和药学可接受载体的组合物。

88. 一种选择编码单结构域的抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的多核苷酸的方法，包括：

(a) 将可操纵地连接转录调控区、编码单结构域免疫球蛋白多肽群的多核苷酸文库导入到能表达所述免疫球蛋白分子的真核宿主细胞群内；其中每个免疫球蛋白多肽包含：

(i) 免疫球蛋白重链恒定区，
(ii) 骆驼源化的免疫球蛋白重链可变区，以及
(iii) 能够指导所述免疫球蛋白亚基多肽的细胞表面表达或分泌的信号肽；

(b) 允许所述宿主细胞表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段；

(c) 将所述免疫球蛋白分子与抗原进行接触；以及

(d) 从表达可与所述抗原结合的免疫球蛋白分子的宿主细胞内回收文库多核苷酸。

筛选编码抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的方法

发明背景

发明领域

本发明涉及一种在真核细胞中高效表达免疫球蛋白分子的方法，产生用于在真核细胞内表达的免疫球蛋白重链和轻链文库的方法，分离结合特异抗原的免疫球蛋白的方法，以及这些方法之一所产生的免疫球蛋白。

相关技术

免疫球蛋白制备

具有特定特异性的抗体正被越来越多不同的医疗用途所采用。

针对自身抗原的特定抗体对体内的治疗和诊断目的尤其有价值。利用杂交瘤技术已经分离了许多啮齿类动物单克隆抗体，并且这些抗体被用于人的体内治疗和诊断用途。例如，这些小鼠单克隆抗体的一个早期应用是作为导靶剂来杀死肿瘤或使肿瘤成像（F. H. Deland 和 D. M. Goldenberg 1982 在“放射性核素显影” D. E. Kuhl 编，289-297 页，Pergamon, Paris; R. Levy 和 R. A. Miller ANN. Rev. Med. 1983, 34: 107-116）。但是，体内使用这类抗体会引起问题。外源免疫球蛋白能引发干扰治疗的抗免疫球蛋白应答（R. A. Miller 等, 1983 Blood 62: 988-995）或者引起过敏或免疫复合体超敏感（B. Ratner, 1943, Allergy, Anaphylaxis and Immunotherapy, Williams and Wilkins, Baltimore）。相应的，开发那些自身在宿主内不是免疫原性的抗体对于这类应用尤其重要，例如开发针对在人体内本身不具有免疫原性的人抗原的抗体。

分离对自身抗原具有特异性的抗体片段是一项困难的任務。动物通常不产生针对自身抗原的抗体，这种现象称为耐受性。一般来说，

用自身抗原进行免疫接种不会导致循环抗体的产生。因此很难培育针对自身抗原的抗体。

以前，有三种策略被用于产生能特异性识别自身抗原的免疫球蛋白分子。一个方案中，通过将包含选定啮齿类动物单克隆抗体的抗原结合位点的特化互补性决定区（CDR）移植到人抗体构架区，从而将啮齿类动物的抗体序列转化为人抗体序列（Winter 等，英国专利 No. GB21886 38B(1987)；Reichmann L. 等，Nature(London)332: 323 - 327(1988)；Foote J. 和 Winter G; J. Mol. Biol. 224:487-499(1992)）。在这个已被命名为抗体人源化的方法中，啮齿类动物免疫球蛋白每个重链和轻链的三个 CDR 环被移植到相应人免疫球蛋白链的四个构架区的同源位置。因为有些构架残基也对抗体亲合力有贡献，因此通常结构必须通过另外的构架取代来进一步修正，以便增强亲合力。这可能是一个费力费钱的过程。

近期，人们制备了表达人免疫球蛋白序列的转基因小鼠(Mendez M. J. 等，Nat. Genet. 15:146-156(1997))。这个策略具有加速对人抗体进行选择潜力，但它与抗体人源化方法有同样的局限性，即抗体选自小鼠中已存在的库，这些库是由小鼠而非人的基因组编码的蛋白质所形成的。这可能影响到针对特定抗原所选择的抗体的表位特异性。例如，用那些在小鼠内存在同系物的人蛋白质来免疫小鼠，可能会导致主要产生那些在人和小鼠中不一样的表位的特异抗体。而这些可能并不是最佳的靶表位。

一个不受同样限制的替代方法是筛选展示在噬菌体上的重组人抗体片段 (Vaughan T. J., Nat. Biotechnol. 14: 309 - 314(1996); Barbas C. F., III, Nat. Med. 1:837-839(1995); Kay B. K. 等, “肽和蛋白质的噬菌体展示”, Academic press(1996))。在噬菌体展示法中，功能性的免疫球蛋白结构域被展示在噬菌体颗粒的表面，这些颗粒携带了编码它们的多核苷酸序列。在典型的噬菌体展示法中，免疫球蛋白片段，例如 Fab, Fv 或者二硫键稳定的 Fv 免疫球蛋白结构域以融合蛋白形式被展示，即融合到噬菌体表面蛋白上。可以用于制备抗

体的噬菌体展示法的例子包括 Brinkman U. 等 (1995) (*J. Immunol. Methods*182:41-50;) ; Ames, R. S. 等 (1995) (*J. Immunol. Methods*184: 177-186) ; Kettleborough, C. A. 等 (1994) (*Eur. J. Immunol.* 24:952-958) ; Persic, L. 等 (1997) (*Gene*187:9-18) ; Burton, D. R. 等 (1994) (*Advances in Immunology*57:191-280) ; PCT/GB91/01134; W095/15982; W095/20401; 以及美国专利 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727 和 5733743 (这些文献均全文引作参考) 中公开的。

由于噬菌体展示法通常的结果只是免疫球蛋白分子的抗原结合片段的表达, 在选择噬菌体后, 必须从噬菌体中分离免疫球蛋白编码区域, 进行重新克隆以便制备整个抗体 (包括人抗体) 或者任何其他目的抗原结合片段, 并在任何目的宿主 (动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母、细菌) 中表达。例如, 也可使用现有技术中已知的方法, 例如下述文献中公开的方法, 应用重组生产 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段的技术: W092/22324 ; Mullinax R. L. 等 (*BioTechniques*12(6):864-869(1992); 和 Sawai, H. 等 *AJRI*34: 26-34 (1995); 以及 Better, M. 等, *Science*240:1041-1043(1988)) 中有公开 (这些文献均全文引作参考)。

在噬菌体中构建的免疫球蛋白文库可以来源于天然的抗体产生细胞或者特异性免疫的个体, 并且在理论上可以包括人免疫球蛋白重链和轻链的新的和不同的组合。虽然这个策略不受内在抗体库的限制, 但它需要被表达的免疫球蛋白片段的互补决定区 (CDR) 能在细菌中合成并正确折叠。但是许多抗原结合区以融合蛋白存在时很难在细菌细胞内正确地装配。此外, 蛋白质不会进行正常的真核细胞翻译后修饰。因此, 这个方法给能获得的抗体特异性施加了不同的选择方式。

因此需要这样一种或者方法, 它能从不存在偏向性的免疫球蛋白库中鉴定到免疫球蛋白分子及其抗原特异片段, 这些分子或片段能在真核细胞中合成, 适当地糖基化并正确地装配。

真核表达文库。分子生物学领域的一个基本工具是将 poly(A)⁺mRNA 转化为双链 (ds) cDNA, 然后后者可以被插入克隆载体并在合适的宿主细胞内表达。许多 cDNA 克隆策略中常用的一个方法包括构建 cDNA 文库, 这是从来自目标生物细胞的 poly(A)⁺mRNA 衍生的 cDNA 克隆的池。例如, 为了分离表达免疫球蛋白基因的 cDNA, 可以由前 B 细胞、B 细胞或者浆细胞来制备 cDNA 文库。在不同表达载体 (包括丝状噬菌体, 噬菌体 λ, 粘粒和质粒载体) 中构建 cDNA 文库的方法是已知的。在例如 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, publisher, Cold Spring Harbor, N. Y. (1990) 中描述了一些常用的方法。

许多从 cDNA 文库中分离靶基因的不同方法已被运用, 取得了不同程度的成功。这些方法包括, 例如使用核酸杂交探针, 即具有与靶基因 DNA 序列互补之序列的标记过的核酸片段。对被转化的细菌宿主中的 cDNA 克隆运用这个方法时, 那些与所述探针强烈杂交的集落或噬菌斑可能就含有靶 DNA 序列。但是杂交法不要求也不检测某个特定 cDNA 克隆是否被表达。或者筛选方法依赖在细菌宿主中的表达, 例如可以通过免疫检测法来筛选集落或噬菌斑, 这些免疫检测法检测它们与针对目标蛋白质的抗体的结合力。但是测定细菌细胞中表达的检测法经常受到阻碍, 因为蛋白质可能不能在细菌宿主内高效地表达, 也可能表达成错误的构型, 或者它可能不能象在真核系统中一样地加工和/或转运。在细菌宿主中生产免疫球蛋白分子所作的尝试中已经碰到许多上面提及的这些问题。

因此, 利用哺乳动物表达文库来分离编码免疫球蛋白分子的 cDNA 相对细菌文库有一些优点。例如, 在真核宿主中表达的免疫球蛋白分子及其亚基应当是有功能的并能进行正常的翻译后修饰。通常情况下通过细胞内膜系统转运到细胞表面的蛋白质应当会经历完整的转运过程。此外, 使用真核系统就使得有可能根据真核 RNA 或蛋白质的功能性表达来分离多核苷酸。例如, 可以根据它们对特定抗原的特异性来

分离免疫球蛋白分子。

除了某些最近通过在 COS 细胞内进行表达而分离到的淋巴因子 cDNA (Wong, G. G., 等, Science228:810-815(1985); Lee, F. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA83:2061-2065(1986); Yokota, T., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA83:5894-5898 (1986); Yang, Y. 等, Cell147:3-10(1986)), 从哺乳动物表达文库中只分离到少数 cDNA。这主要有两个原因: 首先, 现有构建大的质粒文库的技术很难掌握, 并且文库大小难以接近噬菌体克隆技术所能达到的大小 (Huynh, T. 等, DNA Cloning, Vol I, A Practical Approach, Glover, D. M. (编), IRL Press, Oxford(1985), pp49-78)。其次, 已有载体很难适宜于高水平表达, 只有一个例外 (Wong, G. G., 等, Science228:810-815(1985))。因此, 以前在哺乳动物宿主中进行表达最常作为一种手段来证实那些通过常规克隆方法分离到的基因所编码的蛋白质的身份。

痘病毒载体。痘病毒载体被广泛地用作在真核细胞内进行蛋白质和抗原表达的表达载体。在各种宿主细胞中克隆和繁殖牛痘的简便易行使得痘病毒载体被广泛地用于表达外源蛋白质和作为疫苗递送载体 (Moss, B., Science252:1662-7(1991))。

大的 DNA 病毒是在研究细胞过程中特别有用的表达载体, 因为它们能将许多不同蛋白质以其天然形式在多种细胞系中表达。此外, 在重组痘病毒中表达的基因产物显示出能被有效地加工, 与 I 类 MHC 一起呈递来激活细胞毒性 T 细胞。目标基因通常被克隆在质粒中处于启动子的调控下, 其中所述启动子旁侧是与病毒非必要区域同源的序列, 然后将该盒通过同源重组导入基因组。已经设计出整套用于表达, 选择和检测的载体来实现各种克隆和表达策略。但是, 同源重组在需要产生复杂文库或者插入的 DNA 很大的情况下不是一个有效的制备重组病毒的手段。构建重组基因组的一个替代策略已被应用于痘病毒 (Merchinsky 等, 1992, Virology 190:522-526; Pfeleiderer 等, 1995, J. General Virology 76:2957-2962; Scheifflinger 等,

1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9977-9981), 疱疹病毒 (Rixon 等, 1990, J. General Virology 71:2931-2939) 和杆状病毒 (Ernst 等, 1994, Nucleic Acids Research 22:2855-2856) 的基因组, 该策略依赖于将病毒 DNA “臂” 直接连接到一个插入片段上, 并且随后拯救感染性病毒。

痘病毒是真核细胞研究中通用的载体, 因为它们易于构建并工程化来高水平表达外源蛋白质。该病毒的广泛宿主范围使得人们能在许多细胞类型中可靠地表达蛋白质。定向克隆策略已被设计来扩展痘病毒病毒嵌合体的应用范围, 该策略中通过在体外将 DNA 片段直接连接上牛痘 “臂” 并将该 DNA 混合物转染到感染了辅助病毒的细胞内来构建重组基因组 (Merchlinisky 等, 1992, Virology 190:522-526; Scheifflinger 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9977-9981)。该方法已被用于高水平表达外源蛋白质 (Pfleiderer 等, 1995, J. General Virology 76:2957-2962), 并能高效克隆长达 26kb 的片段 (Merchlinisky 等, 1992, Virology 190:522-526)。

裸露的牛痘病毒 DNA 没有感染性, 因为这样的病毒不能利用细胞转录机制, 而是依赖它自己的蛋白质来合成病毒 RNA。以前, 温度敏感性条件致死 (Merchlinisky 等, 1992, Virology 190:522-526) 或者非同源的禽痘病毒 (Scheifflinger 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9977-9981) 被用作包装的辅助病毒。理想的辅助病毒能有效地协助由输入 DNA 产生感染性病毒, 但不会在宿主细胞中复制或者与痘苗病毒 DNA 产物发生重组。由于这些原因, 禽痘病毒是一个非常有用的辅助病毒。它可以进入哺乳动物细胞并提供输入痘苗病毒 DNA 复制所需的蛋白质。但是它不与痘苗病毒 DNA 重组, 并且在哺乳动物细胞内不产生感染性的禽痘病毒。因此, 可以以较高的感染复数 (MOI) 使用它。

通常, 外源蛋白质编码序列通过与感染性病毒的同源重组被导入痘病毒基因组。在这个常规方法中, 将事先分离好的外源 DNA 克隆到转移质粒中, 位于痘苗病毒启动子之后, 旁侧是与痘病毒中病毒复制

非必要区同源的序列。所述转移载体被导入痘病毒感染的细胞中，以使该转移质粒和痘病毒基因组通过同源重组在体内进行重组。同源重组的结果是外源 DNA 被转移到病毒基因组中。

虽然常规的同源重组可以用于在痘病毒中表达已分离的外源 DNA，但这种方法不能有助于文库的构建，因为回收到的病毒绝大多数没有获得外源 DNA 插入片段。利用传统的同源重组，重组效率在大约 0.1% 或更低。因此，痘病毒载体的用途局限在亚克隆先前分离的 DNA 分子以便进行蛋白质表达和疫苗开发。

已经建立了利用直接连接载体的替代方法，以便在不适合进行同源重组的情况下高效地构建嵌合体基因组 (Merchlinisky 等, 1992, *Virology* 190:522-526; Scheiflinger 等, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:9977-9981)。在这样的方案中，来自基因组的 DNA 被消化，与插入片段在体外连接，并转染到感染了辅助病毒的细胞内 (Merchlinisky 等, 1992, *Virology* 190:522-526; Scheiflinger 等, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:9977-9981)。一个方案中，基因组在单一 NotI 位点被消化，并且含有用于选择或检测嵌合基因组的元件的 DNA 插入片段被连接到基因组臂上 (Scheiflinger 等, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:9977-9981)。用这种直接连接法将外源 DNA 插入到痘病毒基因组中已有描述 (Pfleiderer 等, 1995, *J. General Virology* 76:2957-2962)。

或者，将痘病毒 WR 基因组进行修饰从而产生 vNotI/tk，所述修饰是将 HindIII F 片段中的 NotI 位点去掉，并重新在胸苷激酶基因近端引入一个 NotI 位点，这样在这个位置插入一个序列将破坏胸苷激酶基因，使得可以利用药物选择来分离嵌合基因组 (Merchlinisky 等, 1992, *Virology* 190:522-526)。

直接连接载体 vNotI/tk 使得人们可以有效地克隆和增殖先前分离的至少长 26kb 的 DNA 插入片段 (Merchlinisky 等, 1992, *Virology* 190:522-526)。尽管大 DNA 片段被有效地克隆到基因组中，但该 DNA 插入片段所编码的蛋白质只能以相当于胸苷激酶基因的

低水平被表达，但该基因是痘苗病毒中表达比较弱的一个早期基因。此外，所述 DNA 会以两个方向插入到 NotI 位点，因此可能根本不被表达。另外，尽管采用直接连接的重组效率比在常规同源重组中观察到的效率高，得到的滴度还是比较低。

因此，以前不用痘病毒载体来从复杂的克隆群体中鉴定未知的目标基因，因为没有用于痘病毒的高效、产生高滴度的克隆方法。但是最近，本发明人建立了一种利用三分子重组来制备重组痘病毒的方法。参见公开于 2000 年 5 月 18 日的 W000/028016 (Zauderer)，该文此处全文引作参考文献。

三分子重组是一种用于制备重组痘病毒的新的、高效的并产生高滴度的方法。在痘苗病毒中采用三分子重组法，本发明人已经达到至少 90% 的重组效率，比通过直接连接所获得的滴度高两个数量级。根据三分子重组法，痘病毒基因组被切割而产生两个非同源片段或者“臂”。制备一个转移载体，它携带旁侧是与两个痘病毒臂同源的区域的外源插入物 DNA。将臂和转移载体递送到受体宿主细胞，使得这三个 DNA 分子能在体内进行重组。重组的结果是产生了包含两个痘病毒臂和所述插入 DNA 的痘病毒基因组单分子。

发明概述

对应本发明的一个方面，提供了这样一种方法，该方法能从在真核细胞中表达的多核苷酸文库中鉴定编码抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的多核苷酸。

同时提供的是一种鉴定编码免疫球蛋白分子或其片段的多核苷酸的方法，所述分子或其片段具有发生改变的效应子功能。

还提供了一种利用病毒载体在真核细胞内构建编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸文库的方法，其中所述文库是通过三分子重组法构建的。

另外提供了鉴定在其表面上表达抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的宿主细胞的方法，所述鉴定是通过对抗原诱导的细胞死亡、抗原诱导的信号传递或者抗原特异性结合进行选择 and/或筛

选实现的。

还提供了由真核宿主细胞表达的可溶性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的筛选方法，所述宿主细胞表达编码可溶性的分泌免疫球蛋白分子的多核苷酸文库，筛选是通过抗原结合或者通过检测所述免疫球蛋白分子的抗原或生物体特异性功能进行的。

附图简述

图 1: 通过抗原诱导的细胞凋亡来选择特异性人抗体。

图 2A: 制备响应表面免疫球蛋白的抗原交联而直接或间接经历细胞死亡的宿主细胞。

图 2B: 修饰的 CH33 宿主细胞的证实，该细胞被设计成在表面免疫球蛋白的抗原交联时会发生 CTL-诱导的裂解或细胞死亡。

图 3: pVHE 的构建。

图 4: pVKE 和 pVLE 的构建。

图 5: 通过抗原依赖性附着来选择特异人抗体。

图 6: 三分子重组法的示意图。

图 7: p7.5/tk 和 pEL/tk 启动子的核苷酸序列。该图显示了所述启动子和胸苷激酶基因开始处的核苷酸序列（对于 V7.5/tk 而言，为 SEQ ID NO: 140；对于 VEL/tk 而言，为 SEQ ID NO: 142），以及相应的包括起始密码子和部分开放读码框的氨基酸序列，此处分别命名为 SEQ ID NO: 141 和 SEQ ID NO: 143。

图 8: pVHEs 的构建。

图 9: 痘病毒介导的致细胞病变效应的减弱。

图 10: scFv 表达载体的构建。

图 11: pVHE-X-G1 的构建。

图 12A: p7.5/tk 痘苗转移质粒的核苷酸序列的一个修饰（SEQ ID NO: 1）。一个如文中所述由 p7.5/tk 痘苗转移质粒衍生的新载体 p7.5/ATG0/tk（SEQ ID NO: 2）。

图 12B: 如文中所述由 p7.5/tk 痘苗转移质粒衍生的新载体 p7.5/ATG1/tk（SEQ ID NO: 3）。

图 12C: 如文中所述由 p7.5/tk 痘苗转移质粒衍生的新载体 p7.5/ATG2/tk (SEQ ID NO: 4)。

图 12D: 如文中所述由 p7.5/tk 痘苗转移质粒衍生的新载体 p7.5/ATG3/tk (SEQ ID NO: 5)。

图 13: IgM-Fas 融合产物的构建。

图 14: Ig α 和 Ig β 在被转染的 COS7 和 HeLaS3 细胞系中的表达。总 RNA 分离自 (A)COS7-Ig $\alpha\beta$ -1, (B)COS7-Ig $\alpha\beta$ -2, (C)HeLaS3-Ig $\alpha\beta$ -1, (D)EBV-转化的人 B 细胞, 在有或没有逆转录酶的情况下逆转录为 cDNA, 然后用 ig α 5'/ig α 3'和 ig β 5'/ig β 3'引物组进行 PCR 扩增。然后在 0.8%琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物。应当注意的是人 B 细胞对 Ig α 和 Ig β 均显示出另外的剪接方式。参见例如, Hashimoto, S. 等, Mol. Immunol. 32:651 (1995)。

优选实施方案详述

本发明广泛涉及在真核系统中鉴定和/或产生功能性、抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段(即抗原结合片段)的方法。此外, 本发明涉及从编码抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的多核苷酸复合表达文库中鉴定编码这些免疫球蛋白分子或片段的多核苷酸的方法, 其中所述文库是在真核宿主细胞内构建和表达的。另外的实施方案包括通过任何上述方法制备的分离的抗原特异性免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段, 以及能制备这类分离的免疫球蛋白的试剂盒。

本发明一个特别优选的方面是利用通过三分子重组构建的痘病毒载体在真核宿主细胞中构建复合免疫球蛋白文库。在基于痘病毒的载体中构建复合 cDNA 文库的能力, 以及根据抗原诱导的细胞死亡、抗原诱导的信号传递或者抗原特异结合进行选择 and/或筛选特定重组体的能力, 可以作为在真核细胞中鉴定免疫球蛋白、尤其是具有许多非常明确的特异性的人免疫球蛋白的基础。它能克服在啮齿类动物中对抗体库进行选择时造成的偏向性, 或者在噬菌体或细菌中进行合成和装配的局限性。

应当提到的是术语“一个”或“一种”，指“一或多个（种）”；例如，“一个免疫球蛋白分子”应理解为代表一或多个免疫球蛋白分子。因此，术语“一个（种）”，“一或多个（种）”以及“至少一个（种）”在文中可以互换。

术语“真核生物 (eukaryote)”或“真核生物 (eukaryotic organism)”是指涵盖动物、植物和原生生物界中的所有生物，包括原生动物，真菌，酵母，绿藻，单细胞植物，多细胞植物以及所有动物，包括脊椎和无脊椎动物。这个术语不包括细菌和病毒。“真核细胞”是指包括单个“真核细胞”以及多个“真核细胞”，并且涵盖来自真核生物的细胞。

术语“脊椎动物”是指涵盖单个“脊椎动物”以及多个“脊椎动物”，包括哺乳动物和鸟类，以及鱼类，爬行类和两栖类。

术语“哺乳动物”是指涵盖单个“哺乳动物”以及多个“哺乳动物”，包括但不限于人；灵长类比如猿，猴，猩猩和黑猩猩；犬科比如狗和狼；猫科比如猫，狮子和虎；马科比如马，驴和斑马；食用动物比如牛，猪和羊；有蹄动物比如鹿和长颈鹿；啮齿类比如小鼠，大鼠，仓鼠以及豚鼠；和熊。优选，所述哺乳动物是人。

术语“组织培养”或“细胞培养”或“培养”是指在能保存细胞结构、细胞功能、进一步的分化或者所有三种的条件下，植物或动物组织或细胞的体外维持或生长。“原代组织细胞”是那些直接取自组织的细胞，即在生物体中执行相同功能的同类细胞群。用蛋白水解酶胰蛋白酶处理这类组织细胞，可将它们解离成接种在培养板上时能生长或者维持细胞结构的单个原代组织细胞。在组织培养中由原代细胞增殖得到的细胞培养物称为“次生细胞培养物”。多数次生细胞分裂有限的几次然后死亡。但是少数次生细胞可以通过这个“危险期”，之后它们能无限增殖从而形成延续的“细胞系”。细胞在其中培养的液体培养基在文中称为“培养基”或“培养介质”。在细胞培养过程中目的分子例如免疫球蛋白分子分泌到其中的培养基在文中称为“条件培养基”。

术语“多核苷酸”指存在于核酸或构建体中的任何一或多个核酸区段，或者核酸分子，例如 DNA 或 RNA 片段。“编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸”指包含所述多肽的编码区的多核苷酸。此外，多核苷酸可能编码调控元件，比如启动子或转录终止子，或者可能编码多肽或蛋白质的特殊元件，比如分泌信号肽或者功能性结构域。

用在文中，术语“鉴定”是指这样一种方法，该方法能将目的分子，例如编码具有所需特异性或功能的免疫球蛋白分子的多核苷酸从这类分子的群体或文库中区分出来。鉴定方法包括“选择”和“筛选”。用在文中，“选择”法是那些可以直接从文库中分离出目的分子的方法。例如，文中描述的一个选择方法中，通过一次水解，包含目的多核苷酸的宿主细胞从基质上释放下来，而包含文库中其他多核苷酸的细胞仍附着其上，从而将它们直接分离开。用在文中，“筛选”法是那些其中对包含目的分子的池进行一种可以检测到目的分子的分析的方法。然后将检测到所述分子的一个池通过类似的分析分成逐渐缩小的池，直到获得高度富含目的分子的池。例如，在文中描述的一个筛选法中，通过表达报告分子，对包含编码免疫球蛋白分子的多核苷酸文库的宿主细胞池分析其抗原结合力。

免疫球蛋白。用在文中，“免疫球蛋白分子”定义为完整的双分子免疫球蛋白，即通常包含四个“亚基多肽”，即两个相同的重链和两个相同的轻链。在某些情况中，例如，来源于 camelid 物种或者在 camelid 免疫球蛋白基础上工程化的免疫球蛋白分子，完整的免疫球蛋白分子可能仅由重链构成，没有轻链。参见例如 Hamers-Casterman 等，Nature363:446-448(1993)。因此“免疫球蛋白亚基多肽”是指单个重链多肽或单个轻链多肽。免疫球蛋白分子也可以称为“抗体”，在文中这两个术语可以交换使用。“分离的免疫球蛋白”是指一个免疫球蛋白分子，或者两个或更多免疫球蛋白分子，它们基本上脱离蛋白质和其他物质的环境，并且能结合特异抗原。

决定免疫球蛋白分子的“类”的重链是两亚基多肽中较大的，它包含可变区和恒定区。“重链”是指分泌的全长重链形式，即从细胞

中释放出来的形式，或者膜结合重链形式，即包含跨膜结构域和胞内结构域。跨膜和胞内结构域可以是天然存在的与某一重链有关的结构域，即可见于记忆 B 细胞中的结构域，或者它可能是异源跨膜和胞内结构域，例如来自不同种类的免疫球蛋白或者来自异源多肽，即非免疫球蛋白多肽。明显的是，优选使用细胞膜结合型免疫球蛋白分子来实施本发明的某些方面，而其他方面优选使用分泌型免疫球蛋白分子（即那些缺乏跨膜和胞内结构域的）来实施。免疫球蛋白“种类”是指在宿主中执行不同功能的免疫球蛋白大组。例如人免疫球蛋白可以分为 5 类，即 IgG（含有 γ 重链），IgM（含有 μ 重链），IgA（含有 α 重链），IgE（含有 ϵ 重链）以及 IgD（含有 δ 重链）。某些种类的免疫球蛋白又进一步分为“亚类”。例如，在人体中有四种不同的 IgG 亚类，即分别包括 γ -1、 γ -2、 γ -3 和 γ -4 重链的 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4，以及两个不同的 IgA 亚类，即分别包括 α -1 和 α -2 重链的 IgA-1 和 IgA-2。应当提到的是免疫球蛋白的类和亚类命名在动物物种之间是不同的，而且某些动物物种可能包括另外种类的免疫球蛋白。例如，鸟类还产生包含在蛋黄中的 IgY。

“轻链”是指与重链氨基末端区域连在一起的较小的免疫球蛋白亚基。与重链一样，轻链包括可变区和恒定区。有两种不同的轻链即 κ 和 λ ，一对这样的轻链可以与任何一对重链结合，形成免疫球蛋白分子。

免疫球蛋白亚基多肽每个包括恒定区和可变区。在多数物种中，重链可变区或 V_H 结构域，以及轻链可变区或 V_L 结构域结合在一起形成“互补决定区”或 CDR，它是免疫球蛋白分子中特异性识别抗原表位的部分。但是在骆驼（camelid）物种中，被称为 V_{HH} 的重链可变区构成整个 CDR。骆驼 V_{HH} 可变区和来自常规抗体的可变区（ V_H ）的主要区别包括 (a) V_H 的轻链接触表面比 V_{HH} 中的相应区域有更多疏水氨基酸，(b) V_{HH} 的 CDR3 更长，以及 (c) V_{HH} 中 CDR1 和 CDR3 之间经常存在二硫键。每个完整的免疫球蛋白分子包括两个相同的 CDR。动物在抗体产生细胞分化时，通过一系列种系 DNA 区段的重排，导致形成编

码某个特定可变区的基因，从而能够产生与重链和轻链恒定区相关的可变区的巨大池。重链和轻链可变区的其他变化可通过已分化细胞中的体细胞突变实现。免疫球蛋白分子的结构和体内形成是免疫学领域的普通技术人员所熟知的。关于免疫球蛋白多样性的产生的简明综述可见例如，Harlow 和 Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988) (以下称为“Harlow”)；以及 Roitt 等, *Immunology* Gower Medical Publishing, Ltd., London (1985) (以下称为“Roitt”)。Harlow 和 Roitt 此处全文引作参考。

免疫球蛋白另外还有一些通过与效应分子结合而介导的效应子功能。例如，补体的 C1 组分与免疫球蛋白结合能激活补体系统。补体的激活对细胞病原体的调理作用和裂解很重要。补体的活化还能刺激炎症反应，也有可能参与自身免疫超敏反应。此外，通过 Fc 区域，抗体 Fc 区域上的 Fc 受体位点与细胞上的 Fc 受体 (FcR) 结合，从而使免疫球蛋白结合到细胞上。有许多特异于不同类抗体的 Fc 受体，包括但不限于，IgG (γ 受体)，IgE (η 受体)，IgA (α 受体) 和 IgM (μ 受体)。抗体与细胞表面上的 Fc 受体的结合激发了许多个要和不同的生物应答，包括对包被抗体的颗粒的吞噬和破坏，清除免疫复合物，杀伤细胞对包被抗体的靶细胞的裂解 (称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性，或 ADCC)，炎症介体的释放，免疫球蛋白产生的胎盘转运和调控。

本发明的免疫球蛋白可以来自任何动物来源，包括鸟类，鱼和哺乳动物。优选，所述抗体来源于人，小鼠，狗，猫，兔，山羊，豚鼠，骆驼，骆马 (llama)，马或者鸡。在本发明的一个优选方面，鉴定了与“自身”抗原特异地相互作用的免疫球蛋白，例如特异结合人抗原的人免疫球蛋白。

文中使用的免疫球蛋白分子的“抗原特异性片段”是免疫球蛋白分子中保留了抗原结合能力的任何片段或变体。抗原特异性片段包括，但不限于 Fab, Fab' 和 F(ab')₂, Fd, 单链 Fvs (scFvs)，单链免疫

球蛋白（例如，重链或其部分和轻链或其部分融合在一起的免疫球蛋白），二硫键连接的 Fvs（sdFvs），二体 (diabodies)，三体 (triabodies)，四体 (tetrabodies)，scFvs 微体 (minibodies)，Fab 微体 (minibodies) 以及二聚体 scFvs 和任何其他包含 V_L 和 V_H 结构域、并且这些结构域处于能形成特异 CDR 的构象的片段。抗原特异性片段还可能包含来源于 camelid 抗体的 V_{H1} 结构域。其中 V_{H1} 可以被工程化从而包括来自其他物种（例如来自人抗体）的 CDR。或者，可以将人源的重链 V_H 片段工程化使之与单链 camelid CDR 相似，该过程称为“骆驼源化 (camelization)”。参见例如，Davies J. 和 Riechmann, L., FEBS Letters 339:285-290 (1994) 以及 Riechmann, L. 和 Muyldermans, S., J. Immunol. Meth. 231:25-38 (1999), 这两篇文章此处均全文引作参考。

抗原特异性免疫球蛋白片段（包括单链免疫球蛋白），可能只包含可变区或者与以下物质的整体或部分组合：重链恒定结构域或其部分，例如重链上的 CH1, CH2, CH3, 跨膜和/或细胞质结构域；以及轻链恒定区，例如 C_κ 或 C_λ 结构域，或轻链上的一部分。同时包括在本发明中的是可变区和 CH1, CH2, CH3, C_κ , C_λ , 跨膜和细胞质结构域的任何组合形式。

本领域公知，Fv 包含 V_H 结构域和 V_L 结构域，Fab 包含连接在 CH1 上的 V_H 和 L 链，Fab 微体 (minibody) 包含 CH3 结构域与 Fab 的融合等。

本领域公知，scFv 包含通过一般长为 15-20 个残基的肽接头连接到 V_L 的 V_H ，二体 (diabodies) 包含带有大约长 5 个残基的肽接头的 scFv，三体 (triabodies) 包含不带肽接头的 scFv，四体 (tetrabodies) 包含带有长为 1 个残基的肽接头的 scFv，scFv 微体 (minibody) 包含融合了 CH3 结构域的 scFv，二聚体 scFv 包含利用另一个肽接头串联在一起的两个 scFv 融合体（综述见 Chames 和 Baty, FEMS Microbiol. Letts. 189: 1-8 (2000)）。优选，所述抗原特异性免疫球蛋白片段包括两种抗原结合结构域，即 V_H 和 V_L 。其他

免疫球蛋白片段是本领域内公知的，在比如文中描述的这些参考文献中都有公开。

在某些实施方案中，本发明涉及鉴定（即选择或筛选）多核苷酸的方法，所述多核苷酸单独或共同编码抗原特异性免疫球蛋白分子，其抗原特异性片段或者具有特异性抗原相关功能的免疫球蛋白分子或片段。在相关的实施方案中，本发明涉及由这些方法鉴定到的多核苷酸所编码的分离的免疫球蛋白分子。

优选的方法包括两步筛选和/或选择的过程。第一个步骤中，通过将编码第一免疫球蛋白亚基的多核苷酸的文库导入真核宿主细胞群体，并与一或多种第二免疫球蛋白亚基一起表达所述亚基，从而由该文库中鉴定到编码第一免疫球蛋白亚基（即重链或轻链）的多核苷酸，这里该第二免疫球蛋白亚基与第一免疫球蛋白亚基不同，即如果第一免疫球蛋白亚基是重链多肽，则第二免疫球蛋白亚基就是轻链多肽。

一旦在第一个步骤中从文库中分离到编码一或多种第一免疫球蛋白亚基的一或多种多核苷酸，就在第二个步骤中鉴定第二免疫球蛋白亚基。将编码分离的第一免疫球蛋白亚基的分离的多核苷酸转移到宿主细胞并进行表达，在所述细胞表达编码第二免疫球蛋白亚基的多核苷酸文库，这样就使得能鉴定到编码第二免疫球蛋白亚基的多核苷酸，该第二免疫球蛋白亚基在与第一个步骤中鉴定到的第一免疫球蛋白亚基结合时就形成了能识别特定抗原和/或执行特异功能的功能性免疫球蛋白分子或其片段。

当免疫球蛋白片段仅由一种多肽构成（即单链片段或包含 V_HH 结构域的片段），因此是由一种多核苷酸编码时，优选的方法包括一步筛选和/或选择的过程。通过将文库导入宿主细胞（比如真核细胞），并从这些宿主细胞中回收该文库中编码免疫球蛋白片段的多核苷酸，从而从所述文库中鉴定出编码单链片段的多核苷酸，其中所述单链片段包含重链可变区和轻链可变区，或者包含 V_HH 区。

在某些实施方案中，通过将表面上表达免疫球蛋白分子的宿主细

胞与抗原进行接触来鉴定特定的免疫球蛋白分子，这就使得能以下面描述的许多不同方法来选择和/或筛选抗原结合细胞。在其他实施方案中，通过分析条件培养基集中免疫球蛋白分子的所需功能特点（例如病毒中和作用），可鉴定到所需的可溶性的分泌免疫球蛋白分子。

在免疫球蛋白分子结合在宿主细胞表面的情况中，第一个步骤包括将编码多种第一免疫球蛋白亚基多肽、可操作地连接了转录调控区的第一多核苷酸文库导入到能表达所述免疫球蛋白分子的宿主细胞群；向相同的宿主细胞内导入编码第二免疫球蛋白亚基多肽群、可操纵地连接了转录调控区的第二多核苷酸文库；在所述宿主细胞表面表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段；将宿主细胞与抗原进行接触，以及从与抗原结合的那些宿主细胞中回收来自第一文库的多核苷酸。

在免疫球蛋白分子完全分泌到细胞培养基的情况中，第一个步骤包括将编码第一免疫球蛋白亚基多肽群、可操纵地连接了转录调控区的第一多核苷酸文库导入到能表达所述免疫球蛋白分子的宿主细胞群中；向相同的宿主细胞内导入编码第二免疫球蛋白亚基多肽群、可操纵地连接了转录调控区的第二多核苷酸文库；使免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段分泌表达并分泌到细胞培养基中；分析条件培养基的试样中是否具有所需抗原相关的抗体功能；以及从那些生长在观察到所需功能的条件培养基中的宿主细胞内回收来自第一文库的多核苷酸。

在文中，“文库”是多核苷酸的代表性种类，即这样一群多核苷酸，它们因例如来自同样的动物物种、组织类型、器官或细胞类型而相互关联，其中所述文库总的包含给定的多核苷酸属中的至少两个不同种。优选多核苷酸文库在给定的多核苷酸属中包含至少 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 或 10^9 个不同种。更具体地说，本发明的文库编码多个某种免疫球蛋白亚基多肽，即重链亚基多肽或轻链亚基多肽。在本文中，本发明的“文库”包含有共同属性的多核苷酸，该属是编码特定型和类的免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸。例如，文

库可能编码人 μ , γ -1, γ -2, γ -3, γ -4, α -1, α -2, ϵ 或 δ 重链, 或者编码人 κ 或 λ 轻链。虽然本发明任何一个文库的成员编码相同的重链或轻链恒定区, 但文库总体包含至少 2 个, 优选至少 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 或 10^9 个不同的可变区, 即与共有恒定区有关的多个可变区。

在其他实施方案中, 文库编码多个免疫球蛋白单链片段, 所述片段包含可变区, 比如轻链可变区或者重链可变区, 优选既包含轻链可变区也包含重链可变区。任选的, 这类文库包含编码某一型和类的免疫球蛋白亚基多肽或其结构域的多核苷酸。

本发明的一个方面涵盖制备编码免疫球蛋白亚基的多核苷酸文库的方法。此外, 本发明涵盖根据文中描述的方法在真核表达载体中构建的免疫球蛋白亚基文库。优选这类文库是在真核病毒载体、更优选的是痘病毒载体中制备的。文中描述了这样的方法和文库。

“受体细胞”或“宿主细胞”或者“细胞”是指其中导入了本发明的多核苷酸文库的细胞或细胞群。本发明的宿主细胞优选是真核细胞或细胞系, 优选是植物, 动物, 脊椎动物, 哺乳动物, 啮齿类动物, 小鼠, 灵长动物或者人细胞或细胞系。“宿主细胞群”是指本发明所述“文库”可以被导入其中并进行表达的一群培养细胞。支持构建在给定载体中的给定文库之表达的任何宿主细胞都包括在内。文中公开了合适的和优选的宿主细胞。此外, 文中公开了优选与具体载体或者具体选择和/或筛选方案一起使用的特定宿主细胞。虽然优选宿主细胞群是单一培养物, 即群体中的每个细胞是相同的细胞类型, 但也可以考虑细胞混合培养物。本发明的宿主细胞可以是附着的, 即贴在固体基质上生长的宿主细胞, 或者, 宿主细胞可以悬浮生长。宿主细胞可以是来源于原发性肿瘤的细胞, 来源于转移瘤的细胞, 原代细胞, 丧失接触抑制的细胞, 转化的原代细胞, 永生化的原代细胞, 可能经历细胞程序死亡的细胞以及由这些细胞衍生的细胞系。

正如上文提及的, 鉴定免疫球蛋白分子的优选方法包括将第一多核苷酸文库导入宿主细胞群, 以及向相同的宿主细胞群导入第二多核

昔酸文库。所述第一和第二文库是互补的，即如果第一文库编码免疫球蛋白重链，第二文库则编码免疫球蛋白轻链，从而可以在宿主细胞群中装配成免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段。同样如上文提及的，鉴定免疫球蛋白或免疫球蛋白片段的另一种方法包括将编码单链片段的单一多核苷酸文库导入宿主细胞群。因此对多核苷酸文库的描述，文库中多核苷酸的组成，以及由这些多核苷酸编码的多肽涵盖了构成第一文库的多核苷酸和构成第二文库的多核苷酸，以及它们编码的多肽。可以在任何合适的载体中构建这些文库，并且两种文库可以、但并非必须构建在相同的载体中。下文公开了用于第一和第二文库的合适和优选的载体。

包含在本发明所述文库中的多核苷酸通过“与转录调控区可操纵地连接”从而编码免疫球蛋白亚基多肽。当给定多核苷酸中的一或多个核酸分子处于功能性关系，它们就是“可操纵地连接”的。这种关系可以存在于多肽的编码区和调控序列之间，它们连接的方式使得适当的分子（例如，转录激活蛋白，聚合酶等）结合到调控序列上时，编码区将进行表达。“转录调控区”包括，但不限于启动子，增强子，操纵子以及转录终止信号，并且它与多核苷酸一起存在以指导它的转录。例如，如果启动子能影响编码免疫球蛋白亚基多肽的核酸分子的转录，则该启动子是与所述核酸分子可操纵地连接在一起的。通常，“可操纵地连接”是指多核苷酸中DNA序列是毗邻或紧密的连接在一起的。但是某些转录调控区，例如增强子不一定是毗邻的。

“调控序列”或“调控区”是指在特定宿主生物内表达可操纵连接的编码序列所必需的DNA序列。适用于原核生物的调控序列，例如包括启动子，任选操纵子序列，以及核糖体结合位点。已知真核细胞能利用启动子，多腺苷酸化信号和增强子。

各种转录调控区是本领域技术人员所公知的。优选的转录调控区包括那些能在脊椎动物细胞内发挥作用的，比如包括，但不限于来自痘病毒，腺病毒，疱疹病毒，例如人巨细胞病毒（优选中早期启动子，并优选连接了内含子A）、猿猴病毒40（优选早期启动子）、逆

转录病毒（比如劳氏肉瘤病毒）以及微小 RNA 病毒（特别是内部核糖体进入位点或者 IRES，增强子区，文中又称为 CITE 序列）的启动子和增强子序列。其他优选的转录调控区包括那些来源于哺乳动物基因，比如肌动蛋白、热休克蛋白和牛生长激素的调控区，以及其他能控制基因在真核细胞内的表达的序列。另外合适的转录调控区包括组织特异性启动子和增强子以及诱导性启动子（例如可被四环素诱导的启动子，以及温度敏感性启动子）。特别优选的是能在被痘病毒感染的细胞的细胞质内发挥作用的启动子，这在下文将详细讨论。

在某些优选实施方案中，每个“免疫球蛋白亚基多肽”（即“第一免疫球蛋白亚基多肽”或“第二免疫球蛋白亚基多肽”）包含（i）选自重链恒定区（重链恒定区的膜结合形式或完全分泌形式）和轻链恒定区的第一免疫球蛋白恒定区，（ii）与第一恒定区对应的免疫球蛋白可变区，即如果所述免疫球蛋白恒定区是重链恒定区，则免疫球蛋白可变区优选包含 V_H 区，而如果免疫球蛋白恒定区是轻链可变区，则优选免疫球蛋白恒定区包含 V_L 区，以及（iii）能够引导免疫球蛋白亚基多肽穿过内质网膜和宿主细胞质膜进行运输的信号肽，其中所述免疫球蛋白亚基多肽是膜结合或者完全分泌的重链，或者连接有重链的轻链。因此，通过两个相同重链和两个相同轻链的相互结合，能形成表面免疫球蛋白分子或完全分泌的免疫球蛋白分子。

关于免疫球蛋白片段的某些优选实施方案中，单链片段包含免疫球蛋白可变区，其选自重链可变区和轻链可变区，优选包括两种可变区。如果所述免疫球蛋白片段既包括重链可变区又包括轻链可变区，它们可以是直接连在一起的（即它们没有肽或其他种类的接头），或者通过其他手段连接。如下文所述，如果它们是以其他方式连接的，它们可以是直接连接的，或者通过表达过程中形成的二硫键，或者通过肽接头连接。相应的，通过重链可变区和轻链可变区的联合就形成了 CDR。

一个单链片段中的重链可变区和轻链可变区可以相互关联，或者一个单链片段的重链可变区可以与另外一个单链片段的轻链可变区关

联，反之亦然，这取决于接头的类型。在一个实施方案中，所述单链片段还可以包含恒定区，其选自自由重链恒定区或其结构域和轻链恒定区或其结构域组成的组。两个单链片段可以通过它们的恒定区相互关联。

如上文提及的，在某些实施方案中，编码所述单链片段的轻链可变区和重链可变区的多核苷酸还编码接头。所述单链片段可能包含具有 V_H -接头- V_L 或者 V_L -接头- V_H 序列的单一多肽。在一些实施方案中，所选的接头使单链片段的重链和轻链能以适当的构象方向结合在一起。参见，例如 Huston, J. S. 等, *Methods in Enzym.* 203:46-121 (1991)。因此在这些实施方案中，接头应当能跨越它与可变区的融合点之间的 3.5nm 距离而不扭曲天然的 Fv 构象。在这些实施方案中，构成接头的氨基酸残基能够跨越这个距离，应当有 5 个氨基酸或更长。带有 5 氨基酸接头的单链片段可以单体形式存在，但主要是二聚体形式。优选，所述接头至少长大约 10 或至少 15 个残基。在另一些实施方案中，对接头长度的选择要能促进形成 scFv 四聚体（四体），它是 1 个氨基酸长。在一些实施方案中，可变区被直接连接（即单链片段不含肽接头）以便促进形成 scFv 三聚体（三体）。这些变化是本领域公知的（参见例如，Chames 和 Baty, *FEMS Microbiol. Letts.* 189: 1-8 (2000)）。接头不应长到导致对结合位点发生立体干扰。因此，优选接头长大约 25 个残基或更短。

优选所选肽接头的氨基酸使得接头是亲水性的，这样它不会被包埋在抗体中。接头 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID NO:6) 是一个广泛用于许多抗体的优选接头，因为它能提供充分的柔性。其他接头包括 Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO:7), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr (SEQ ID NO:8), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln (SEQ ID NO:9), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp (SEQ ID NO:10), Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys

Gly(SEQ ID NO:11), Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser Leu Asp(SEQ ID NO:12), 以及 Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp(SEQ ID NO:13)。或者, 对接头比如 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃(SEQ ID NO:6) 进行诱变, 或者将接头中的氨基酸随机化, 利用噬菌体展示载体或者本发明的方法, 筛选或选择带有不同接头的抗体中亲和力最高或者对表现型影响最大的, 当然也可以使用任何序列。较短接头的例子包括上述接头的片段, 长接头的例子包括上述接头的组合形式, 上述接头的片段的组合形式, 以及上述接头和接头片段的组合形式。

同样优选的是作为以上描述的免疫球蛋白亚基多肽的变体或片段的那些免疫球蛋白亚基多肽。任何能产生免疫球蛋白分子的抗原结合片段的变体或片段都涵盖在内。这类变体可能通过例如与天然跨膜区的关联, 受体-配体相互作用, 或者与异源跨膜区的融合而附着在宿主细胞表面, 或者可能分泌到细胞培养基中。文中描述了免疫球蛋白分子的抗原结合片段的例子。

在那些免疫球蛋白亚基多肽包含重链多肽的实施方案中, 来自任何动物物种的任何免疫球蛋白重链都包括在内。文中描述了合适和优选的免疫球蛋白重链。所述免疫球蛋白重链包括来自脊椎动物比如鸟(特别是鸡)、鱼和哺乳动物的重链, 其中哺乳动物免疫球蛋白重链是优选的。免疫球蛋白重链的例子包括人, 小鼠, 狗, 猫, 马, 山羊, 大鼠, 绵羊, 牛, 猪, 豚鼠, 骆驼, 骆马和仓鼠免疫球蛋白重链。在这些中, 人免疫球蛋白重链是尤其优选的。还可以考虑的是杂合免疫球蛋白重链, 其包含来自一或多个物种的重链部分, 比如小鼠/人杂合免疫球蛋白重链, 或者“骆驼源化”的人免疫球蛋白重链。对于人免疫球蛋白重链而言, 优选本发明的免疫球蛋白重链选自下述组中: μ 重链(即 IgM 免疫球蛋白的重链), γ -1 重链(即 IgG1 免疫球蛋白的重链), γ -2 重链(即 IgG2 免疫球蛋白的重链), γ -3 重链(即 IgG3 免疫球蛋白的重链), γ -4 重链(即 IgG4 免疫球蛋白的重链), α -1 重链(即 IgA1 免疫球蛋白的重链), α -2 重链

(即 IgA2 免疫球蛋白的重链), ϵ 重链(即 IgE 免疫球蛋白的重链), 以及 δ 重链(即 IgD 免疫球蛋白的重链)。在某些实施方案中, 优选的免疫球蛋白重链包括膜结合形式的人 μ , γ -1, γ -2, γ -3, γ -4, α -1, α -2, ϵ 和 δ 重链。特别优选的是膜结合形式的人 μ 重链。

膜结合形式的免疫球蛋白通常是通过跨膜结构域被锚定在细胞表面, 其中的跨膜区经重链信使 RNA 的可变转录终止和剪接而构成重链多肽的部分。参见例如 Roitt 第 9 和 10 页。“跨膜结构域”、“跨膜区”或者可以互换的相关术语, 是指被锚定在细胞膜上的重链多肽的一部分。典型的跨膜结构域包含疏水氨基酸, 这在下文将更详细地讨论。“胞内结构域”, “细胞质结构域”或者可以互换的相关术语是指多肽中处于细胞内的部分, 它与那些或者锚定在细胞膜上或者暴露在细胞表面上的部分不同。膜结合形式的免疫球蛋白重链多肽通常包含大约三个氨基酸的非常短的细胞质结构域。本发明的膜结合形式免疫球蛋白重链多肽优选包含通常与该免疫球蛋白重链关联的跨膜以及胞内结构域, 例如与前 B 细胞中的 μ 和 δ 重链相关联的跨膜和胞内结构域, 或者与 B 记忆细胞中的任何免疫球蛋白重链相关联的跨膜和胞内结构域。但是, 也可以考虑异源跨膜和胞内结构域与给定免疫球蛋白重链多肽相结合, 例如 μ 重链的跨膜和胞内结构域可以与 γ 重链的胞外部分相结合。或者, 可以使用完全异源的多肽的跨膜和/或胞质结构域, 例如主要组织相容性分子、细胞表面受体、病毒表面蛋白质的跨膜和胞质结构域, 嵌合结构域或者合成结构域。

在那些所述免疫球蛋白亚基多肽包含轻链多肽的实施方案中, 来自任何动物物种的任何免疫球蛋白轻链都包括在内。文中描述了合适和优选的免疫球蛋白轻链。所述免疫球蛋白轻链包括来自脊椎动物比如鸟(特别是鸡)、鱼和哺乳动物的轻链, 其中哺乳动物免疫球蛋白轻链是优选的。免疫球蛋白轻链的例子包括人, 小鼠, 狗, 猫, 马, 山羊, 大鼠, 绵羊, 牛, 猪, 豚鼠和仓鼠免疫球蛋白轻链。在这些中, 人免疫球蛋白轻链是尤其优选的。还可以考虑的是杂合免疫球蛋

白轻链，其包含来自一或多个物种的轻链的部分，比如小鼠/人杂合免疫球蛋白轻链。优选的免疫球蛋白轻链包括人 κ 和 λ 轻链。任何一对轻链可以联合同样的一对重链形成免疫球蛋白分子，它具有特征性的 H_2L_2 结构，这是本领域普通技术人员所熟知的。

根据本发明一个优选的方面，文中描述的多核苷酸文库（例如第一多核苷酸文库或第二多核苷酸文库）的每个成员包括(a)编码文库中所有成员共有的免疫球蛋白恒定区的第一核酸分子，和(b)编码免疫球蛋白可变区的第二核酸分子，其中该第二核酸分子处于第一核酸分子的上游并符合其读框。相应的，由本发明多核苷酸文库的每个成员所编码的免疫球蛋白亚基多肽（即由这样的多核苷酸编码的免疫球蛋白轻链或重链）优选包含与免疫球蛋白可变区相关联的免疫球蛋白恒定区。

由“第一核酸分子”编码的轻链的恒定区包含该亚基多肽的大约一半，并位于C末端，即处于轻链多肽的后半部分。文中称为 C_L 恒定区的轻链恒定区，或者更具体地说是 C_{κ} 恒定区或 C_{λ} 恒定区，包含被链间二硫键保持在一个“环”内的大约110个氨基酸。

由“第一核酸分子”编码的重链的恒定区包含亚基多肽的四分之三或更多，并位于C末端，即处于重链多肽的后半部分。文中称为 C_H 恒定区的重链恒定区，包含大约110个氨基酸的3或4个肽环或者“结构域”，它们各由链间二硫键所封闭。更具体地说，人免疫球蛋白的重链恒定区包括 C_{μ} 恒定区， C_{δ} 恒定区， C_{γ} 恒定区， C_{α} 恒定区和 C_{ϵ} 恒定区。 C_{γ} ， C_{α} 和 C_{δ} 重链各含有3个恒定区结构域，通常称为 C_{H1} ， C_{H2} 和 C_{H3} ，而 C_{μ} 和 C_{ϵ} 重链含有4个恒定区结构域，通常称为 C_{H1} ， C_{H2} ， C_{H3} 和 C_{H4} 。编码人免疫球蛋白恒定区的核酸分子可很容易从得自例如人B细胞或它们的前体的cDNA文库，通过比如PCR等方法获得，这是本领域技术人员所熟知的，下面的实施例中也有公开。

本发明的免疫球蛋白亚基多肽各含有一个由“第二核酸分子”编码的免疫球蛋白可变区。在多核苷酸文库内，每个多核苷酸包含相同

的恒定区，但该文库含有多个，即至少 2 个，优选至少 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 或 10^9 个不同的可变区。正如本领域普通技术人员所熟知的，轻链可变区是由重排的核酸分子编码的，每个包含轻链 V_L 区（具体说是 V_c 区或 V_λ 区）和轻链 J 区（具体说是 J_c 区或 J_λ 区）。类似的，重链可变区也是由重排的核酸分子编码的，每个包含重链 V_H 区、D 区和 J 区。这些重排在细胞分化时发生在 DNA 水平。编码重链和轻链可变区的核酸分子可以通过例如 PCR 从成熟 B 细胞和浆细胞获得，所述细胞最终分化，从而表达对特定表位有特异性的抗体。此外，如果需要针对特定抗原的抗体，可变区可以自用该抗原免疫过、因此产生含量扩大的能与该抗原相互作用的抗体可变区的动物的成熟 B 细胞和浆细胞分离。或者，如果需要一个更多样化的文库，可以从前体细胞，例如前 B 细胞和未成熟 B 细胞分离可变区，因为这些细胞中已经发生了免疫球蛋白基因的重排，但还没有暴露给自身或非自身抗原。例如，可以通过 PCR 从取自多个供体的正常人骨髓中分离可变区。或者，可变区可以是合成的，例如在实验室中通过产生合成寡核苷酸来制备，或者来源于对种系 DNA 的体外操作，导致免疫球蛋白基因重排。

除了分别编码免疫球蛋白恒定区和可变区的第一和第二核酸分子，本发明多核苷酸文库的每个成员如上所述进一步包含编码信号肽的第三核酸分子，该第三核酸分子直接位于编码可变区的第二核酸分子的上游并与其读框相符。

“信号肽”是指例如能够引导新生的免疫球蛋白多肽亚基转运到宿主细胞表面的多肽序列。在本领域中信号肽也可以称为“信号序列”，“前导序列”，“分泌信号肽”或者“分泌信号序列”。信号肽通常表达为完整或“未成熟”多肽的一部分，并且一般位于 N 末端。来自不同蛋白质的信号肽的共同结构通常被描述为带正电荷的 n-区，随后是一个疏水的 h-区和一个电中性但是极性的 c-区。在许多情况中，一旦蛋白质到达其最终目的地，包含信号肽的氨基酸就被切除从而产生该多肽的“成熟”形式。切割是由称为信号肽酶的酶所

催化。(-3, -1) 规则说明, 为了切割的正确进行, 位置-3 和-1 (相对切割位点) 的残基必须小而且是中性的。参见例如, McGeoch, *Virus Res.* 3:271-286(1985) 和 von Heinje, *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690(1986)。

所有的细胞, 包括本发明的宿主细胞, 都具有组成型的分泌途径, 其中要被输出的蛋白质, 包括分泌的免疫球蛋白亚基多肽通过该途径从细胞中分泌出来。这些蛋白质通过 ER-高尔基体加工途径, 并可能在此发生修饰。如果蛋白质上检测不到其他信号, 它就被引导到细胞表面被分泌。或者, 免疫球蛋白亚基多肽可以最终成为表达在宿主细胞表面的内在膜成分。膜结合形式的免疫球蛋白亚基多肽开始遵循与分泌形式相同的途径, 穿过 ER 腔, 但它们由于终止转运信号或“跨膜结构域”的存在而停留在 ER 膜中。跨膜结构域是大约 20 个氨基酸残基的疏水片段, 它们在跨越膜的时候采取 α 螺旋构象。包埋在膜里的蛋白质被锚定在细胞质膜的磷脂双层中。对于分泌蛋白质, 跨膜蛋白质的 N 末端区域有一个信号肽, 它能穿过膜并在离开 ER 腔的时候被切割。免疫球蛋白重链多肽的跨膜形式与分泌形式使用相同的信号肽。

本发明的信号肽可以是天然免疫球蛋白信号肽, 即由天然重链或轻链转录物的一部分序列所编码; 或者是该序列保留了引导与它可操纵连接的免疫球蛋白亚基多肽进行分泌的能力的功能性衍生物。或者, 可以使用异源信号肽或其功能性衍生物。例如, 可以用人组织纤溶酶原激活物或小鼠 β -葡糖醛酸酶的信号肽取代免疫球蛋白亚基多肽的天然信号肽。

已知许多种类的膜结合蛋白质的信号序列、跨膜结构域以及胞质结构域。可以相应地使用这些序列, 即或者将来自特定蛋白质的所述序列成对地使用 (例如信号序列和跨膜结构域, 或者信号序列和胞质结构域, 或者跨膜结构域和胞质结构域), 或者三个一起使用, 或者与取自不同蛋白质的每个成分使用, 或者, 这些序列可以是合成的, 如前面提到的完全来源于人工递送结构域共有序列。

尤其优选的信号序列和跨膜结构域包括，但不限于来源于 CD8, ICAM-2, IL-8R, CD4 和 LFA-1 的那些。另外有用的序列包括这样一些序列，它们来自 1) I 型内在膜蛋白质，比如 IL-2 受体 β 链（残基 1-26 是信号序列，241-265 是跨膜残基；参见 Hatakeyama 等, *Science* 244:551(1989) 和 von Heijne 等, *Eur. J. Biochem.* 174:671(1988) 和胰岛素受体 β 链（残基 1-27 是信号序列，957-959 是跨膜区，960-1382 是胞质结构域；参见 Hatakeyama 等, 同上, 和 Ebina 等, *Cell* 40:747(1985)）；2) II 型膜内在蛋白质，比如中性内肽酶（残基 29-51 是跨膜区，2-28 是胞质结构域；参见 Malfroy 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144:59(1987)）；3) III 型蛋白质，比如人细胞色素 P450 NF25（Hatakeyama 等, 同上）；以及 4) IV 型蛋白质，比如人 P-糖蛋白（Hatakeyama 等, 同上）。在这种情况下，CD8 和 ICAM-2 是尤其优选的。例如 CD8 和 ICAM-2 的信号序列位于转录产物的最 5' 端。在 CD8 的情况中，信号序列由氨基酸 1-32 构成（Nakauchi 等, *PNAS USA* 82:5126(1985)），在 ICAM-2 的情况中，信号序列由氨基酸 1-21 构成（Staunton 等, *Nature (London)* 339:61(1989)）。这些跨膜结构域在 CD8 中由氨基酸 145-195 构成（Nakauchi, 同上），在 ICAM-2 中由氨基酸 224-256 构成（Staunton, 同上）。

或者，膜锚定结构域包括 GPI 锚，它在所述分子和脂双层之间通过糖基磷脂酰肌醇键形成共价键，例如在 DAF 中（参见 Homans 等, *Nature* 333(6170):269-72(1988), 和 Moran 等, *J. Biol. Chem.* 266:1250(1991)）。为了达到这种情况，可以用来自 Thy-1 的 GPI 序列替代跨膜序列放置在免疫球蛋白或免疫球蛋白片段的 3'。

类似的，十四烷基化序列可以作为膜锚定结构域。已知 c-src 的十四烷基化能使它募集到质膜上。这是一种简单有效的膜定位方法，条件是蛋白质的前 14 个氨基酸残基完全负责这一功能（参见 Cross

等, Mol. Cell. Biol. 4(9)1834(1984); Spencer 等, Science262:1019-1024(1993))。这个基元已经显示出对报告基因的定位很有效, 可以用于锚定 TCR 的 zeta 链。该基元被放置在免疫球蛋白或免疫球蛋白片段的 5', 以便将构建体定位到质膜上。其他一些修饰比如十六烷酰化可以用于将构建体锚定在质膜中; 例如, G 蛋白耦联受体激酶 GRK6 序列的十六烷酰化序列 (Stoffel 等, J. Biol. Chem. 269:27791(1994)) ; 视紫红质的十六烷酰化序列 (Barnstable 等, J. Mol. Neurosci. 5(3):207(1994)) ; 以及 p21 H-ras1 蛋白 (Capon 等, Nature302:33(1983)) 。

除了分别编码免疫球蛋白恒定区和可变区的第一和第二核酸分子, 如上所述本发明的多核苷酸文库的每个成员可以另外包含编码异源多肽的其他核酸分子。这些附加多核苷酸可以是对编码信号肽的第三核酸分子的补充或替代物。这类编码异源多肽的附加核酸分子可以位于编码可变链区域 (variable chain region) 或重链区域的核酸分子的上游或下游。

由附加核酸分子编码的异源多肽可以是一个拯救序列。所谓拯救序列是可以用来对免疫球蛋白或其片段或者是编码它们的多核苷酸进行纯化或分离的序列。因此, 例如肽拯救序列包括纯化序列, 比如用于 Ni 亲和柱的 6-His 标签, 和用于检测、免疫沉淀或者 FACS (荧光激活细胞分选) 的表位标签。合适的表位标签包括 myc (与市售 9E10 抗体一起使用) , 细菌酶 BirA 的 BSP 生物素化靶序列, flu 标签, LacZ 和 GST。所述附加核酸分子还可以编码肽接头。

在一个优选实施方案中, 异源多肽被组合使用。因此, 例如可以使用信号序列、拯救序列和稳定序列的任何数目的组合, 并且可以有或没有接头序列。人们可以将编码异源多肽的各种融合多核苷酸放置在免疫球蛋白或其片段的编码多核苷酸的 5' 和 3'。本领域技术人员可以理解, 这些序列组件可以以许多组合方式和变化进行使用。

将包含在第一和第二文库中的多核苷酸导入合适的宿主细胞。合适的宿主细胞特征在于能表达附着在它们的表面的免疫球蛋白分子。

可以通过本领域技术人员所熟知的方法将所述多核苷酸导入宿主细胞。文中公开了合适的和优选的导入方法。

容易理解的是，导入方法根据构建多核苷酸文库所用的载体的性质而不同。例如，可以通过例如脂质转染（比如用阴离子脂质体（参见例如 Felgner 等, 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413），或阳离子脂质体（参见例如 Brigham, K. L. 等, Am. J. Med. Sci. 298(4):278-2821(1989); 美国专利 4897355 (Eppstein 等)），电穿孔，磷酸钙沉淀（一般可参考 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989），原生质体融合，原生质球融合，或者通过 DEAE 葡聚糖法（Sussman 等, Cell. Biol. 4:1641-1643(1984)）将 DNA 质粒载体导入宿主细胞。以上文献均全文引入此处作为参考。

当所选方法是脂质转染时，可以将核酸与阳离子脂质体形成复合物，其中的阳离子脂质体包括比如 DOTMA: DOPE, DOTMA, DOPE, DC-胆固醇, DOTAP, Transfectam® (Promega), Tfx® (Promega), LipoTAXI™ (Stratagene), PerFect Lipid™ (Invitrogen), SuperFect™ (Qiagen)。当核酸是通过阴离子脂质体进行转染时，该阴离子脂质体可以包裹住核酸。优选，采用制造商的实验方案（比如对于 Lipofectamine; Life Technologies Incorporated）通过脂质体介导转染导入 DNA。

在所述质粒是病毒载体的情况下，向宿主细胞导入最方便的是通过常规感染进行。但是许多情况下，可以通过以上描述的任何一种方法将病毒核酸导入细胞，由于病毒核酸是“感染性”的，即病毒核酸导入到细胞中后，不需其他条件，就足够使细胞产生活性的子代病毒颗粒。但应当提到的是，某些病毒核酸，例如痘病毒核酸不是感染性的，因此必须与所提供的附加成分一起导入，例如通过包裹病毒核酸的病毒颗粒，通过已经被工程化能产生所需病毒元件的细胞，或者通过辅助病毒。

所述第一和第二多核苷酸文库可以按任何顺序或者同时导入宿主细胞。例如，如果第一和第二多核苷酸文库都是在病毒载体中构建的，无论是感染性或失活的，载体可以以混合物的形式通过同时感染来导入，或者连续感染来导入。如果一个文库是在病毒载体中构建的，另一个是在质粒载体中，最方便的是先导入一个文库，再导入另一个文库。

将第一和第二多核苷酸文库导入宿主细胞后，使免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段在所述宿主细胞的膜表面上表达或者分泌到细胞培养基中。“使……表达”是指使被导入宿主细胞的载体进行免疫球蛋白亚基多肽的转录和翻译，优选使宿主细胞将装配完全的免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段转运到膜表面或细胞培养基中。通常，使……表达需要在合适的条件下培养其中导入了多核苷酸的宿主细胞以便表达的进行。这些条件和表达所需时间根据所选的宿主细胞和载体而变化，是本领域技术人员所熟知的。

在某些实施方案中，将那些在表面上表达免疫球蛋白分子将可溶性免疫球蛋白分子分泌到细胞培养基中的宿主细胞与抗原进行接触。在本文中，“抗原”是能够与抗体、免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段特异结合的任何分子。“特异结合”是指抗原结合到抗体的 CDR 上。抗原中与 CDR 特异地相互作用的部分是“表位”，或者“抗原决定簇”。抗原可能包含一个表位，但通常来说，抗原包含至少两个表位，并且根据抗原的大小、构象和类型，可能包括任何数量的表位。

抗原通常是肽或多肽，但也可以是任何分子或化合物。例如，有机化合物，例如二硝基苯酚或 DNP，核酸，碳水化合物或者这些化合物的任何混合物，无论是有还是没有肽或多肽，都可以是合适的抗原。最小的肽或多肽表位被认为是大约 4 或 5 个氨基酸。优选肽或多肽表位包含至少 7 个，更优选至少 9 个，最优选在大约 15 到 30 个氨基酸。因为 CDR 能够识别三级结构的抗原性肽或多肽，所以构成表位的氨基酸不必是连续的，某些情况中，甚至不在同一个肽链上。本发明中，肽或多肽抗原优选含有至少 4 个，至少 5 个，至少 6 个，至少

7个,更优选至少8个,至少9个,至少10个,至少15个,至少20个,至少25个,最优选大约15到30个氨基酸构成的序列。优选含有表位或者由表位组成的肽或多肽至少长10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,或100个氨基酸残基。所述抗原可以是任何形式,也可以是游离的,例如溶解在溶液中,或者附着在任何基质上。文中公开了合适和优选的基质。在某些实施方案中,如下文的详细描述,抗原可能是表达抗原的递呈细胞的一部分。

应当理解,根据本发明的方法可以制备特异于任何抗原的免疫球蛋白分子。优选的抗原是“自身”抗原,即与所产生的免疫球蛋白分子来源于相同物种的抗原。举一个例子,可能希望制备针对人肿瘤抗原的人抗体,所述抗原包括,但不限于CEA抗原,GM2抗原,Tn抗原,sTn抗原,Thompson-Friedenreich抗原(TF),Globo H抗原,Le(y)抗原,MUC1抗原,MUC2抗原,MUC3抗原,MUC4,MUC5AC抗原,MUC5B抗原,MUC7抗原,癌胚抗原,人绒毛膜促性腺激素的 β 链(hCG β)抗原,HER2/neu抗原,PSMA抗原,EGFRvIII抗原,KSA抗原,PSA抗原,PSCA抗原,GP100抗原,MAGE1抗原,MAGE2抗原,TRP1抗原,TRP2抗原,以及酪氨酸酶抗原。其他目的“自身”抗原包括,但不限于细胞因子,受体,配体,糖蛋白和激素。

本发明还包括制备针对感染因子上的抗原的抗体。这类抗原的例子包括,但不限于细菌抗原,病毒抗原,寄生虫抗原和真菌抗原。病毒抗原的例子包括,但不限于腺病毒抗原, α 病毒抗原,杯状病毒抗原,例如杯状病毒衣壳抗原,冠状病毒抗原,犬瘟病毒抗原,埃博拉病毒抗原,肠道病毒抗原,黄病毒抗原,肝炎病毒(A-E)抗原,例如乙肝核心或表面抗原,疱疹病毒抗原,例如单纯疱疹病毒或水痘带状疱疹病毒糖蛋白抗原,免疫缺陷病毒抗原,例如人免疫缺陷病毒包膜或蛋白酶抗原,感染性腹膜炎病毒抗原,流感病毒抗原,例如甲型流感血凝素或神经氨酸酶抗原,白血病毒抗原,马尔堡病毒抗原,致癌病毒抗原,正粘病毒抗原,乳头瘤病毒抗原,副流感病毒抗原,

例如血凝素/神经氨酸酶抗原, 副粘病毒抗原, 细小病毒抗原, 痘病毒抗原, 微小 RNA 病毒抗原, 例如骨髓灰质炎病毒衣壳抗原, 狂犬病毒抗原, 例如狂犬病毒糖蛋白 G 抗原, 呼肠病毒抗原, 逆转录病毒抗原, 轮状病毒抗原, 以及其他致癌或癌症相关的病毒抗原。

细菌抗原的例子包括, 但不限于放线菌抗原, 芽孢杆菌抗原, 拟杆菌抗原, 博德特氏菌抗原, 巴尔通氏体抗原, 疏螺旋体抗原, 例如 *B. bergdorferi* OspA 抗原, 布鲁氏菌属抗原, 弯曲杆菌属抗原, 二氧化碳嗜纤维菌属抗原, 衣原体属抗原, 梭菌属抗原, 棒杆菌属抗原, 考克斯氏体属抗原, 嗜皮菌属抗原, 肠球菌属抗原, 埃里希氏体属抗原, 埃希氏菌抗原, 弗朗希氏菌属抗原, 梭杆菌属抗原, 血巴通氏体属抗原, 嗜血杆菌属抗原, 例如流感嗜血杆菌 b 型外膜蛋白抗原, 螺杆菌属抗原, 克雷伯氏菌属抗原, L-型细菌抗原, 钩端螺旋体属抗原, 李斯特氏菌属抗原, 分枝杆菌属抗原, 枝原体属抗原, 奈瑟氏球菌属抗原, 新立克次氏体属抗原, 诺卡氏菌属抗原, 巴斯德氏菌属抗原, 消化球菌属抗原, 消化链球菌属抗原, 肺炎球菌属抗原, 变形菌属抗原, 假单胞菌属抗原, 立克次氏体属抗原, 罗卡利马氏体属抗原, 沙门氏菌属抗原, 志贺氏菌属抗原, 葡萄球菌属抗原, 链球菌属抗原, 例如酿脓链球菌 M 蛋白抗原, 密螺旋体属抗原, 和耶尔森氏菌属抗原, 例如鼠疫耶尔森氏菌 F1 和 V 抗原。

真菌抗原的例子包括, 但不限于犁头霉属抗原, 支顶孢属 (*Acremonium*) 抗原, 链格孢属抗原, 曲霉属抗原, 蛙粪霉属抗原, *Bipolaris* 抗原, 芽酵母属抗原, 假丝酵母属抗原, 球孢菌属 (*Coccidioides*) 抗原, 耳霉抗原, 隐球酵母属抗原, 弯孢属抗原, 表皮癣菌属抗原, 外瓶柄霉属抗原, 地霉属抗原, 组织胞浆菌属抗原, 马杜拉分支菌属抗原, 鳞斑霉属抗原, 小孢霉属抗原, *Moniliella* 抗原, 被孢霉属抗原, 毛霉属抗原, 拟青霉属抗原, 青霉属抗原, *Phialemonium* 抗原, 瓶霉属抗原, *Prototheca* 抗原, *Pseudallescheria* 抗原, *Pseudomicrodochium* 抗原, 腐霉属抗原, 鼻孢子菌属抗原, 根霉属抗原, *Scolecobasidium* 抗原,

Sporothrix 抗原, 葡柄霉属抗原, 发癣菌属抗原, 丝孢酵母属抗原, 和 Xylohypha 抗原。

原生动物寄生虫抗原的例子包括, 但不限于巴倍虫属抗原, 肠袋虫属抗原, 贝斯虫属 (Besnoitia) 抗原, 隐孢子虫属 (Cryptosporidium) 抗原, 艾美虫属 (Eimeri) 抗原 a 抗原, 脑居虫属 (Encephalitozoon) 抗原, 内变形虫属抗原, 贾第虫属抗原, Hammondia 抗原, 肝簇虫属 (Hepatozoon) 抗原, 等孢子虫属抗原, 利什曼虫属抗原, 微孢子虫属 (Microsporidia) 抗原, 新孢子虫属 (Neospora) 抗原, 微粒子虫属抗原, Pentatrichomonas 抗原, 疟原虫属抗原, 例如 P. falciparum circumsporozoite (PfCSP), 孢子虫表面蛋白 2 (PfSSP2), 肝态 (liver state) 抗原 1 羧基端 (PFLSA-1 c-term), 和外运蛋白 1 (PfExp-1) 抗原, 肺囊虫属 (Pneumocystis) 抗原, 肉孢子虫属抗原, 裂体属 (Schistosoma) 抗原, 泰来虫属 (Theileria) 抗原, 弓形虫属抗原, 和锥虫属抗原。

蠕虫寄生虫抗原的例子包括, 但不限于棘唇线虫属 (Acanthocheilonema) 抗原, Aelurostrongylus 抗原, 钩口线虫属抗原, 管圆线虫属抗原, 蛔虫属抗原, 布鲁线虫属 (Brugia) 抗原, 仰口线虫属 (Bunostomum) 抗原, 毛细线虫属抗原, 夏柏特线虫属 (Chabertia) 抗原, 古柏线虫属 (Cooperia) 抗原, 环体线虫属 (Crenosoma) 抗原, 四尾线虫属 (Dictyocaulus) 抗原, 膨结线虫属 (Dioctophyme) 抗原, 双瓣线虫属 (Dipetalonema) 抗原, 双叶槽属 (Diphyllobothrium) 抗原, Diplydium 抗原, 恶丝虫属抗原, 龙线虫属 (Dracunculus) 抗原, 住肠线虫属抗原, Filaroides 抗原, 血矛线虫属 (Haemonchus) 抗原, 兔唇蛔虫属 (Lagochilascaris) 抗原, 罗阿线虫属 (Loa) 抗原, 曼森线虫属抗原, 缪勒线虫属 (Muellerius) 抗原, 侏体属 (Nanophyetus) 抗原, 板口线虫属抗原, 细颈线虫属 (Nematodirus) 抗原, 结节线虫属抗原, 盘尾丝虫属抗原, 后睾吸虫属抗原, 奥斯脱线虫属 (Ostertagia) 抗原, 副线虫属 (Parafilaria) 抗原, 并殖属抗原,

副蛔虫属抗原, 泡翼线虫属抗原, 原圆线虫属抗原, 腹腔丝虫属 (Setaria) 抗原, 旋尾线虫属 (Spirocerca) 抗原, 旋宫属 (Spirometra) 抗原, Stephanofilaria 抗原, 类圆线虫属抗原, 圆线虫属抗原, 吸吮线虫属 (Thelazia) 抗原, 弓蛔虫属 (Toxascaris) 抗原, 弓首线虫属抗原, 毛形线虫属抗原, 毛圆线虫属抗原, 鞭虫属抗原, 钩线虫属抗原, 和吴策线虫属抗原。

在那些免疫球蛋白分子表达在宿主细胞表面上的选择和筛选方案中, 将本发明的宿主细胞通过这样一个方法与抗原进行接触, 该方法使得特异识别表达在宿主细胞表面的免疫球蛋白分子的 CDR 的抗原与 CDR 结合, 从而使与抗原特异结合的宿主细胞和那些不结合抗原的宿主细胞区别开来。任何能使表达抗原特异性抗体的宿主细胞与抗原进行接触的方法都包括在本发明中, 例如, 如果宿主细胞是悬浮的, 抗原附着在固体基质上, 则与抗原特异结合的细胞将被捕获到固体基质上, 从而使得不结合抗原的那些细胞可被洗掉, 随后可以回收结合细胞。或者, 如果宿主细胞附着在固体基质上, 通过特异结合抗原, 导致这些细胞从基质上释放下来 (例如, 由于细胞死亡), 则可以从细胞上清液中回收它们。文中公开了使本发明所述宿主细胞与抗原进行接触的优选方法, 尤其是利用通过三分子重组构建在痘苗病毒载体中的文库。

在一个优选的用于检测表达在宿主细胞表面上的抗原特异性免疫球蛋白分子的筛选方法中, 将本发明的宿主细胞与选择抗原一起温育, 其中所述抗原直接标记了荧光素-5-异硫氰酸 (FITC), 或者间接标记生物素, 然后用 FITC 标记的链霉亲和素检测。可以采用本领域技术人员熟悉的其他荧光探针。在温育过程中, 标记好的选择抗原与抗原特异性免疫球蛋白分子结合。通过荧光激活细胞分选术可以选择出表达针对特定的荧光标记抗原的抗体受体的细胞, 从而使得与抗原特异结合的宿主细胞和不结合抗原的宿主细胞区分开。随着能在 1 小时内分选 1×10^8 个以上细胞的细胞分选仪的出现, 就可以对感染了免疫球蛋白基因的重组痘苗文库的大量细胞进行筛选, 从而选择出表

达针对选择抗原的特异性抗体受体的细胞亚群。

收获与抗原特异结合的宿主细胞后，从这些宿主细胞中回收第一文库的多核苷酸。“回收”是指粗略地将所需成分与不需要的成分分离开。例如，根据宿主细胞从固体基质上的脱离来“回收”与抗原结合的宿主细胞，通过与其他细胞成分的粗分离而从这些细胞中“回收”第一文库的多核苷酸。应当提到的是术语“回收”不代表任何类型的纯化或分离除去病毒和其他成分。多核苷酸的回收可以通过本领域普通技术人员已知的任何常规方法来进行。一个优选的方面，所述多核苷酸通过收获感染性病毒颗粒而回收，例如，其中构建了第一文库的痘苗病毒载体颗粒，它们包含在与抗原结合的宿主细胞内。

在某些免疫球蛋白分子被完全从宿主细胞表面分泌出来的筛选方案中，其中培养着宿主细胞池的细胞培养基，即“条件培养基”，可以通过这样一种方法与抗原进行“接触”，该方法使得特异识别免疫球蛋白分子的 CDR 的抗原与 CDR 结合，并能检测抗原-抗体相互作用。这类方法包括，但不限于免疫印迹，ELISA 测定法，RIA 测定法，RAST 测定法和免疫荧光测定法。或者，对所述条件培养基进行特定抗体的功能测定。这类测定法的例子包括，但不限于病毒中和法（用于针对特定病毒的抗体），细菌调理/吞噬检测法（用于针对特定细菌的抗体），抗体依赖性细胞毒（ADCC）检测法，检测对某些细胞功能的抑制或促进的测定法，检测肥大细胞的 IgE 介导的组胺释放的方法，血凝试验以及血凝抑制试验。这些测定方法能够检测到具有所需功能特征的抗原特异性抗体。

鉴定到含有能特异地结合抗原或者具有所需的功能特征的免疫球蛋白分子的条件培养基后，进行进一步筛选步骤，直到回收到产生目标免疫球蛋白分子的宿主细胞，然后从这些宿主细胞中回收第一文库的多核苷酸。

本领域普通技术人员很容易理解，鉴定编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸可能需要两或更多轮上述选择，必须进行两或更多轮上述筛选。一轮选择不一定能分离到纯的编码所需第一免疫球蛋白亚基多

肽的多核苷酸；第一轮选择后得到的混合物可能富含所需多核苷酸，但也污染有杂质插入序列。文中描述的筛选法可鉴定到含有活性宿主细胞和/或免疫球蛋白分子的池，但这些池还含有非活性种类。因此，活性池被进一步细分，进行其他几轮的筛选。所以鉴定编码第一免疫球蛋白亚基多肽（它与第二免疫球蛋白亚基多肽联合时能形成目标免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段）的多核苷酸可能需要几轮的选择和/或筛选或者更为有利，这样就提高了含有所需多核苷酸的细胞的比例。相应地，该实施方案进一步要求将第一轮回收到的多核苷酸导入第二群细胞，并进行第二轮选择。

因此，如上所述的第一个选择步骤可能或必须被重复 1 或更多次，以便富集编码目的免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸。为了重复该实施方案的第一个步骤，将如上所述回收到的多核苷酸或多核苷酸池导入宿主细胞群，这些细胞群能表达由文库中的多核苷酸编码的免疫球蛋白分子。这些宿主细胞可以与第一轮选择中使用的细胞类型相同，或者不同，条件是能表达所述免疫球蛋白分子。将第二多核苷酸文库也导入这些宿主细胞，使免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段在所述宿主细胞的细胞膜表面或细胞培养基内进行表达。类似地，将细胞或条件培养基与抗原进行接触，或者在功能性测定方法中检测该培养基，再次从表达与抗原特异结合和/或具有所需功能特性的免疫球蛋白分子的那些细胞或者宿主细胞集中回收第一文库的多核苷酸。可以将这些步骤重复一或多次，使来自第一文库的多核苷酸得以富集，所述多核苷酸编码免疫球蛋白亚基多肽，它是能特异结合抗原和/或具有所需功能特性的免疫球蛋白分子的一部分，或其抗原特异性片段。

如上所述将来自第一文库的目的多核苷酸进行适当的富集之后，这些被回收的多核苷酸即是“分离的”，即它们基本上从其天然环境中脱离，大部分与文库中不编码抗原特异性免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸分离开了。例如，就本发明的目的而言，包含在载体中的克隆多核苷酸被认为是分离的。应当理解的是，通过文中描述的方法，可

以回收到能特异结合相同抗原的两种或多种不同免疫球蛋白亚基多肽。相应的，编码与相同抗原结合的多肽的多核苷酸混合物也被认为是“分离的”。分离的多核苷酸的其他例子包括那些保持在异源宿主细胞中的或溶液中的（部分或基本上）纯化的DNA分子。但是就本发明的目的而言，包含在这样的克隆中的多核苷酸不是“分离的”，这些克隆是混合文库的成员，并且没有例如由于编码抗原特异性免疫球蛋白亚基多肽而与文库中的其他克隆分离开。例如，包含在病毒载体中的多核苷酸在回收并进行噬菌斑纯化后是“分离的”，包含在质粒载体中的多核苷酸在从单个细菌菌落中扩增后是“分离的”。

已知一种抗原可包含两个或更多表位，任何一个表位可能结合几种不同的免疫球蛋白分子，因此预期由该实施方案的第一步可以回收到几个合适的多核苷酸，例如2个，3个，4个，5个，10个，100或更多个均编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸，所述亚基多肽在与第二文库的多核苷酸所编码的合适的免疫球蛋白亚基多肽结合时，能够形成与目的抗原特异结合的免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段。预期从第一文库中回收的每个不同多核苷酸能被单独地分离出来。但是，这些多核苷酸可能作为编码具有相同抗原特异性的多肽的一群多核苷酸而被分离出来，这些多核苷酸可能是一起“分离的”。这类多核苷酸混合物，无论是单独分离的或共同分离的，可以象下面解释的那样，单独或者与2个，3个，4个，5个，10个，100个或更多个多核苷酸池一起在第二步中导入宿主细胞。

一旦从第一文库中分离到一或多个合适的多核苷酸，在该实施方案的第二步中，鉴定一或多个多核苷酸，它们编码的免疫球蛋白亚基多肽与分离自第一文库的多核苷酸所编码的免疫球蛋白亚基多肽能够联合形成可特异结合目的抗原或具有所需功能特性的免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段。

相应的，第二步包括将编码第二免疫球蛋白亚基多肽的第二多核苷酸文库导入能表达免疫球蛋白分子的宿主细胞群，向相同的宿主细胞群导入至少一个如上所述分离自第一文库的多核苷酸，使在所述宿

主细胞表面表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段，或者完全分泌到细胞培养基内，将这些宿主细胞或宿主细胞生长的条件培养基与目的特异抗原进行接触，或者对条件培养基进行功能检测，然后从那些可结合目的抗原的宿主细胞或者在显示所需活性的培养基中生长的宿主细胞内回收第二文库的多核苷酸。因此第二步与第一步非常类似，只是第二文库的多核苷酸所编码的第二免疫球蛋白亚基多肽与那些分离自第一文库的多核苷酸在宿主细胞内结合。正如上面提到的，可以使用分离自第一文库的单个克隆多核苷酸，或者可同时导入分离自第一文库的几种多核苷酸的池。与上面描述的第一步相同，进行一或几轮富集，即对逐渐缩小的池进行选择或筛选，从而使第二文库中编码第二免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸得以富集，所述第二免疫球蛋白亚基多肽是能够特异结合目的抗原或显示所需功能特性的免疫球蛋白分子的一部分。同样与第一步相同，从第二文库中分离一或多个所需多核苷酸。如果在第二步较早的几轮富集中使用了分离多核苷酸池，优选在随后的富集步骤中利用分离自第一文库的更小的多核苷酸池，或者更优选利用分离自第一文库的单个克隆多核苷酸。对于任何分离自第一文库并用于第二文库多核苷酸的选择过程的单个多核苷酸，有可能从第二文库中分离到几个（即 2, 3, 4, 5, 10, 100 或更多个）编码第二免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸，所述第二免疫球蛋白亚基多肽能与分离自第一文库的多核苷酸所编码的第一免疫球蛋白亚基多肽联合形成可特异结合目的抗原或者显示所需功能特性的免疫球蛋白分子，或其抗原结合片段。

对于编码单链片段的文库的选择/筛选方法只需要一个文库，而不是第一和第二文库，并且只需要 1 个选择/筛选步骤。与免疫球蛋白的两步法任何一步类似，这种一步选择/筛选法中进行两轮或更多轮富集也可能更有利。

载体。在真核细胞中构建抗体文库时，可以使用任何能在真核细胞内进行表达的常规载体。例如，可以在病毒、质粒、噬菌体或噬菌粒载体中构建文库，只要所选的具体载体包含能在真核细胞内发挥作

用的转录和翻译调控区。但是，优选在真核病毒载体中构建如上所述的抗体库。

真核病毒载体可以是任何类型，例如动物病毒载体或植物病毒载体。病毒载体的天然基因组可以是正链、负链或者双链 RNA，或者 DNA，并且天然基因组可以是环形或线性。对于动物病毒载体，包括那些感染无脊椎动物（例如昆虫，原生动物或者蠕虫寄生虫）或者脊椎动物（例如哺乳动物，鸟，鱼，爬行动物和两栖动物）的病毒载体。选择病毒载体只受到最大插入片段和蛋白质表达水平的限制。合适的病毒载体是那些感染酵母和其他真菌细胞，昆虫细胞，原生动物细胞，植物细胞，鸟细胞，鱼细胞，爬行动物细胞，两栖动物细胞或者哺乳动物细胞的病毒载体，特别优选哺乳动物病毒载体。任何常规病毒载体都可以用于本发明，包括但不限于痘病毒载体（例如痘苗病毒），疱疹病毒载体（例如单纯疱疹病毒），腺病毒载体，杆状病毒载体，逆转录病毒载体，微小 RNA 病毒载体（例如脊髓灰质炎病毒），甲病毒载体（例如新培斯病毒）和肠道病毒（例如门戈病毒(mengovirus)）。优选 DNA 病毒载体，例如痘病毒，疱疹病毒，杆状病毒和腺病毒。正如以下详细描述，特别优选痘病毒，尤其是正痘病毒，特别是痘苗病毒。在一个优选实施方案中，使用能产生任何所选病毒载体的感染性病毒颗粒的宿主细胞。许多常规病毒载体，比如痘苗病毒，有非常宽的宿主范围，因此能使用许多不同的宿主细胞。

正如上面提到的，可以在相同或不同载体中构建本发明的第一和第二文库。但是，在优选实施方案中，第一和第二文库被制备成能方便地回收第一文库和第二文库的多核苷酸，例如在第一步中将第一文库的多核苷酸方便地与第二文库的多核苷酸分离开，在第二步中方便地从第一文库的多核苷酸中回收第二文库的多核苷酸。例如，在第一步中，如果在病毒载体中构建第一文库，第二文库构建在质粒载体中，可以很容易地以感染性病毒颗粒的形式回收第一文库的多核苷酸，而剩下第二文库的多核苷酸与细胞残骸。类似的，在第二步，如果第二文库构建在病毒载体中，而第一步中分离到的第一文库的多核

核苷酸被导入质粒载体，则可以容易地回收到含有第二文库多核苷酸的感染性病毒颗粒。

当第二多核苷酸文库或者分离自第一文库的多核苷酸在质粒载体中被导入宿主细胞内，则优选该质粒载体中包含的多核苷酸所编码的免疫球蛋白亚基多肽可操纵地连接了转录调控区，所述调控区由含有其他文库的病毒载体所编码的蛋白质驱动。例如，如果在痘病毒载体中构建第一文库，在质粒载体中构建第二文库，优选构建在质粒文库中的编码第二免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸可操纵地连接能在痘病毒感染细胞的细胞质内发挥作用的转录调控区，优选启动子。类似地，在第二步中，如果需要将分离自第一文库的多核苷酸插入质粒载体，在痘病毒载体中构建第二文库，则优选分离自第一文库并插入到质粒中的多核苷酸可操纵地连接能在痘病毒感染的细胞的细胞质内发挥作用的转录调控区，优选启动子。文中公开了这类转录调控区的合适和优选的例子。这样，第二文库的多核苷酸仅在某些感染了痘病毒的细胞内表达。

然而，如果能在一个病毒载体中维持第一和第二文库，以及分离自第一文库的那些多核苷酸，而不必将1个或这两个文库维持在两种不同的载体系统中，将是很方便的。因此，本发明中，可以对维持在病毒载体中的第一或第二文库样品灭活，从而使病毒载体感染细胞，病毒载体的基因组被转录，但载体不复制，即当所述病毒载体导入细胞时，该病毒基因组携带的基因产物，例如免疫球蛋白亚基多肽得到表达，但不产生感染性病毒颗粒。

在一个优选方面，通过用4'-氨基甲基-三甲沙林(补骨脂素)处理构建在病毒载体中的文库样品，然后将病毒载体暴露于紫外线(UV)，来使构建在真核病毒载体内的第一或第二文库失活。补骨脂素和UV灭活病毒是本领域普通技术人员所熟知的。参见，例如Tsung, K.等, *J. Virol.* 70:165-171(1996)，该文全文引入作为参考。

补骨脂素处理通常包括将病毒载体的无细胞样品与浓度在大约0.1 μg/ml 到大约20 μg/ml 的补骨脂素温育，优选补骨脂素的浓度

为大约 $1\ \mu\text{g/ml}$ 到大约 $17.5\ \mu\text{g/ml}$, 大约 $2.5\ \mu\text{g/ml}$ 到大约 $15\ \mu\text{g/ml}$, 大约 $5\ \mu\text{g/ml}$ 到大约 $12.5\ \mu\text{g/ml}$, 大约 $7.5\ \mu\text{g/ml}$ 到大约 $12.5\ \mu\text{g/ml}$, 或者大约 $9\ \mu\text{g/ml}$ 到大约 $11\ \mu\text{g/ml}$ 。因此, 补骨脂素的浓度可以是大约 $0.1\ \mu\text{g/ml}$, $0.5\ \mu\text{g/ml}$, $1\ \mu\text{g/ml}$, $2\ \mu\text{g/ml}$, $3\ \mu\text{g/ml}$, $4\ \mu\text{g/ml}$, $5\ \mu\text{g/ml}$, $6\ \mu\text{g/ml}$, $7\ \mu\text{g/ml}$, $8\ \mu\text{g/ml}$, $9\ \mu\text{g/ml}$, $10\ \mu\text{g/ml}$, $11\ \mu\text{g/ml}$, $12\ \mu\text{g/ml}$, $13\ \mu\text{g/ml}$, $14\ \mu\text{g/ml}$, $15\ \mu\text{g/ml}$, $16\ \mu\text{g/ml}$, $17\ \mu\text{g/ml}$, $18\ \mu\text{g/ml}$, $19\ \mu\text{g/ml}$, 或 $20\ \mu\text{g/ml}$ 。优选, 补骨脂素的浓度是大约 $10\ \mu\text{g/ml}$ 。用在此处, 术语“大约”考虑到时间, 化学物质浓度, 温度, pH 和其他通常在实验室或工厂的因素很难准确, 可能根据测量的类型和用于测量的设备而在一定数量内变化。

通常在 UV 照射前将与补骨脂素的温育进行一段时间。时间段优选在 UV 照射前大约 1 分钟到大约 20 分钟。优选, 时间段在大约 2 分钟到大约 19 分钟内变化, 从大约 3 分钟到大约 18 分钟, 从大约 4 分钟到大约 17 分钟, 从大约 5 分钟到大约 16 分钟, 从大约 6 分钟到大约 15 分钟, 从大约 7 分钟到大约 14 分钟, 从大约 8 分钟到大约 13 分钟, 或者从大约 9 分钟到大约 12 分钟。因此, 温育时间可以是大约 1 分钟, 大约 2 分钟, 大约 3 分钟, 大约 4 分钟, 大约 5 分钟, 大约 6 分钟, 大约 7 分钟, 大约 8 分钟, 大约 9 分钟, 大约 10 分钟, 大约 11 分钟, 大约 12 分钟, 大约 13 分钟, 大约 14 分钟, 大约 15 分钟, 大约 16 分钟, 大约 17 分钟, 大约 18 分钟, 大约 19 分钟, 或者大约 20 分钟。更优选, 在 UV 照射前进行 10 分钟温育。

然后将经补骨脂素处理过的病毒暴露于 UV 光线。UV 可以是任何波长, 但优选长波 UV 光, 例如大约 365nm。暴露于 UV 要进行大约 0.1 分钟到大约 20 分钟的时间范围。优选, 时间范围在大约 0.2 到大约 19 分钟, 大约 0.3 到大约 18 分钟, 大约 0.4 到大约 17 分钟, 大约 0.5 到大约 16 分钟, 大约 0.6 到大约 15 分钟, 大约 0.7 到大约 14 分钟, 大约 0.8 到大约 13 分钟, 大约 0.9 到大约 12 分钟, 大约 1 到大约 11 分钟, 大约 2 到大约 10 分钟, 大约 2.5 到大约 9 分钟, 大约 3 到大约 8 分钟, 大约 4 到大约 7 分钟, 或者大约 4.5 到大约 6 分

钟。因此，温育时间可以是大约 0.1，大约 0.5，大约 1，大约 2，大约 3，大约 4，大约 5，大约 6，大约 7，大约 8，大约 9，大约 10，大约 11，大约 12，大约 13，大约 14，大约 15，大约 16，大约 17，大约 18，大约 19，或者大约 20 分钟。更优选，将病毒载体暴露于 UV 光大约 5 分钟。

在真核细胞中由编码免疫球蛋白亚基多肽的两个多核苷酸文库装配并表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的能力，比在细菌系统中生产单链抗体的方法有了显著的提高，因为两步选择过程可以作为选择具有各种特异性的免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的基础。

以下的实施例提供了具体实施方案的例子，它们进一步阐明但不限制本实施方案。正如前面详细描述，分两个阶段完成对特定免疫球蛋白亚基多肽，例如免疫球蛋白重链和轻链的选择。首先，在真核病毒载体（例如痘病毒载体）中构建来自天然或经免疫供体的免疫球蛋白产生细胞的多样化重链文库；类似的多样化免疫球蛋白轻链文库构建在质粒载体中，其中重组基因的表达受到病毒启动子的调控，或者构建在已通过例如补骨脂素和 UV 处理灭活的真核病毒载体中。用感染复数大约 1（MOI=1）的编码重链文库的病毒载体感染能表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的宿主细胞。“感染复数”指可感染每个宿主细胞的病毒颗粒的平均数。例如，如果需要 MOI 是 1 的感染，即每个细胞平均被 1 个病毒颗粒感染，就将用于感染的感染性病毒颗粒的数目调整到等于待感染细胞的数目。

按照这个策略，在使得每个细胞能摄取并表达平均 10 个或更多个编码轻链多肽的多核苷酸条件下，用轻链质粒文库转染宿主细胞，或者用灭活的轻链病毒文库感染宿主细胞。在这样的条件下，单独一个宿主细胞可以表达多种免疫球蛋白分子或其片段，每个宿主细胞中不同轻链与相同的重链构成特征性的 H_2L_2 结构。

本领域的普通技术人员会理解，要控制细胞所摄取的质粒数是困难的，因为成功的转染依赖于在细胞中诱导感受态，而这不是统一的，可能导致摄取不同量的 DNA。因此，在需要仔细控制每个感染宿主细胞中导入的第二文库的多核苷酸数目的那些实施方案中，优选使

用灭活病毒载体，因为此时病毒的感染复数更容易控制。

在单个宿主细胞内表达多种轻链，联合一个重链，有降低特异抗原免疫球蛋白的亲合力（“avidity”）的效果，但对于选择较高亲合力（“affinity”）的结合位点有益。用在文中，术语“亲合力”是指单个表位结合免疫球蛋白分子 CDR 的强度的衡量标准。参见例如 Harlow 27-28 页。用在文中，术语“亲和性”指免疫球蛋白群与抗原形成的复合物的总的稳定性，就是免疫球蛋白混合物与抗原的功能性结合强度。参见例如 Harlow 29-34 页。“亲和性”与群体中的单个免疫球蛋白分子与特定表位的亲和力有关，也和免疫球蛋白及该抗原的效价有关。例如，二价单克隆抗体和一个有高度重复表位结构的抗原（比如多聚体）之间的相互作用，就具备高亲和性。本领域普通技术人员都能理解，如果宿主细胞在其表面表达免疫球蛋白分子，每个都包含特定重链，但表面上的不同免疫球蛋白分子包含不同轻链，则该宿主细胞对给定抗原的“亲和性”就会下降。然而，回收这样一群免疫球蛋白分子的可能性却提高了，这些免疫球蛋白分子的相关性在于包含共同的重链，但通过与不同轻链联合，它们能和特定抗原以一定范围的亲合力反应。相应地，通过调整不同轻链或其片段（它们能够在给定宿主细胞内与一定数量的重链或其片段联合）的数目，本发明提供了一种选择和富集具有各种亲合力水平的免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的方法。

在如上所述的选择免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的方法的第一步中利用该策略时，优选在真核病毒载体中构建第一文库，用 MOI 在大约 1 到 10（优选大约 1）的第一文库感染宿主细胞，在允许每个被感染宿主细胞摄取多达 20 个第二文库的多核苷酸的条件导入第二文库。例如，如果第二文库构建在灭活病毒载体中，用 MOI 在大约 1 到 20 的第二文库感染宿主细胞，虽然根据使用的病毒载体和目的免疫球蛋白分子的特性不同，可能需要高于或低于这个范围的 MOI。如果第二文库构建在质粒载体中，则调节转染条件使 0 到 20 个质粒进入每个宿主细胞。通过增加或减少允许进入每个被感染细胞的

第二文库多核苷酸的平均数目，来控制选择对抗原有较高或较低的亲合反应。

更优选，当第一文库构建在病毒载体中，用 MOI 在大约 1-9，大约 1-8，大约 1-7，大约 1-6，大约 1-5，大约 1-4，或大约 1-2 的第一文库感染宿主细胞。换句话说，宿主细胞以 MOI 大约 10，大约 9，大约 8，大约 7，大约 6，大约 5，大约 4，大约 3，大约 2 或大约 1 被第一文库感染。最优选，用 MOI 为大约 1 的第一文库感染宿主细胞。

当第二文库构建在质粒载体中时，优选在允许每个被感染宿主细胞能摄取多达大约 19 个，大约 18 个，大约 17 个，大约 16 个，大约 15 个，大约 14 个，大约 13 个，大约 12 个，大约 10 个，大约 9 个，大约 8 个，大约 7 个，大约 6 个，大约 5 个，大约 4 个，大约 3 个，大约 2 个或大约 1 个第二文库多核苷酸的情况下，将质粒载体导入宿主细胞。最优选，当第二文库构建在质粒载体中时，在允许每个被感染宿主细胞能摄取多达大约 10 个第二文库多核苷酸的情况下，将质粒载体导入宿主细胞。

类似的，当第二文库构建在灭活的病毒载体中时，更优选以 MOI 大约 1-19，大约 2-18，大约 3-17，大约 4-16，大约 5-15，大约 6-14，大约 7-13，大约 8-12 或大约 9-11 将第二文库导入宿主细胞。换句话说，宿主细胞被 MOI 为大约 20，大约 19，大约 18，大约 17，大约 16，大约 15，大约 14，大约 13，大约 12，大约 11，大约 10，大约 9，大约 8，大约 7，大约 6，大约 5，大约 4，大约 3，大约 2，或大约 1 的第二文库感染。在一个最优选的方面，以 MOI 为大约 10 用第二文库感染宿主细胞。本领域普通技术人员能够理解，灭活病毒的滴度以及“MOI”无法直接测量，但是可以从开始的感染性病毒储液（它们随后被灭活）的滴度推测出该滴度。

在本发明一个最优选的方面，第一文库构建在病毒载体中，第二文库构建在已经灭活的病毒载体中，用 MOI 为大约 1 的第一文库感染宿主细胞，MOI 为大约 10 的第二文库感染宿主细胞。

本发明中，优选的病毒载体衍生自痘病毒，例如痘苗病毒。如果编码第一免疫球蛋白亚基多肽的第一文库构建在痘病毒载体中，由构建在质粒载体或灭活病毒载体中的第二文库编码的第二免疫球蛋白亚基多肽的表达受到痘病毒启动子的调控，则第二免疫球蛋白亚基多肽在痘病毒感染的细胞的细胞质中得到高水平表达，无需核整合。

在如上所述的选择免疫球蛋白的第二步中，优选将第二文库构建在感染性真核病毒载体中，用 MOI 为大约 1 到 10 的第二文库感染宿主细胞。更优选，当第二文库构建在病毒载体中，用 MOI 为大约 1-9，大约 1-8，大约 1-7，大约 1-6，大约 1-5，大约 1-4 或大约 1-2 的第二文库感染宿主细胞。换句话说，宿主细胞被 MOI 为大约 10，大约 9，大约 8，大约 7，大约 6，大约 5，大约 4，大约 3，大约 2 或大约 1 的第二文库感染。最优选，用 MOI 为大约 1 的第二文库感染宿主细胞。

在选择免疫球蛋白的第二步，来自第一文库的多核苷酸已被分离。在某些实施方案中，将单个第一文库多核苷酸，即克隆，导入用于分离第二文库多核苷酸的宿主细胞。在这种情况下，将分离自第一文库的多核苷酸在允许每个宿主细胞有至少大约 1 个多核苷酸的条件 下导入宿主细胞。但是因为被导入的来自第一文库的所有多核苷酸都是相同的，即被克隆多核苷酸的拷贝，所以导入任何给定宿主细胞中的多核苷酸的数量不太重要。例如，如果克隆的分离自第一文库的多核苷酸包含在灭活病毒载体中，该载体将以 MOI 为大约 1 被导入，但是 MOI 大于 1 也是可行的。类似地，如果克隆的分离自第一文库的多核苷酸被导入质粒载体，则导入任何给定宿主细胞的质粒的数目不重要，而是应当调节转染条件以确保每个宿主细胞中导入了至少 1 个多核苷酸。如果例如从第一文库中分离到几种不同多核苷酸，可以采用或者实施方案。在该实施方案中，可以将分离自第一文库的两个或更多个不同多核苷酸的池有利地导入感染了第二多核苷酸文库的宿主细胞。这种情况中，如果分离自第一文库的多核苷酸包含在灭活病毒载体中，优选灭活病毒颗粒的 MOI 大于大约 1，例如大约 2，大约 3，

大约 4, 大约 5 或更高; 或者如果分离自第一文库的多核苷酸包含在质粒载体中, 优选允许至少大约 2, 3, 4, 5 或更多个多核苷酸进入每个细胞的条件下。

痘病毒载体。正如上面提到的, 优选用于本发明的病毒载体是痘病毒载体。“痘病毒”包括痘病毒科的所有成员, 包括亚科 Chordopoxviridae (脊椎动物痘病毒) 和 Entomopoxviridae (昆虫痘病毒)。参见, 例如 B. Moss (Virology, 2d Edition, B. N. Fields, D. M. Knipe 等, Eds., Raven Press, 2080 (1990))。脊椎动物痘病毒 (Chordopoxviruses) 包括以下属等: 正痘病毒 (例如痘苗病毒, 天花病毒, 浣熊痘病毒); 禽痘病毒 (例如禽痘病毒); 山羊痘病毒 (例如绵羊痘病毒), 野兔痘病毒 (例如兔子 (Shope) 纤维瘤和黏液瘤); 以及猪痘病毒 (例如猪痘病毒)。昆虫痘病毒包括三个属: A, B 和 C。本发明中, 优选正痘病毒。痘苗病毒是原型正痘病毒, 已经被建立为表达异源蛋白质的载体, 并对它有了很好地特性研究。本发明中, 优选痘苗病毒载体, 尤其是那些被建立来进行三分子重组的痘苗病毒载体。但是, 其他正痘病毒, 尤其是浣熊痘病毒也被开发为载体, 在某些应用中具有更好的特性。

痘病毒的特点在于体积大, 很复杂, 并且含有类似的大而复杂的基因组。值得一提的是, 痘病毒复制完全在宿主细胞的胞质中进行。痘病毒基因组的中央部分都类似, 而末端更多变。因此, 痘病毒基因组的中央部分被认为携带着负责所有痘病毒共有的重要功能的基因, 比如复制。相反, 痘病毒基因组的末端部分似乎负责那些在不同痘病毒之间变化的比如致病性和宿主范围等特征, 并且更可能是病毒在组织培养物中进行复制所不必的。因此推测, 如果欲通过 DNA 片段的重排或去除或者导入外源 DNA 片段而修饰痘病毒基因组, 则天然 DNA 中通常位于远端的那些被重排、去除或者被导入的外源 DNA 打断的部分优选处于更远端区, 因为预计它们对病毒复制以及在组织培养物中感染性毒粒的产生并非必需。

天然痘病毒基因组是交联的双链线性 DNA 分子，有大约 186000 个碱基对，特征在于末端反向重复序列。痘病毒基因组已被全部测序，但多数基因产物的功能还是未知的。Goebel, S. J. 等, *Virology*179:247-266, 517-563(1990) ; Johnson, G. P. 等 , *Virology*196:381-401。在痘病毒基因组中鉴定到大量非必需区。参见例如, Perkus, M. E. 等, *Virology*152:285-97(1986); 以及 Kotwal, G. J. 和 Moss B., *Virology*167:524-37。

在痘病毒载体、尤其是痘病毒载体被用来表达免疫球蛋白亚基多肽的那些实施方案中，可以使用任何合适的痘病毒载体。优选免疫球蛋白亚基多肽文库携带在载体中对于载体的生长和复制并非必需的区域，因此可以产生感染性病毒。虽然许多痘病毒基因组的非必需区已被表征过，最常用于插入外来基因的位点是位于基因组中 HindIII 片段的胸苷激酶位点。在某些优选的痘病毒载体中，tk 位点已被加工成含有 1 或 2 个独特的限制酶位点，使得能方便地使用制备文库的三分子重组法。参见前文以及 Zauderer, PCT 公开号 W000/028016。

将编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸文库插入痘病毒载体，尤其是痘病毒载体中，使之与能在痘病毒感染的细胞的胞质中发挥作用的转录调控区可操纵地连接在一起。

痘病毒转录调控区包含启动子和转录终止信号。痘病毒中的基因表达受到时间调控，早期、中期和晚期基因的启动子具有不同的结构。某些痘病毒基因是组成性表达的，这些“早-晚期”基因的启动子具备杂合的结构。还建立了合成的早-晚期启动子。参见 Hammond J. M. 等, *J. Virol. Methods*66:135-8(1997); Chakrabarti S. 等, *Biotechniques*23:1094-7(1997)。本发明中，可以使用任何痘病毒启动子，但是根据所选的宿主细胞和/或选择方案，可能优选早期、晚期或组成型启动子。通常，优选使用组成型启动子。

早期启动子的例子包括 7.5kD 启动子（也是一个晚期启动子），DNA pol 启动子，tk 启动子，RNA pol 启动子，19-kD 启动子，22-

kD 启动子, 42-kD 启动子, 37-kD 启动子, 87-kD 启动子, H3' 启动子, H6 启动子, D1 启动子, D4 启动子, D5 启动子, D9 启动子, D12 启动子, I3 启动子, M1 启动子和 N2 启动子。参见 Moss, B. “痘病毒及其复制” (Virology, 2d Edition, B. N. Fields, D. M. Knipe 等编, Raven Press, 2088 页 (1990))。在痘病毒和其他痘病毒中转录的早期基因识别转录终止信号 TTTTNT, 其中 N 可以是任何核苷酸。转录通常在这个信号上游大约 50bp 处终止。因此, 如果要从痘病毒早期启动子开始表达异源基因, 必须注意该信号不能存在于这些基因的编码区中。参见例如, Earl, P. L. 等, J. Virol. 64:2448-51 (1990)。

晚期启动子的例子包括 7.5kD 启动子, MIL 启动子, 37-kD 启动子, 11-kD 启动子, 11L 启动子, 12L 启动子, 13L 启动子, 15L 启动子, 17L 启动子, 28-kD 启动子, H1L 启动子, H3L 启动子, H5L 启动子, H6L 启动子, H8L 启动子, D11L 启动子, D12L 启动子, D13L 启动子, A1L 启动子, A2L 启动子, A3L 启动子和 P4b 启动子。参见 Moss, B. “痘病毒及其复制” (Virology, 2d Edition, B. N. Fields, D. M. Knipe 等编, Raven Press, 2090 页 (1990))。晚期启动子显然不识别早期启动子所识别的转录终止信号。

优选用于本发明的组成型启动子包括 Hammond 和 Chakrabarti 描述的合成早-晚期启动子, MH-5 早-晚期启动子, 以及 7.5kD 或 “p7.5” 启动子。文中公开了利用这些启动子的实施例。

以下还将详细讨论, 基于宿主细胞死亡的某些选择和筛选方法要求导致细胞死亡的机制在病毒感染所造成的任何致细胞病变效应 (CPE) 之前发生。在感染病毒的细胞中 CPE 开始的动力学取决于所用的病毒, 感染复数以及宿主细胞的类型。例如, 在许多感染了 MOI 为大约 1 的痘病毒的组织培养物中, CPE 直到大大超过感染后 48 到 72 小时才明显。这使得有 2 到 3 天的时间, 不受载体导致的 CPE 影响来高水平表达免疫球蛋白分子, 以及基于抗原的选择。但是, 对

某些选择方法这个时段可能不够，特别是使用较高 MOI 时，此外，在目的细胞系内 CPE 开始前的时间可能短些。因此，需要有致细胞病变效应减弱的病毒载体，尤其是痘病毒载体（比如痘苗病毒载体），这样在需要时可以延长进行选择的时间段。

例如，某些减毒是通过基因突变实现的。它们可以是完全缺陷的突变体，即需要辅助病毒来产生感染性病毒颗粒，或者它们是条件突变体，例如温度敏感型突变体。尤其优选条件突变体，因为在需要表达宿主基因时，可以将感染病毒的宿主细胞保持在一个非许可环境，例如非许可温度，然后转换成许可环境，例如许可温度，使之产生病毒颗粒。或者，可以利用在感染循环中特定时间可逆阻断病毒复制的化学抑制剂来对完全感染性病毒进行“减毒”。这类化学抑制剂包括，但不限于羟脲和 5-氟脱氧尿苷。在需要表达宿主基因时，将感染病毒的宿主细胞维持在化学抑制剂中，然后去掉化学抑制剂使之产生病毒颗粒。

已经建立了大量的减毒痘病毒，特别是痘苗病毒。例如修饰的痘苗 Ankara (MVA) 是一株高度减毒的痘苗病毒，它来源于在初级鸡胚胎成纤维细胞中经过 570 次传代得到 (Mayr, A. 等, *Infection* 3:6-14 (1975))。回收到的病毒缺失了将近 15% 的野生型痘苗 DNA，这极大地影响了该病毒的宿主范围。MVA 在多数哺乳动物细胞系中不能复制或复制效率非常低。宿主范围限制效应的一个独特性质是在非允许细胞中的阻断发生在复制循环的较晚阶段。病毒晚期基因的表达基本没有受到损害，但毒粒的形态发生被打断了 (Suter, G. 和 Moss, B. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10847-51 (1992); Carroll, M. W. 和 Moss, B. *Virology* 238:198-211 (1997))。即使在非允许宿主细胞内也能高水平合成病毒蛋白质，这使 MVA 成为一个特别安全和高效的表达载体。但是，因为 MVA 在多数哺乳动物细胞内不能完成感染循环，为了回收用于多选择循环的感染性病毒，需要通过共感染或超感染辅助病毒来补偿 MVA 的缺陷，该辅助病毒本身是缺陷的，随后可以通过在 MVA 的允许宿主细胞内以低 MOI 进行差异扩展来将它与感染性

MVA 重组体分开。

痘病毒感染对宿主细胞的蛋白质和 RNA 合成有明显的抑制效应。这些对宿主基因表达的影响在某些情况下可能干扰对那些对宿主细胞有特定生理作用的具体痘病毒重组体的选择。某些关键早期基因缺陷的痘病毒株显示出对宿主细胞蛋白质合成的抑制作用大大降低。缺少特定关键早期基因的减毒痘病毒也有描述。参见例如 Falkner 等的美国专利 5766882 和 5770212。可以被造成缺陷的关键早期基因的例子包括，但不限于痘病毒 17L, F18R, D13L, D6R, A8L, J1R, E7L, F11L, E4L, I1L, J3R, J4R, H7R 和 A6R 基因。优选进行缺陷处理的关键早期基因是编码尿嘧啶 DNA 糖基化酶的 D4R 基因。特定关键基因发生缺陷的痘病毒很容易在能提供该关键基因产物的补偿细胞系内进行增殖。

用在文中，术语“补偿作用”是指由另外的来源，比如宿主细胞，转基因动物或辅助病毒来反式恢复丧失的功能。所述功能的丧失是由缺陷病毒丢失负责该功能的基因产物造成的。因此，缺陷痘病毒是亲代痘病毒的无活力形式，能在补偿作用存在的条件下变成有活力。所述宿主细胞、转基因动物或辅助病毒含有编码丢失的基因产物的序列，或“补偿元件”。该补偿元件应当是可表达的，能稳定地整合到宿主细胞、转基因动物或辅助病毒内，并且优选不与或只有很小的危险与缺陷痘病毒的基因组进行重组。

补偿细胞系内产生的病毒能够感染非补偿细胞，还能高水平表达早期基因产物。但是，在没有该关键基因产物的情况下，宿主关闭、DNA 复制、感染性病毒颗粒的包装和产生不会发生。

在文中描述的特别优选的实施方案中，通过将补偿元件的诱导表达与目标基因产物的表达耦联在一起来对构建在痘病毒中的复杂文库所表达的目标基因产物进行选择。因为补偿元件仅在表达所需基因产物的那些宿主细胞内表达，只有这些宿主细胞能产生可以被容易地回收的感染性病毒。

与痘病毒有关的优选实施方案可以以对本领域普通技术人员显

而易见的方式进行改变来使用任何痘病毒载体。在直接选择法中，可以使用痘病毒或痘苗病毒之外的载体。

三分子重组法。传统上，没有人用痘病毒载体比如痘苗病毒从复杂文库中鉴定先前未知的目标基因，因为并没有用于痘苗的高效、高滴度文库构建和筛选方法。在痘苗病毒中进行异源蛋白质表达的常规方法包括体内同源重组和体外直接连接。利用同源重组，重组体病毒产率在大约 0.1%或更低。尽管利用直接连接法的重组体病毒产率更高，得到的滴度却比较低。因此，痘苗病毒载体的使用局限在对以前分离的 DNA 进行克隆以进行蛋白质表达和开发疫苗。

三分子重组，正如在 PCT 公开文本 W000/028016 (Zauderer) 中公开的，是一种用于在痘苗病毒中进行克隆的新的、高效、高滴度生产方法。利用三分子重组法，本发明人达到了至少 90%的重组体病毒产率，滴度比直接连接法得到的至少高 2 个数量级。

因此，在一个优选的实施方案中，通过三分子重组，在痘病毒、优选痘苗病毒载体中构建能表达免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸文库。

“三分子重组”或“三分子重组法”是指这样一种方法，该方法通过将病毒基因组的两个非同源片段和含有插入 DNA 的转移载体或者转移 DNA 导入受体细胞，允许三个 DNA 分子在体内进行重组，由此制备包含异源插入 DNA 的病毒基因组，优选痘病毒基因组，更优选痘苗病毒基因组。重组的结果是产生了包含该两个基因组片段和插入 DNA 的有活力的病毒基因组分子。因此，应用于本发明的三分子重组法包括：(a) 切割分离的病毒基因组，优选 DNA 病毒基因组，更优选线性 DNA 病毒基因组，更优选痘病毒或痘苗病毒基因组，从而产生第一病毒片段和第二病毒片段，其中所述第一病毒片段与第二病毒片段没有同源性；(b) 提供转移质粒群，这些质粒包含编码免疫球蛋白亚基多肽（例如免疫球蛋白轻链、免疫球蛋白重链或它们的抗原特异性片段）的多核苷酸，它与转录调控区可操纵地连接在一起，侧接 5' 旁侧区和 3' 旁侧区，其中所述 5' 旁侧区与 (a) 中描述的第一病毒片段

同源，3'旁侧区与(a)中描述的第二病毒片段同源；并且所述转移质粒能够与第一和第二病毒片段进行同源重组，从而形成活的病毒基因组；(c)将(b)中描述的转移质粒以及(a)中描述的第一和第二病毒片段，在该转移质粒与病毒片段能进行体内同源重组(即，三分子重组)的条件下导入宿主细胞，从而产生含有编码免疫球蛋白亚基多肽之多核苷酸的被修饰的活病毒基因组；以及(d)回收由该技术制备的被修饰的病毒基因组。优选，回收到的被修饰的病毒基因组包装在感染性病毒颗粒中。

“重组效率”或“重组体病毒的产率”是指在制备本发明的病毒文库过程中，重组体病毒与产生的病毒总量的比率。如实施例5所示，可以通过用重组体病毒的滴度除以总病毒滴度并乘以100%来计算这个效率。例如，滴度是通过检测原病毒储液在合适的细胞上，有选择情况下(例如重组体病毒)和没有选择情况下(例如重组体病毒加上野生型病毒)的噬斑来确定的。选择的方法，尤其是如果异源多核苷酸被插在病毒胸苷激酶(tk)位点内时，是本领域熟知的，包括利用由于tk基因被打断造成的对溴脱氧尿苷(BDUR)或其他核苷酸类似物的抗性。文中描述了选择方法的例子。

“高效重组”是指重组效率至少为1%，更优选重组效率至少大约2%，2.5%，3%，3.5%，4%，5%，10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，75%，80%，85%，90%，95%或者99%。

许多选择系统都可以使用，包括但不限于胸苷激酶，比如单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等,1977,Cell 11:223)，次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska&Szybalski,1962,Proc.Natl.Acad.Sci.USA48:2026)和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy等,1980,Cell 22:817)基因，可以分别在 tk^- 、 $hgprt^-$ 、 $aprt^-$ 细胞中应用这些基因。同样，可以以抗代谢物抗性为基础对下列基因进行选择：赋予对氨甲蝶呤抗性的 $dhfr$ (Wigler等,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA77:3567;O'Hare等,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA78:1527)；赋予对霉酚酸抗性的 gpt (Mulligan&Berg,1981,1981,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA78: 2072)；赋予对氨基糖苷抗性的 neo (Colberre-Garapin 等, 1981, J. Mol. Biol. 150:1)；以及赋予对潮霉素抗性的 hygro (Santerre 等, 1984, Gene30:147)。

总之，如上所述第一和第二病毒片段或病毒基因组“臂”优选含有所有病毒复制和产生感染性病毒颗粒所必需的基因。文中公开了合适的臂的例子以及利用痘苗病毒载体产生它们的方法。关于痘苗复制必需区域的指导可参考 Falkner 等的美国专利 5770212。

但是，裸露的痘病毒基因组 DNA，比如痘苗病毒基因组，在没有与进来的病毒颗粒相关的病毒所编码蛋白质/功能时就不能产生感染性后代。所需的病毒编码的功能，包括 RNA 聚合酶，它能识别所转染的痘苗 DNA 作为模板，起始转录以及最后所转染 DNA 的复制。参见 Dorner 等的美国专利 5445953。

因此，为了利用痘病毒（比如痘苗病毒）通过三分子重组产生感染性后代病毒，受体细胞优选含有包装功能。该包装功能可以由辅助病毒提供，即与所转染的裸露基因组 DNA 一起，可以提供后代病毒的复制和装配所必需的适当蛋白质和因子的病毒。

辅助病毒可以是密切相关的病毒，例如与痘苗属于相同亚科的痘病毒，可以来自相同或不同属。这种情况中，选择能提供 RNA 聚合酶的辅助病毒是有益的，所述 RNA 聚合酶能识别所转染的 DNA 作为模板，起始转录以及最后所转染 DNA 的复制。如果用非常相关的病毒作为辅助病毒，对它进行减毒从而损害感染性病毒的形成是有益的。例如，可以在非允许温度使用温度敏感型辅助病毒。优选，使用异源辅助病毒。这类例子包括，但不限于禽痘病毒 (avipox) 比如禽痘病毒 (fowlpox)，或者缺肢病毒 (鼠痘) 病毒。特别优选禽痘病毒，因为它们能提供必需的辅助功能，但不会在哺乳动物细胞内复制或者产生感染性毒粒 (Scheiflinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:9977-9981(1992))。使用异源病毒可以减少辅助病毒基因组和所感染基因组之间的重组，这种重组在一个细胞内存在非常相近的病毒的同源序列时是会发生的。参见 Fenner&

Comben, *Virology*5:530(1958);Fenner,*Virology*8:499(1959)。

或者，可以由遗传元件而非辅助病毒来提供受体细胞的必需辅助功能。例如，可以转化宿主细胞来组成性地产生辅助功能，或者用表达辅助功能的质粒暂时转染宿主细胞，用表达辅助功能的逆转录病毒感染宿主细胞，或者由任何其他适合表达所需辅助病毒功能的表达载体来提供。参见 Corner 等的美国专利 5445953。

根据三分子重组法，第一和第二病毒基因组片段不能相互连接或重组，即它们不含相容的粘末端或同源区域，或者，粘末端已经被去磷酸化酶处理过。在优选实施方案中，病毒基因组包含第一限制性内切酶的第一识别位点和第二限制性内切酶的第二识别位点，所述第一和第二病毒片段是通过用合适的产生病毒“臂”的限制性内切酶消化病毒基因组产生的，并且通过常规方法分离该第一和第二病毒片段。理想的情况是，第一和第二限制性内切酶识别位点在病毒基因组中是唯一的，或者，用两种限制性内切酶进行切割产生包含所有关键功能的基因的病毒“臂”，即第一和第二识别位点在病毒基因组中物理安排成延伸在第一和第二病毒片段之间的区域对病毒的感染性不是必需的。

在一个将痘苗病毒载体用于三分子重组法的优选实施方案中，使用了含有在 tk 基因中有两个独特限制位点的病毒基因组的痘苗病毒载体。在某些优选的痘苗病毒基因组中，所述第一限制酶是 NotI，它的识别位点是 tk 基因中的 GCGCCCGC，第二限制酶是 ApaI，它的识别位点是 tk 基因中的 GGGCCC。更优选的是包含 v7.5/tk 病毒基因组或 vEL/tk 病毒基因组的痘苗病毒载体。

根据该实施方案，使用了这样一个转移质粒，它具有能与痘苗病毒基因组中含有胸苷激酶基因的区域进行同源重组的侧翼区。可很方便地使用痘苗病毒基因组中含有 HindIII-J 片段的一个片段，所述 HindIII-J 片段含有 tk 基因。

当所述病毒载体是痘病毒时，优选插入的多核苷酸可操纵地连接了痘病毒表达调控序列，更优选连接了强组成型痘病毒启动子，比如

p7.5 或合成早期/晚期启动子。

相应地，本发明的转移质粒包含编码免疫球蛋白亚基多肽（例如重链和免疫球蛋白轻链，或者重链或轻链的抗原特异性片段）的多核苷酸，其可操纵地连接了痘病毒 p7.5 启动子，或者合成早期/晚期启动子。

本发明一个优选的转移质粒是 pVHE，其含有可操纵地连接了痘病毒 p7.5 启动子的编码免疫球蛋白重链多肽的多核苷酸，它包含序列：

```

GGCCAAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGCGGCCGCAAACCATGGGATGGAGCTG
TATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGCGCGCATATGGTCACCGTCTCCTCAGGGAG
TGCATCCGCCCCAACCCTTTTCCTCCCTCGTCTCCTGTGAGAATTCCCCGTCCGATACGAGCAG
CGTGGCCGTTGGCTGCCTCGCACAGGACTTCCCTCCCGACTCCATCACTTTCTCCTGGAAATA
CAAGAACAACCTCTGACATCAGCAGCACCCGGGGCTTCCCATCAGTCTTGAGAGGGGGCAAGTA
CGCAGCCACCTCACAGGTGCTGCTGCCTTCCAAGGACGTCATGCAGGGCACAGACGAACACGT
GGTGTGCAAAGTCCAGCACCCCAACGGCAACAAAGAAAAGAACGTGCCTCTTCCAGTGATTCG
TGAGCTGCCTCCCAAAGTGAGCGTCTTCGTCCACCCCGCGACGGCTTCTTCGGCAACCCCCG
CAGCAAGTCCAAGCTCATCTGCCAGGCCACGGGTTTCAGTCCCCGGCAGATTCAGGTGTCTTG
GCTGCGCAGGGGAAGCAGGTGGGGTCTGGCGTACCACGGACCAGGTGCAGGCTGAGGGCAA
AGAGTCTGGGCCCACGACCTACAAGGTGACTAGCACACTGACCATCAAAGAGAGCGACTGGCT
CAGCCAGAGCATGTTCACTGCCGCGTGGATCACAGGGGCTGACCTTCCAGCAGAATGCGTC
CTCCATGTGTGTCCTCCGATCAAGACACAGCCATCCGGGTCTTCGCCATCCCCCATCCTTTGC
CAGCATCTTCTCACCAAGTCCACCAAGTTGACCTGCCTGGTCCAGACCTGACCACCTATGA
CAGCGTGACCATCTCCTGGACCCGCCAGAATGGCGAAGCTGTGAAAACCCACACCAACATCTC
CGAGAGCCACCCCAATGCCACTTTCAGCGCCGTGGGTGAGGCCAGCATCTGCGAGGATGACTG
GAATTCCGGGGAGAGGTTACGTGCACCGTGACCCACACAGACCTGCCCTCGCCACTGAAGCA
GACCATCTCCCGGCCAAGGGGGTGGCCCTGCACAGGCCCGATGTCTACTTGTGTCACCAGC
CCGGGAGCAGCTGAACCTGCGGGAGTCCGCCACCATCACGTGCCTGGTGACGGGCTTCTCTCC
CGCGGACGTCTTCTGTGAGTGGATGCAGAGGGGGCAGCCCTTGTCCCGGAGAAGTATGTGAC
CAGCGCCCCAATGCCTGAGCCCCAGGCCCCAGGCCGTTACTTCGCCACAGCATCCTGACCGT
GTCCGAAGAGGAATGGAACACGGGGGAGACCTACACCTGCGTGGTGGCCATGAGGCCCTGCC
CAACAGGGTCACTGAGAGGACCGTGGACAAGTCCACCGAGGGGGAGGTGAGCGCCGACGAGGA
GGGCTTTGAGAACCCTGTGGGCCACCGCTCCACCTTCATCGTCTCCTCCTCCTGAGCCTCTT
CTACAGTACCACCGTCACCTTGTCAAGGTGAAATGAGTCGAC

```

文中命名为 SEQ ID NO: 14。可以将 PCR 扩增的重链可变区符合读框地插入序列中以粗体字显示的 BssHII (SEQ ID NO: 15 的核苷酸 96-100) 和 BstEII (SEQ ID NO: 16 的核苷酸 106-112) 单酶切位点。

此外, pVHE 可以用于这样一些实施方案, 即如上所述需要将分离自第一文库的多核苷酸转移到质粒载体中以便随后选择第二文库的多核苷酸。

本发明另一个优选转移质粒是 pVKE, 它包含可操纵地连接了痘病毒 p7.5 启动子的编码免疫球蛋白 kappa 轻链多肽的多核苷酸, 其含有序列:

```
GGCCAAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGCGGCCGCCCATGGGATGGAGCTGTAT
CATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGCGTGCACTTGACTCGAGATCAAACGAACTGTGG
CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTG
TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACG
CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCG
AAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGG
TCGAC
```

文中命名为 SEQ ID NO: 17。可以将 PCR 扩增的 kappa 轻链可变区符合读框地插入序列中以粗体字显示的 ApaLI (SEQ ID NO: 18 的核苷酸 95-100) 和 XhoI (SEQ ID NO: 19 的核苷酸 105-110) 单酶切位点。

此外, pVKE 可以用于这样一些实施方案, 即如上所述需要在选择第一文库的多核苷酸的过程中有存在于质粒载体中的第二文库的多核苷酸。

本发明另一个优选的转移质粒是 pVLE, 它包含可操纵地连接了痘病毒 p7.5 启动子的编码免疫球蛋白 λ 轻链多肽的多核苷酸, 其含有序列:

```
GGCCAAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGCGGCCGCCCATGGGATGGAGCTGTAT
CATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGCGTGCACTTGACTCGAGAAGCTTACCGTCCTAC
GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGG
TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
```

```
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT
ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGTTAGGTCGAC
```

文中命名为 SEQ ID NO: 20。可以将 PCR 扩增的 λ 轻链可变区符合读框地插入序列中以粗体字显示的 ApaLI (SEQ ID NO: 21 的核苷酸 95-100) 和 HindIII (SEQ ID NO: 22 的核苷酸 111-116) 单酶切位点。

此外, pVIE 可以用于这样一些实施方案, 即如上所述需要在选择第一文库的多核苷酸的过程中有存在于质粒载体中的第二文库的多核苷酸。

“插入 DNA”是指要在重组体病毒载体中进行表达的一或多个异源 DNA 片段。根据本发明, “插入 DNA”是编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸。所述 DNA 区段可以是天然的, 非天然的, 合成的或者它们的组合。文中公开了制备本发明的插入 DNA 的方法。

“转移质粒”是指如上所述含有位于 5' 旁侧区和 3' 旁侧区之间的插入 DNA 的质粒载体。该 5' 旁侧区与第一病毒片段有同源性, 3' 旁侧区与第二病毒片段有同源性。优选, 所述转移质粒含有合适的启动子, 比如病毒载体是痘病毒时, 在插入 DNA 上游含有强的组成型痘苗启动子。术语“载体”是指含有异源多核苷酸区段的多核苷酸构建体, 它能将所述多核苷酸区段转移到合适的宿主细胞。优选包含在载体中的多核苷酸可操纵地连接了能引起多核苷酸在合适的宿主中进行表达的合适的调控序列。这类调控序列包括引起转录的启动子, 调控转录的可选操纵子序列, 编码合适的 mRNA 核糖体结合位点的序列, 以及调控转录和翻译终止的序列。用在本发明中, 载体可以是质粒, 噬菌体颗粒, 病毒, 信使 RNA, 或者只是一个潜在的基因组插入片段。一旦转化到合适的宿主中, 所述载体可以复制并且独立于宿主基因组发挥作用, 或者在某些情况中, 整合到基因组本身内。用于哺乳动物细胞培养表达的典型质粒表达载体, 例如有建立在

pRK5 (EP307247), pSV16B (W091/08291) 和 pVL1392 (Pharminogen) 的基础上。

但是, 文中使用的“转移质粒”并不限于特定的质粒或载体。任何环形或线性或者其他合适形式的 DNA 区段都可以作为三分子重组法中将所述 DNA 插入片段与第一和第二病毒“臂”一起转移到宿主细胞内的载体。其他合适的载体包括文中描述的或者本领域已知的 λ 噬菌体, mRNA, DNA 片段等。多质粒可以是比如文中描述的 λ 噬菌体的“初级文库”。

三分子重组的改进。三分子重组可以用于在痘苗病毒中构建滴度大约为 10^7 pfu 数量级的 cDNA 文库。有几个因素限制了这类 cDNA 文库或其他文库的多样性。它们包括: 初级 cDNA 文库或其他文库的大小, 比如可以构建在质粒载体中的编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸文库, 以及纯化大量(几百微克)病毒“臂”(优选痘苗病毒“臂”或其他痘病毒“臂”)付出的劳动。改进三分子重组以使得痘苗或其他病毒 DNA 能与初级 cDNA 文库或其他文库(比如构建在 λ 噬菌体或由它衍生的 DNA 或噬菌粒中的编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸)进行重组, 或者使得能在感染了修饰过的病毒载体后于体内制备单独的病毒 DNA 臂, 这样就能大大提高用该方法构建的真核病毒 cDNA 文库或其他文库的质量和滴度。

将 cDNA 插入片段从 λ 噬菌体文库转移到痘苗病毒。 λ 噬菌体载体在构建 cDNA 文库或诸如编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸等其他文库方面比质粒载体有一些优点。质粒 cDNA (或其他 DNA 插入片段) 文库或线性 DNA 文库可以通过化学/热震惊转化或者电穿孔导入细菌细胞。细菌细胞优选转化比较小的质粒, 这样就导致可能丢失文库中的较长 cDNA 或其他插入 DNA, 比如编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸。另外, 转化是将外来 DNA 或其他 DNA 导入细胞的效率比较低的过程, 为了构建 cDNA 文库或其他文库(比如编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸)需要使用昂贵的商品化感受态细菌。相反, λ 噬菌体载体可以容忍 12kb 或更长的 cDNA 插入片段, 而且没有任何大小

偏向性。利用高效的商业化包装提取物可以在体外将 λ 载体包装成毒粒，然后通过感染将重组体 λ 基因组导入细菌细胞。这个过程产生与通常在质粒文库中得到的相比，具有更高滴度和更好反映较大cDNA或其他插入DNA（比如编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸）的初级文库。

为了能将来自构建在 λ 载体中的cDNA插入片段或其他DNA插入片段，比如编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸，转移到真核病毒载体比如痘苗病毒中，必须将 λ 载体修饰，使之包含痘苗病毒DNA序列从而能与痘苗病毒DNA进行同源重组。下面的实施例使用了痘苗病毒同源序列，但可以类似地使用其他病毒。例如，可以用HindIII和SnaBI切割质粒p7.5/ATG0/tk（如以下实施例5所述）所包含的痘苗病毒HindIII J片段（含有痘苗tk基因）（3kb的痘苗DNA序列），亚克隆到pT7Blue3（Novagen货号70025-3）中的HindIII/SnaBI位点形成pT7B3.Vtk。可以用SacI和SnaBI从该载体中切下痘苗tk基因并插入LambdaZap Express(Stratagene)中的SacI/SmaI位点，从而产生Lambda.Vtk。该Lambda.Vtk载体含有NotI, BamHI, SmaI和SalI单酶切位点，可用于在痘苗7.5k启动子下游插入cDNA。可以采用本领域公知的方法在Lambda.Vtk中构建cDNA文库。

可以采用来自构建在Lambda.Vtk或任何类似噬菌体中的cDNA文库或其他文库的DNA（比如编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸）来制备cDNA或其他插入DNA重组体痘苗病毒，所述DNA包括带有用来促进同源重组的侧翼痘苗DNA序列的cDNA插入片段或其他插入DNA。通过共感染辅助噬菌体（ExAssist phage, Stratagene货号211203）从 λ 基因组中切下质粒的方法是本领域公知的。从基于 λ 的文库中进行大规模切割产生了存在于质粒载体中的等同cDNA文库或其他文库。从例如Lambda.Vtk cDNA文库中切下来的质粒含有痘苗tk序列，旁侧是cDNA插入片段或其他插入DNA，比如编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸。然后这个质粒DNA可以用于通过三分子重组

来构建痘苗重组体。该方法的另一个实施方案是直接从原始的 Lambda.Vtk 文库中纯化 λ DNA，并将该重组体病毒 (λ) DNA 或其片段与两个大的痘苗病毒 DNA 片段一起转染来进行三分子重组。

体内产生痘苗臂。痘苗 DNA 或其他病毒 DNA “臂”的纯化和转染是通过三分子重组构建多核苷酸文库的一个限制因素。对该方法进行改进使得能在体内产生病毒臂，尤其是痘苗病毒臂，就能更有效地在真核病毒中构建文库。

可以修饰宿主细胞使它表达能识别导入到病毒载体基因组的某个独特位点的限制性内切酶。例如，痘苗病毒感染这些宿主细胞时，所述限制性内切酶将消化痘苗 DNA，产生只能通过三分子重组来修复（即重新连接）的“臂”。限制性内切酶的例子包括细菌酶 NotI 和 ApaI，酵母内切酶 VDE（R. Hirata, Y. Ohsumi, A. Nakano, H. Kawasaki, K. Suzuki, Y. Anraku. 1990 J. Biological Chemistry 265:6726-6733），Chlamydomonas eugametos 内切酶 I-CeuI 和其他本领域公知的内切酶。例如，已经构建了其 tk 基因内含有 NotI 和 ApaI 单酶切位点的痘苗株，通过本领域公知的方法可以很容易地构建 tk 基因中含有 VDE 和/或 I-CeuI 单酶切位点的病毒株。

组成型表达限制性内切酶对细胞是致死的，因为该酶会将染色体 DNA 片段化。为了避免这个棘手的问题，在一个实施方案中将宿主细胞修饰使它在诱导型启动子调控下表达限制性内切酶基因。

一个优选的诱导型表达方法利用了 Tet-On Gene Expression System (Clontech)。在该系统中，编码内切酶的基因的表达在缺少诱导物（四环素）的情况下是沉默的。这就使得能分离到能被诱导表达毒性基因（即内切酶）的稳定的转染细胞系（Gossen, M. 等, Science 268:1766-1769 (1995)）。加入四环素衍生物强力霉素能诱导内切酶的表达。在一个优选实施方案中，用调控 NotI 基因表达的 Tet-On 载体稳定地转染 BSC1 宿主细胞。用强力霉素诱导铺满的单细胞层，然后感染 v7.5/tk（tk 基因中有 NotI 单酶切位点），并用 cDNA 或插入 DNA 重组体转移质粒或转移 DNA 或 λ 噬菌体或噬菌粒 DNA

进行转染。宿主细胞编码的 NotI 内切酶消化暴露的痘苗 DNA 中例如 tk 基因或其他序列中的 NotI 单酶切位点，从而产生两个大的痘苗 DNA 片段，这两个片段只有与转移质粒或噬菌体 DNA 进行三分子重组才能形成全长病毒 DNA。用 NotI 消化宿主细胞染色体 DNA 预计不能阻止被修饰的感染性病毒的产生，因为在病毒复制和毒粒装配的过程中不需要宿主细胞进行增殖。

在用该方法体内制备病毒臂（比如痘苗臂）的另一个实施方案中，构建了一个修饰的痘苗株，它的 tk 基因或其他非必需基因中含有唯一的内切酶位点，并且在痘苗基因组中另一个非必需位点含有处于 T7 噬菌体启动子调控下的编码内切酶的异源多核苷酸。对表达 T7 RNA 聚合酶的细胞的感染将导致内切酶的表达，以及随后该酶消化痘苗 DNA。在一个优选实施方案中，通过在 HindIII C 或 F 区（Coupar, E. H. B. 等，Gene 68:1-10(1988); Flexner, C. 等，Nature 330:259-262(1987)）中插入其表达受到 T7 启动子调控的含有编码 NotI 的 cDNA 的盒子，对痘苗 v7.5/tk 株进行修饰，从而形成 v7.5/tk/T7NotI。用处于哺乳动物启动子调控下的编码 T7 RNA 聚合酶的 cDNA 稳定地转染细胞系（O. Elroy-Stein, B. Moss. 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6743-6747）。该包装细胞系感染 v7.5/tk/T7NotI 后会造成 NotI 的 T7 RNA 聚合酶依赖性表达，以及随后将痘苗 DNA 消化成臂。被消化的痘苗 DNA 臂只能在与转移质粒或噬菌体 DNA 进行三分子重组后重新组成和包装为感染性全长病毒 DNA。在该方法的再一个实施方案中，可以通过共感染 T7 RNA 聚合酶重组体辅助病毒，比如禽痘病毒来提供 T7 RNA 聚合酶（P. Britton, P. Green, S. Kottier, K. L. Mawditt, Z. Penzes, D. Cavanaugh, M. A. Skinner. 1996 J. General Virology 77:963-967）。

运用这些不同策略体内产生大的病毒 DNA 片段（优选痘苗 DNA 片段）的三分子重组的一个特点是痘苗 DNA 的消化可以在重组之前进行，但并非必须如此。它保证了只有重组体病毒能逃脱消化所造成的破坏。这与采用转染体外消化的痘苗 DNA 的三分子重组形成对比，在

后者中必须在重组前制备痘苗 DNA 片段。在消化前进行两分子重组得到重组体的频率比在消化后通过三分子重组得到重组体的频率更高是有可能的。

利用病毒载体，尤其是痘病毒分离重组体免疫球蛋白分子的选择和筛选策略。在本发明的某些实施方案中，利用了三分子重组法来产生表达免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸文库。在该实施方案中，包含全长免疫球蛋白亚基多肽或其片段的文库是通过首先在含有与痘病毒同源 5'和 3'区的转移质粒中插入编码免疫球蛋白恒定区和信号肽的盒子制备的。重排的免疫球蛋白可变区通过 PCR 从未免疫动物的前 B 细胞或者免疫动物的 B 细胞或浆细胞中分离。将这些 PCR 片段克隆到免疫球蛋白信号肽和恒定区之间，并与它们读框相符，从而产生所述免疫球蛋白亚基多肽的编码区。将这些转移质粒导入有痘病毒“臂”的宿主细胞，利用三分子重组方法来产生文库。

本发明提供了多种鉴定（即选择或筛选）具有所需特异性的免疫球蛋白分子的方法，其中所述免疫球蛋白分子是在真核细胞内体外产生的。这些方法包括选择宿主细胞效应，比如抗原诱导的细胞死亡和抗原诱导的信号传递；筛选宿主细胞群中的抗原特异性结合情况以及对宿主细胞群所生长的培养基进行筛选看是否存在具有所需抗原特异性或功能特点的可溶性免疫球蛋白分子。

正如文中详细描述，本发明提供了根据抗原诱导的细胞死亡，抗原诱导的信号传递，抗原特异性结合或其他抗原特异性功能来鉴定真核细胞中表达的免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的方法。本发明的选择和筛选技术消除了在啮齿类动物中选择抗体带来的偏向性或者在细菌中合成和装配的局限性。

文中描述的许多鉴定方法依赖于宿主细胞基因或宿主细胞转录调控区的表达，它们响应于抗原与表达在宿主细胞表面上的免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的结合而直接或间接地诱导细胞死亡或产生可以检测到的信号。应当提到的是本发明最优的实施方案需要用真核病毒载体，优选痘病毒载体，更优选痘苗病毒载体来感染宿主细

胞。本领域普通技术人员很容易理解，在某些细胞系中，一旦感染痘病毒，即使没有病毒基因的表达，宿主细胞的一些蛋白质合成也会被迅速关闭。如果为了诱导抗原诱导的细胞死亡或细胞信号传递而需要上调宿主细胞基因或者宿主细胞转录调控区，这就会产生问题。但这个问题不是无法解决的，因为在某些细胞系中，在病毒 DNA 复制之前，对宿主蛋白质合成的抑制是不完全的。参见 Moss, B. “痘病毒科及其复制” (Virology, 2nd Edition, B. N. Fields, D. M. Knipe 等编, Raven Press, 2096 页 (1990))。但是这需要迅速地筛选大量宿主细胞看它们在感染真核病毒载体 (优选痘病毒载体, 更优选痘苗病毒载体) 时, 表达那些在与表面表达的免疫球蛋白分子发生交联时被上调的基因产物的能力; 还要对目标宿主细胞进行筛选看它们在感染各种突变体和减毒病毒时能否差异表达细胞基因。

相应地, 本发明提供了一种利用特定宿主细胞在有序的 cDNA 文库微阵上的表达谱, 对大量宿主细胞进行筛选看它们在感染病毒载体时, 宿主细胞基因的表达和/或宿主细胞转录调控区的操纵性, 这些影响到抗原诱导的细胞死亡或细胞信号传递。Duggan, D. J. 等 (Nature Genet. 21(1 Suppl):10-14(1999)) 描述了在微阵中的表达谱, 该文全文引作参考。

根据这个方法, 利用表达谱比较未感染宿主细胞和感染了真核病毒表达载体 (优选痘病毒载体, 更优选痘苗病毒载体) 的宿主细胞的基因表达模式, 其中该具体真核病毒载体就是用于构建本发明的第一和第二多核苷酸文库的载体。这样, 就能鉴定到在其表面表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段、并进一步在感染给定病毒时表达所需诱导性蛋白质的合适的宿主细胞。

表达谱还可用于比较给定宿主细胞中的宿主细胞基因表达模式, 例如比较感染了完全感染性病毒载体的宿主细胞, 和感染了其相应的减毒病毒载体时的宿主细胞的表达模式。在微阵列中的表达谱使得能对感染了多种减毒病毒的宿主细胞进行大规模筛选, 其中减毒是通过各种不同方式实现的。例如, 某些减毒是通过基因突变实现的。许多

痘苗病毒突变体已经得到研究。这些可以是完全缺陷的突变体，即产生感染性病毒颗粒需要辅助病毒，或者他们可能是条件突变体，例如温度敏感型突变体。尤其优选条件突变体，因为在需要表达宿主基因时，可以将病毒感染的宿主细胞保持在非允许环境（例如保持在非允许温度），然后换成允许环境（例如允许温度）以便产生病毒颗粒。或者，可以利用在感染循环的确定点可逆地阻断病毒复制的化学抑制剂来对完全感染性病毒“减毒”。所述化学抑制剂包括，但不限于羟脲和 5-氟脱氧尿苷。在需要表达宿主基因时，将感染病毒的宿主细胞维持在化学抑制剂中，然后去掉化学抑制剂使之产生病毒颗粒。

利用这种方法，微阵中的表达谱可以用来在文中描述的任何选择方法中鉴定合适的宿主细胞，合适的转录调控区，和/或合适的减毒病毒。

在一个实施方案中，提供了一种选择编码免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的方法，该方法基于直接的抗原诱导的细胞凋亡。根据该方法，选择用于感染和/或转染的宿主细胞是早期 B 细胞淋巴瘤。合适的早期 B 细胞淋巴瘤细胞系包括，但不限于 CH33 细胞，CH31 细胞（Pennell, C. A. 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA82:3799-3803(1985)），或 WEHI-231 细胞（Boyd, A. W. 和 Schrader, J. W. J. Immunol. 126:2466-2469(1981)）。早期 B 细胞淋巴瘤细胞系通过诱导自发的生长抑制和细胞程序化死亡而对抗原特异性免疫球蛋白的交联产生应答（Pennell, C. A. 和 Scott, D. W. Eur. J. Immunol. 16:1577-1581(1986); Tisch, R. 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA85 : 69114-6918 (1988) ; Ales-Martinez, J. E. 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA85 : 69119-6923 (1988) ; Warner, G. L. 和 Scott, D. W. Cell. Immunol. 115:195-203(1988)）。在如上所述地感染和/或转染第一和第二多核苷酸文库后，使抗体分子的合成和装配进行大约 5 到 48 小时，优选大约 6 小时，大约 10 小时，大约 12 小时，大约 16 到 20 小时，大约 24 到 30 小时，大约 36 小时，大约 40 小时，或者大约 48 小时，更优选大约

12 小时或大约 24 小时；在这段时间内将宿主与特异抗原进行接触，以便交联任何特异性的免疫球蛋白受体（即膜结合的免疫球蛋白分子，或其抗原特异性片段），并在那些表达免疫球蛋白的宿主细胞内诱导细胞凋亡，所述宿主细胞通过诱导生长抑制和细胞程序化死亡而直接对抗原特异性免疫球蛋白的交联产生应答。回收发生细胞凋亡的宿主细胞，或者它们的内容物，包括其中包含的编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸，从而富集编码第一免疫球蛋白亚基多肽的第一文库多核苷酸，所述第一免疫球蛋白亚基多肽作为免疫球蛋白分子，或其抗原特异性片段的一部分，能够特异地结合目的抗原。

在进一步选择和富集第一文库的多核苷酸，并分离这些多核苷酸后，实施类似的过程来回收第二文库的多核苷酸，它们作为免疫球蛋白分子，或其抗原特异性片段的一部分，能够结合特定的目的抗原。

图 1 显示了这种方法的一个例子。在痘病毒载体，优选痘苗病毒载体中构建“第一文库”，其中的多核苷酸编码来自未被免疫或免疫供体的抗体产生细胞的多种重链；在质粒载体中构建编码免疫球蛋白轻链的多核苷酸的类似多样化“第二文库”，其中多核苷酸的表达受到痘苗启动子，优选合成的早期/晚期启动子，例如 p11 启动子，或 p7.5 启动子的调控。对于该实施方案，优选将痘病毒构建体所编码的免疫球蛋白重链恒定区设计成保留跨膜区，从而使免疫球蛋白受体表达在表面膜上。用感染复数为大约 1 (MOI=1) 的痘病毒重链文库感染真核细胞，优选早期 B 细胞淋巴瘤细胞。2 小时后，用轻链质粒文库在允许每个细胞平均摄取 10 个或更多个单独的轻链重组体质粒并使之表达的条件下转染被感染的细胞。因为该质粒中重组体基因的表达受到痘苗病毒启动子的调控，不需要发生核整合，就能在感染了痘苗病毒的细胞的胞质内高水平表达重组体基因产物。此外，环形 DNA 在感染了痘苗病毒的细胞的胞质中不依赖于序列进行扩增的机制将产生更高浓度的转染轻链重组体质粒 (Merchlinisky, M. 和 Moss, B. *Cancer Cell* 6:87-93(1988))。这两个因素导致高水平表达，引起过量的轻链合成。

另一个优选实施方案利用了表达 T7 RNA 聚合酶的细胞内有活性的 T7 噬菌体启动子来调控多核苷酸的表达,所述多核苷酸编码构建在痘病毒载体,优选痘苗病毒载体中的“第一文库”,其中的多核苷酸编码来自未免疫或免疫供体的抗体产生细胞的多种重链;并构建在质粒载体中编码免疫球蛋白轻链的多核苷酸的类似多样化“第二文库”(Eckert D. 和 Merchlinsky M. J Gen Virol. 80(Pt6):1463-9(1999);Elroy-Stein O., Fuerst T. R. 和 Moss B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA86(16):6126-30(1989); Fuerst T. R., Earl P. L. 和 Moss B. Mol Cell Biol. 7(7):2538-44(1987); Elroy-Stein O. 和 Moss B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA87(17):6743-7(1990);Cottet S. 和 Cortesy B. Eur J Biochem246(1):23-31)。

本领域普通技术人员很容易理解,在设计本实验时很重要的是动力学方面的考虑,因为衍生自痘病毒的表达载体在大约 1 到 10 天的时间段内自身是致细胞病变的,这个时间段更经常是大约 2 到 8 天,2 到 6 天,或者 2 到 4 天,取决于所用的病毒载体、具体的宿主细胞和感染复数。在一个优选实施方案中,选择 B 细胞淋巴瘤,其中对表面免疫球蛋白交联产生的细胞凋亡反应比在该细胞中痘病毒感染的自然致细胞病变效应更迅速。因此,优选宿主细胞表面的免疫球蛋白分子由于抗原诱导性交联而引起的细胞凋亡发生在宿主细胞与抗原进行接触后的大约 1 小时到 4 天,以便在 CPE 的诱导之前发生。更优选,细胞凋亡发生在宿主细胞与抗原进行接触后的大约 1 小时、2 小时,大约 3 小时、4 小时,大约 5 小时,大约 6 小时,大约 7 小时,大约 8 小时,大约 9 小时,大约 10 小时,大约 11 小时,大约 12 小时,大约 14 小时,大约 16 小时,大约 18 小时,大约 20 小时,大约 22 小时,大约 24 小时,大约 28 小时,大约 32 小时,大约 36 小时,大约 40 小时,大约 44 小时,大约 48 小时。更优选在宿主细胞与抗原接触后大约 12 小时内细胞凋亡被诱导。或者,可以采用致细胞病变效应的诱导动力学更慢的减毒痘病毒。文中公开了减毒的痘病毒载体。

根据这种方法，在发生细胞凋亡时，选择其表面表达抗原特异性免疫球蛋白的宿主细胞。例如，如果宿主细胞附着在固体基质上，那些发生细胞凋亡的细胞就会从基质上释放下来，通过收获培养宿主细胞的液体培养基来回收它们。或者，宿主细胞附着在固体基质上，那些发生细胞凋亡的细胞会出现水解现象，从而将其胞质内容物释放到培养宿主细胞的液体培养基中。然后可以从液体培养基中收获这些细胞释放的病毒颗粒。

含有编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸的宿主细胞可能由于某种机制变成“不贴壁”或“无活力”的，这类机制包括水解，不能贴壁，失去生活力，失去膜的完整性，失去结构稳定性，细胞骨架成分被破坏，不能维持膜电势，细胞周期停滞，不能产生能量等。因此可以通过任何物理手段，比如吸出，洗涤，过滤，离心，细胞分选，荧光激活细胞分选（FACS）等来回收含有目的多核苷酸的宿主细胞，即与其余细胞分离开。

例如，含有编码免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸的宿主细胞可能发生裂解，因此将重组体病毒颗粒（优选痘病毒颗粒，更优选痘苗病毒颗粒）释放到培养基中，或者变得不贴壁，因此脱离固体支持物。所以，一个优选实施方案中，通过吸出或洗涤将释放的重组体病毒和/或不贴壁的细胞与贴壁细胞分离开。

宿主细胞是早期 B 细胞淋巴瘤细胞系的情况下，可以使这些细胞通过与结合在基质上的 B 细胞特异性抗体的相互作用而附着到固体基质上。合适的 B 细胞特异性抗体包括，但不限于抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体。

在另一些优选实施方案中，利用转染了构建体的宿主细胞来直接或间接地引起抗原诱导的细胞死亡，所述构建体中的外来多核苷酸（其表达间接地导致细胞死亡）可操纵地连接了转录调控区，后者在表面免疫球蛋白分子交联时被诱导。

“在表面免疫球蛋白分子交联时被诱导的转录调控区”是指这样一种区，例如宿主细胞启动子，其通常调控那些在表面表达的免疫球

蛋白分子交联时被上调的基因。这类转录调控区的一个优选的例子是 BAX 启动子，它在早期 B 细胞淋巴瘤细胞发生表面免疫球蛋白分子交联时被上调。

在一个实施方案中（如图 2A 和 2B 所示），提供了一种在编码细胞毒性 T 细胞（CTL）表位的外来多核苷酸被表达时诱导细胞死亡的方法。所述编码 CTL 表位的外来多核苷酸被置于与转录调控区可操纵地连接在一起，该调控区在表面免疫球蛋白分子交联时被诱导。当宿主细胞表面的免疫球蛋白分子发生抗原诱导的交联时，CTL 表位表达在宿主细胞表面上，处于也表达在宿主细胞表面的确定的 MHC 分子范围内。将细胞与能识别处于确定 MHC 分子范围内的 CTL 表位的表位特异性 CTL 进行接触，表达 CTL 表位的细胞迅速发生裂解现象。在 Zauderer 的 PCT 公开文本 W000/028016 中进一步公开了选择和回收表达特异 CTL 表位的宿主细胞的方法。

选择宿主细胞是通过回收那些发生细胞死亡和/或出现裂解现象的细胞或其内容物来完成的。例如，如果选定了附着生长在固体支持物上的宿主细胞，则那些发生细胞死亡和/或出现裂解现象的宿主细胞就会从支持物上释放下来，在细胞上清液中回收到。或者，可以从细胞上清液中回收到那些发生细胞死亡和/或出现裂解现象的宿主细胞所释放的病毒颗粒。

根据这个实施方案，宿主细胞表面所表达的 MHC 分子可以是 I 类 MHC 分子或 II 类 MHC 分子。在特别优选的实施方案中，宿主细胞上表达的 MHC 分子是 H-2K^d 分子，在发生抗原诱导的交联时被表达的 CTL 表位是肽 GYKAGMIHI，文中命名为 SEQ ID NO: 23。

利用这个方法时，可以使用能在其表面表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的任何宿主细胞。合适的宿主细胞包括免疫球蛋白阴性的浆细胞瘤细胞系。这类细胞系的例子包括，但不限于 NS1 细胞系，Sp2/0 细胞系和 P3 细胞系。其他合适的细胞系对本领域普通技术人员是显而易见的。

在另一个优选的实施方案中（如图 2A 和 2B 所示）提供了一种方

法，其中利用转染了构建体的宿主细胞来间接诱导细胞死亡，所述构建体中包含“自杀”基因的异源多核苷酸与转录调控区可操纵地连接在一起，后者在发生表面免疫球蛋白分子交联时被诱导。“自杀基因”是指表达时导致细胞死亡的核酸分子。可以作为自杀基因的多核苷酸包括本领域已知的许多细胞死亡诱导序列。优选的自杀基因是编码毒素，比如假单胞菌外毒素 A 链，白喉毒素 A 链，蓖麻毒蛋白 A 链，相思豆毒蛋白 A 链，modeccin A 链和 α 八叠球菌 (α -sarcin) 的那些基因。一个优选的自杀基因编码白喉毒素 A 亚基。一旦宿主细胞表面的免疫球蛋白分子发生抗原诱导的交联，细胞凋亡诱导基因的启动子就被诱导，从而表达自杀基因，促进细胞死亡。

采用这种方法时，可以使用能在其表面表达免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段，并能通过表达谱鉴定转录调控区的任何宿主细胞，其中所述转录调控区在发生表面免疫球蛋白分子交联时被诱导。合适的宿主细胞包括早期 B 细胞淋巴瘤细胞系和免疫球蛋白阴性的浆细胞瘤细胞系。这类细胞系的例子包括，但不限于 CH33 细胞系，CH31 细胞系，WEHI-231 细胞系，NS1 细胞系，Sp2/0 细胞系和 P3 细胞系。其他合适的细胞系对本领域普通技术人员是显而易见的。

在宿主细胞是 Ig-阴性浆细胞瘤细胞系的情况中，可以使这些细胞通过与结合在基质上的浆细胞瘤特异性抗体的相互作用而附着到固体基质上。合适的浆细胞瘤特异性抗体包括，但不限于抗 CD38 抗体 (Yi, Q. 等, Blood 90:1960-1967 (1997))，抗 CD31 抗体 (Medina, F. 等, Cytometry 39:231-234 (2000))，抗 CD20 抗体 (Haghighi, B. 等, Am. J. Hematol. 59:302-308 (1998)) 和抗 CD10 抗体 (Dunphy, C. H., Acta. Cytol. 40:358-362 (1996))。

可以将文中描述的直接和间接抗原诱导细胞死亡方法结合使用。例如，在宿主细胞是早期 B 细胞淋巴瘤、并且抗原交联直接诱导细胞凋亡的那些实施方案中，可以通过用这样一种构建体转染早期 B 细胞淋巴瘤宿主细胞来加速抗原诱导的细胞死亡，所述构建体中编码外来细胞毒性 T 细胞表位的多核苷酸与转录调控区可操纵地连接在一起，

后者在发生表面免疫球蛋白分子交联时被诱导。抗原交联细胞与特异细胞毒性 T 细胞进行接触时，细胞死亡将得到加快。类似的，在宿主细胞是早期 B 细胞淋巴瘤，并且抗原交联直接影响细胞凋亡的那些实施方案中，可以通过用这样一种构建体转染早期 B 细胞淋巴瘤宿主细胞来加速抗原诱导的细胞死亡，所述构建体中自杀基因与转录调控区可操纵地连接在一起，后者在发生表面免疫球蛋白分子交联时被诱导。

可以将免疫球蛋白重链进行修饰，使得特异抗原能在其中受体经特异抗原发生交联的细胞中诱导出容易检测的信号。一个优选的实施方案是利用细胞凋亡诱导系统来选择因表达抗原特异性受体所导致的细胞杀伤。细胞凋亡诱导系统的一个例子包括人 FAS (CD95, APO-1) 受体，它是肿瘤坏死-神经生长因子受体超家族的一个成员，该超家族通过募集和装配死亡诱导信号复合体（该复合体激活一系列蛋白水解性 caspases）而在调节细胞凋亡中发挥作用。有几份报导描述了基于 FAS 的诱导性细胞死亡系统，其中可通过嵌合蛋白来诱导细胞凋亡，该嵌合蛋白含有 FAS 的胞质“死亡结构域”，并与不同受体偶联在一起，从而可通过多种细胞调节子来诱导细胞凋亡。Ishiwatari-Hayasaka 等成功地利用小鼠 CD44 的胞外结构域和人 FAS 在与多价抗 CD44 抗体发生交联时诱导细胞凋亡 (Ishiwatari-Hayasaka H. 等, *J Immunol* 163:1258-64(1999))。此外，Takahashi 等证明嵌合人 G-CSFR/FAS (胞外/胞质) 蛋白能够在与抗 G-CSFR 抗体发生交联时诱导细胞凋亡 (Takahashi T 等, *J Biol Chem* 271:17555-60(1996))。这些作者已经证明，嵌合蛋白二聚体不能诱导细胞凋亡。复合体必须至少是三聚体形式。

在一个优选实施方案中，构建了一个嵌合基因，其中 FAS 的跨膜结构域和胞质死亡结构域与人 IgM 重链的 CH1 结构域的羧基端融合在一起 (CH1-Fas, 图 13 (a))。如文中所述将各种 VH 基因插入该构建体，从而制备出 VH-CH1-Fas 重组体疫苗病毒文库。在感染了 VH-CH1-Fas 构建体、并且转染了编码不同免疫球蛋白轻链或者感染了经

补骨脂素处理过的编码不同免疫球蛋白轻链的重组体痘苗病毒的宿主细胞内，装配带有 VH-CH1-Fas 的膜受体。那些表达具有所需特异性的重链和轻链可变区基因组合的细胞将有某些膜受体在有目的的特异性的固定化抗原存在的情况下发生交联。VHCH1/FAS 寡聚物功能性复合体的形成将诱导细胞凋亡。可以通过与多价抗原交联或者通过将 1 个以上的抗原固定在组织培养板或珠子上来形成三聚体。

在一个变通的实施方案中，在融合蛋白中表达 VH 文库，所述融合蛋白中包含 FAS 的跨膜结构域和胞质死亡结构域的多肽与 IgM 重链 CH4 结构域的羧基端融合在一起（图 13（b））。在另一个实施方案中，FAS 的胞质死亡结构域融合到 IgM 重链 CH4 结构域后面的跨膜结构域的羧基端（图 13（c））。

后两个实施方案（图 13（b）和（c））导致合成二聚体 Fas 死亡结构域，它可促进形成诱导细胞凋亡信号所需要的三聚体复合物，从而提高所选的抗原特异性受体的数量。但是利用单体构建体（图 13（a）），可选择到数量少但亲合力更高的抗原受体，同时减少非抗原特异性细胞死亡的背景。这两种带有二聚体 Fas 结构域的受体不同之处在于融合蛋白中编码的跨膜区是 Fas 衍生的还是 IgM 衍生的。衍生自 IgM 的跨膜区可能对于表达在 B 淋巴细胞谱系的细胞中的膜受体更有效。这个实施方案的一个优点是它不限于 B 细胞。具体来说，单体的 Fas 构建体可以在包括表皮细胞系，Hela 细胞和 BSC-1 细胞等能产生高滴度痘苗病毒的广泛的细胞类型中合成和表达为膜受体。

在另一个实施方案中，提供了一种基于抗原诱导的细胞信号传导的筛选方法，用于回收编码免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的多核苷酸。根据这种方法，用容易检测的报道分子构建体（例如萤光素酶）转染宿主细胞，该构建体与转录调控区可操纵地连接在一起，后者在发生表面免疫球蛋白交联时被上调。将在其表面表达免疫球蛋白或其片段的宿主细胞池与抗原进行接触，发生交联时，可在该细胞集中检测信号。参照以上描述的免疫球蛋白鉴定方法的第一个步骤，可以如下实施信号传导方法。将编码免疫球蛋白亚基多肽的第一多核苷

酸文库分成多个池，例如大约 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 或更多个池，每个池含有大约 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 或 10^9 个编码带有不同可变区的免疫球蛋白亚基多肽的不同多核苷酸。优选每个池开始含有大约 10^3 个多核苷酸。将每个池扩展，留一份复制试样用于后面的回收。在多核苷酸群构建在病毒载体（优选痘病毒，更优选痘苗病毒）的情况下，可以通过例如将高滴度病毒文库原液稀释，用其中的部分以低 MOI（例如 $\text{MOI} < 0.1$ ）感染组织培养细胞的微量培养物来制备所述池。通常经过 48 小时的感染后，病毒滴度获得 1000 倍以上的扩增。在多个单独集中扩增病毒滴度减少了由于更有竞争力的亚群相对迅速的生长造成重组体亚群丢失的危险。

然后用病毒池感染与所制备的病毒池数量相等的宿主细胞池。这些宿主细胞已经被工程化以便在发生表面免疫球蛋白交联时表达报道分子。每个池感染的宿主细胞的数量取决于该集中含有的多核苷酸的数量和所需的 MOI。将第二多核苷酸文库也导入宿主细胞池，并允许在宿主细胞的表面表达免疫球蛋白分子或其片段。

然后将宿主细胞池与目的抗原在一定条件下进行接触，在该条件下其表面表达抗原特异性免疫球蛋白分子的宿主细胞在所述免疫球蛋白分子发生交联时能表达可检测的报道分子，然后筛选各个宿主细胞池的报道分子表达情况。收获那些能检测到报道分子表达的宿主细胞池，从开始扩增该多核苷酸池时留下的试样中回收第一文库的多核苷酸。

为了进一步富集第一文库中编码抗原特异性免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸，将上面回收到的多核苷酸分成多个亚池。建立亚池使之比上面使用的池含有更少的不同成员。例如，如果每个第一池含有 10^3 个不同的多核苷酸，建立的亚池每个应平均含有大约 10 或 100 个不同多核苷酸。将亚池与第二文库导入宿主细胞，允许在宿主细胞的膜表面表达免疫球蛋白分子或其片段。然后象上面那样将宿主细胞与抗原进行接触，鉴定出能检测到报道分子表达的那些宿主细胞亚池，如上所述从先前留下的复制集中回收第一文库的多核苷酸。本领域普

通技术人员明白，可以将该过程再重复一或多次以便充分富集编码抗原特异性免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸。

一旦完成进一步选择和富集第一文库的多核苷酸的步骤，并分离这些多核苷酸后，进行类似的过程来回收第二文库的多核苷酸，它们作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分，能结合目的特异抗原。

任何合适的报道分子都可以用于这种方法，其选择取决于所用的宿主细胞，可供利用的检测仪器以及检测的容易程度。合适的报道分子包括，但不限于萤光素酶，绿色荧光蛋白和 β -半乳糖苷酶。

任何能在其表面表达免疫球蛋白分子的宿主细胞都可以用于这种方法。优选的宿主细胞包括免疫球蛋白阴性的浆细胞瘤细胞，例如 NS1 细胞，Sp2/0 细胞或 P3 细胞，以及早期 B 细胞淋巴瘤细胞。

与上面描述的细胞死亡法类似，动力学考虑要求报道分子构建体的表达发生在 CPE 的诱导之前。尽管如此，优选由于宿主细胞表面上的免疫球蛋白分子抗原诱导的交联而引起的可检测报道分子的表达发生在宿主细胞与抗原进行接触后的大约 1 小时到 4 天，以便先于 CPE 的诱导而发生。更优选，报道分子的表达发生在宿主细胞与抗原进行接触后的大约 1 小时、2 小时，大约 3 小时、4 小时，大约 5 小时，大约 6 小时，大约 7 小时，大约 8 小时，大约 9 小时，大约 10 小时，大约 11 小时，大约 12 小时，大约 14 小时，大约 16 小时，大约 18 小时，大约 20 小时，大约 22 小时，大约 24 小时，大约 28 小时，大约 32 小时，大约 36 小时，大约 40 小时，大约 44 小时，大约 48 小时。更优选报道分子的表达发生在宿主细胞与抗原接触后大约 12 小时内。

“在表面免疫球蛋白分子交联时被诱导的转录调控区”是指这样一种区域，例如宿主细胞启动子，其通常调控那些在表面表达的免疫球蛋白分子交联时被上调的基因。这类转录调控区的一个优选的例子是 BAX 启动子，它在早期 B 细胞淋巴瘤细胞发生表面免疫球蛋白分子交联时被上调。

在另一个实施方案中，提供了一种选择编码免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的选择或筛选方法，该方法基于抗原特异性结合。图5显示了该实施方案。根据这种方法，仅靠检测抗原结合来回收在其表面表达抗原特异性免疫球蛋白分子或其片段的宿主细胞。抗原结合可以作为一种选择方法，即利用结合抗原的特点，通过与上面描述的基于细胞死亡类似的方法来直接选择表达抗原特异性免疫球蛋白分子的宿主细胞。例如，如果抗原结合在固体基质上，可以通过借助抗原结合到固体基质上来回收悬浮的可与抗原结合的宿主细胞。或者，抗原结合可以作为筛选过程，即通过与上述用于抗原诱导的细胞信号传导类似的方法对宿主细胞池进行可检测抗原结合的筛选。例如，将在表面表达免疫球蛋白或其片段的宿主细胞池与抗原进行接触，通过免疫测定法检测给定集中的抗原结合情况，例如通过检测与抗原结合的酶-抗体偶联物进行测定。

参照以上描述的免疫球蛋白鉴定方法的第一个步骤，可以如下实施经由抗原特异性结合方法进行的选择。选择能在表面高水平表达免疫球蛋白分子的宿主细胞进行感染和/或转染。优选，宿主细胞悬浮生长。用第一和第二多核苷酸文库如上所述进行感染后，允许抗体分子的合成和装配。然后将宿主细胞转移到表面上结合有抗原的微量滴定板的孔中。能结合抗原的宿主细胞从而附着到孔的表面，通过轻柔的洗涤除去未结合的细胞。或者，可以通过例如荧光激活细胞分选（FACS）回收结合抗原的宿主细胞。FACS 又称为流式细胞分选，可用来根据包括荧光等光学特性来选择单个细胞。能在较短的时间内筛选大群细胞是有用的。最后回收那些结合了抗原的宿主细胞，从而富集第一文库中编码第一免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸，所述第一免疫球蛋白亚基多肽作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分，能够特异结合目的抗原。

在进一步选择和富集第一文库的多核苷酸，并分离这些多核苷酸后，实施类似的过程来回收第二文库的多核苷酸，它们作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分，能够结合特定的目的抗原。

任何能在其表面表达免疫球蛋白分子的宿主细胞都可以用于这种选择方法。优选的宿主细胞包括免疫球蛋白阴性的浆细胞瘤细胞，例如 NS1 细胞，Sp2/0 细胞或 P3 细胞，以及早期 B 细胞淋巴瘤细胞。优选这些细胞能悬浮生长。

参照以上描述的免疫球蛋白鉴定方法的第一个步骤，可以如下通过抗原特异性结合方法来进行筛选。将构建在病毒载体中的编码免疫球蛋白亚基多肽的第一多核苷酸文库通过上述方法分成多个池。然后用病毒池感染与所制备的病毒池数量相等的宿主细胞池。在这种筛选方法中，优选宿主细胞粘着在固体基质上。将第二多核苷酸文库同样导入宿主细胞池，允许在宿主表面表达免疫球蛋白分子或其片段。

然后将宿主细胞池与目的抗原进行接触。与抗原一起温育后，洗去过量的未结合抗原。最后筛选细胞池的抗原结合情况。可以通过多种方法来检测抗原结合。例如，可以将抗原缀合上一种酶。除去未结合的抗原后，加入底物，并检测酶反应产物。利用第二抗体缀合物或链霉亲和素/生物素系统可以强化该方法。这类筛选方法是本领域普通技术人员所熟知的，并且可以从正规商家那里以试剂盒形式得到。同样，如果抗原结合在显微颗粒（例如金珠）上，则可以显微检测抗原与宿主细胞的结合。与上述细胞信号传导方法一样，收获那些检测到与抗原发生结合的宿主细胞池，并回收其中包含的第一文库的多核苷酸。或者，鉴定出能检测到抗原结合的宿主细胞池，从开始扩增该多核苷酸池时留下的该多核苷酸池的复制试样中回收其中包含的第一文库多核苷酸。

为了进一步富集编码抗原特异性免疫球蛋白亚基多肽的第一文库多核苷酸，将上面回收到的多核苷酸分成多个亚池。建立亚池使之比上面使用的池含有更少的不同成员。例如，如果每个第一池含有 10^3 个不同的多核苷酸，建立的亚池每个应平均含有大约 10 或 100 个不同多核苷酸。将亚池与上述第二文库一起导入宿主细胞，使在宿主细胞的膜表面表达免疫球蛋白分子或其片段。然后象上面那样将宿主细胞与抗原进行接触，收获或者简单地鉴定出其中能检测到抗原结合的

那些宿主细胞亚池，回收其中包含的、或者复制试样中包含的第一文库多核苷酸。本领域普通技术人员明白，可以将该过程再重复一或多次以便充分富集编码抗原特异性免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸。

在进一步选择和富集第一文库的多核苷酸并分离这些多核苷酸后，实施类似的过程来回收第二文库的多核苷酸，它们作为免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的一部分，能够结合特定的目的抗原。

任何能在其表面表达免疫球蛋白分子的宿主细胞都可以用于这种方法。优选的宿主细胞包括免疫球蛋白阴性的浆细胞瘤细胞，例如 NS1 细胞，Sp2/0 细胞或 P3 细胞，以及早期 B 细胞淋巴瘤细胞。

实施文中描述的直接和间接抗原诱导的细胞死亡方法时，可以通过任何方便的方法将目的抗原与宿主细胞进行接触。例如，在某些实施方案中，抗原（例如肽或多肽）被附着在固体基质上。用在文中，“固体支持物”或“固体基质”是本领域已知的能够结合细胞或抗原的任何形式的支持物。熟知的支持物包括用于组织培养的塑料，玻璃，聚苯乙烯，聚丙烯，聚乙烯，葡聚糖，尼龙，淀粉酶，天然和修饰的纤维素，聚丙烯酰胺，辉长岩和磁铁矿。针对发明目的，载体的性质可以是一定程度上可溶的或者不溶的。支持物材料实际上可以具有任何可能的结构构型，只要偶联的分子能够与细胞结合即可。因此，支持物构型可以是球形，比如珠子；或者是圆柱形，比如在试管的内表面，或者杆的外表面。或者，表面可以是平的比如片状，试纸条等。优选的支持物包括聚苯乙烯珠子。所述支持物构型包括试管，珠子，微珠，孔，板，组织培养板，平板，微量培养板，微量滴定板，瓶子，棒，条带，小瓶，搅拌器等。固体支持物可以是磁性或非磁性的。本领域技术人员知道许多其他的适用于结合细胞或抗原的载体，或者很容易确定这些物质。

或者，可以在表达抗原的递呈细胞表面表达所述抗原。用在文中，“表达抗原的递呈细胞”是指在其表面表达目的抗原的细胞，其表达方式使得该抗原能够与附着在宿主细胞表面的免疫球蛋白分子相互作用。优选的表达抗原的递呈细胞被工程化成将目的抗原表达为重

组体蛋白质的形式，但抗原也可以是该细胞的天然抗原。可以利用本领域普通技术人员熟知的分子生物学和蛋白质表达技术，通过任何合适的方法来构建所述表达抗原的重组递呈细胞。通常用编码目的抗原的质粒载体转染合适的细胞，并筛选表达目的多肽抗原的细胞。优选表达抗原的重组递呈细胞能稳定地表达目的抗原。与表达抗原的递呈细胞相同类型，但没有被工程化而用于表达目的抗原的细胞在文中称为“无抗原递呈细胞”。任何合适的细胞系都可以用于制备表达抗原的递呈细胞。这类细胞系的例子包括，但不限于转化了 SV40 的猴肾 CVI 系 (COS-7, ATCC CRL165 1)；人胚肾系 (293, Graham 等, *J. Gen Virol.* 36:59(1977))；幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL10)；中国仓鼠卵巢巢细胞 DHFR (CHO, Urlaub 和 Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216(1980))；小鼠足细胞 (TM3, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251(1980))；猴肾细胞 (CVI ATCC CCL70)；非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)；人颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL2)；犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL34)；buffalo rat 肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL1442)；人肺细胞 (W138, ATCC CCL75)；人肝细胞 (hep G2, HB8065)；小鼠乳腺癌 (MMT060562, ATCC CCL51)；TRI 细胞 (Mather 等, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68(1982))；NIH/3T3 细胞 (ATCC CRL-1658) 以及小鼠 L 细胞 (ATCC CCL-1)。其他细胞系对本领域普通技术人员是显而易见的。从美国典型培养物保藏中心 (10801 University Boulevard, Manassas, VA20110-2209) 可以得到多种细胞系。

本领域普通技术人员明白，表达抗原的递呈细胞在其表面除了目的抗原外还含有许多天然的抗原决定簇。预计本发明中那些在表面上表达广泛的不同免疫球蛋白分子或其抗原特异性片段的宿主细胞会与这些额外的抗原决定簇结合。因此，使用带有目的抗原的抗原表达递呈细胞与本发明的宿主细胞进行接触时，有必要首先去掉宿主细胞群中表达对所述其他抗原决定簇有活性的免疫球蛋白的那些宿主细胞群。本发明提供了用于从宿主细胞群中去掉能表达对无抗原递呈细胞

的天然表面抗原有特异性的免疫球蛋白分子的宿主细胞。图 5 显示了这种方法。大体上说，这些方法包括在将宿主细胞群与表达抗原的递呈细胞进行接触前，将宿主细胞群与无抗原递呈细胞接触。

在一个实施方案中，该方法包括将宿主细胞群吸附到结合在固体基质上的无抗原递呈细胞上。回收不结合的细胞和/或其中包含的多核苷酸，然后将回收到的宿主细胞或者导入了回收到的多核苷酸的新宿主细胞与抗原表达递呈细胞进行接触。在那些将宿主细胞池与抗原进行接触的选择方法中，宿主细胞池就吸附到结合在固体基质上的无抗原递呈细胞上。回收获合中不结合的细胞和/或其中含有的多核苷酸，然后将回收到的宿主细胞或者导入了回收到的多核苷酸的宿主细胞与抗原表达递呈细胞进行接触。

在另一个实施方案中，所述方法包括将宿主细胞群与无抗原递呈细胞在这样的条件下进行接触，其中表达与无抗原递呈细胞上的抗原决定簇的表面抗原反应的表面免疫球蛋白分子的那些宿主细胞，在宿主细胞表面上的免疫球蛋白分子发生交联时，发生前面描述过的细胞程序化死亡（例如细胞凋亡），直接或间接细胞死亡或者细胞信号传导（即表达报道分子）。然后回收那些没有发生细胞死亡或者不表达报道分子的宿主细胞，或者更具体地说，回收来自那些宿主细胞的第一或第二文库的多核苷酸。例如，如果表达免疫球蛋白分子的宿主细胞群仍然附着在固体基质上，并且发生细胞死亡的那些细胞从基质上释放下来，则吸出并弃去培养液的内容物，回收保持附着的细胞以及其中所包含的多核苷酸。

本领域普通技术人员明白，要去掉宿主细胞群中那些表达与无抗原递呈细胞携带的抗原决定簇反应的免疫球蛋白的宿主细胞，可能需要多轮淘汰。我们进一步设想可以用逐轮富集这样一些宿主细胞来代替逐轮淘汰，这些细胞表达可与抗原表达递呈细胞上所表达的目的抗原特异结合的免疫球蛋白分子。

在另一个实施方案中，提供了一种基于免疫球蛋白分子的抗原特异功能的筛选方法来回收编码免疫球蛋白分子或其抗原特异性功能片

段的多核苷酸。根据这种方法，制备表达完全可溶的免疫球蛋白分子的宿主细胞池。允许进行表达，通过需要某种特定抗原特异性的不同功能测定法来检测得到的细胞培养基。根据该方法，被检测的“功能”可以是免疫球蛋白分子执行的常规效应子功能，例如病毒中和，调理作用，ADCC，拮抗剂/激动剂活性，组胺释放，血细胞凝集或者血细胞凝集抑制。或者，所述“功能”仅指结合抗原。

在一个相关的实施方案中，提供了一种选择具有已知抗原特异性、但效应子功能发生改变的免疫球蛋白分子的筛选方法。根据这些实施方案，构建具有已知抗原特异性、但在已知参与给定效应子功能的恒定结构域中发生改变的免疫球蛋白亚基多肽文库。根据该方法，制备表达完全可溶的免疫球蛋白分子的宿主细胞池。允许表达，通过不同功能性测定法检测得到的细胞培养基中提高或被抑制的活性。根据该方法，被检测的“功能”可以是免疫球蛋白分子所执行的常规效应子功能，例如病毒中和，调理作用，补体结合，ADCC，拮抗剂/激动剂活性，组胺释放，血细胞凝集或者血细胞凝集抑制。

参照以上描述的免疫球蛋白鉴定方法的第一个步骤，可以如下实施对效应子功能的筛选。如上所述，将编码完全分泌的免疫球蛋白亚基多肽的第一多核苷酸文库分成多个池，每个池含有大约 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 或 10^9 个编码带有不同可变区之完全分泌的免疫球蛋白亚基多肽的不同多核苷酸。优选每个池开始含有大约 10^3 个多核苷酸。将每个池扩增，留一份复制试样用于后面的回收。在多核苷酸池构建在病毒载体（优选痘病毒，更优选痘苗病毒）的情况下，可以通过例如将高滴度病毒文库原液稀释，用其中的一部分以低 MOI（例如 $MOI < 0.1$ ）感染组织培养细胞的微量培养物来制备所述池。通常经过 48 小时的感染后，病毒滴度获得 1000 倍以上的扩增。在多个单独集中扩增病毒滴度减少了由于竞争性亚群相对迅速的生长造成重组体亚群丢失的危险。

然后用病毒池感染与所制备的病毒池数量相等的宿主细胞池。每个池感染的宿主细胞的数量取决于该集中含有的多核苷酸的数量和所

需的 MOI。基本上，在本方法中可以使用能被所用病毒载体感染，并能表达完全分泌的免疫球蛋白分子的任何宿主细胞。优选的宿主细胞包括免疫球蛋白阴性的浆细胞瘤细胞，例如 NS1 细胞，Sp2/0 细胞，或 P3 细胞，以及早期 B 细胞淋巴瘤细胞。这些细胞可以悬浮培养或者附着在固体表面。将第二多核苷酸文库也导入宿主细胞池，并允许表达完全分泌的免疫球蛋白分子或其片段。

然后回收其中培养着宿主细胞池的条件培养基，通过标准化的功能测试来检测应答特异目的抗原的效应子功能。

任何合适的功能测试均可用于该方法。例如，可以在病毒中和测试中检测收获到的细胞上清液中能够中和目标病毒（例如 HIV）的免疫球蛋白分子。或者，可以检测收获到的细胞上清液阻断或促进（即作为拮抗剂或激动剂）目标细胞功能（例如细胞凋亡）的能力。下面的实施例中描述了示范性的合适的功能测试。用在文中，“功能性测试”也包括例如利用本领域普通技术人员熟知的常规 ELISA 测定法简单地检测抗原结合。

当生长着给定宿主细胞池的条件培养基具有所需功能时，从开始扩增该多核苷酸池时留下的试样中回收该池的宿主细胞中包含的第一文库的多核苷酸。

为了进一步富集第一文库中编码抗原特异性免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸，将上面回收到的多核苷酸分成多个亚池。建立亚池使之比上面使用的池含有更少的不同成员。例如，如果每个第一池含有 10^3 个不同的多核苷酸，建立的亚池每个应平均含有大约 10 或 100 个不同多核苷酸。将亚池与第二文库如上所述导入宿主细胞，允许表达完全分泌的免疫球蛋白分子或其片段。如上所述回收其中培养着宿主细胞池的条件培养基，通过标准化的功能测试来检测应答特异目的抗原的效应子功能，鉴定具有所需功能特性的条件培养基样品，从先前留下的复制集中回收该亚池宿主细胞所含有的第一文库的多核苷酸。本领域普通技术人员明白，可以将该过程再重复一或多次以便充分富集编码抗原特异性免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸。

一旦完成进一步选择和富集第一文库的多核苷酸的步骤，并分离这些多核苷酸后，进行类似的过程来回收第二文库的多核苷酸，它们作为免疫球蛋白分子或其片段的一部分，显示出所需的抗原特异性功能。

试剂盒。本发明进一步提供了用于选择真核宿主细胞内表达的抗原特异性重组体免疫球蛋白的试剂盒。该试剂盒包含一或多个容器，其中盛有完成文中描述的方法所需的一或多种成分。在一个实施方案中，该试剂盒包含：(a) 通过可操纵地连接转录调控区，编码多个第一免疫球蛋白亚基多肽的第一多核苷酸文库，其中每个第一免疫球蛋白亚基多肽包含：(i) 选自重链恒定区和轻链恒定区的第一免疫球蛋白恒定区，(ii) 与所述第一恒定区对应的免疫球蛋白可变区，以及(iii) 能够指导所述第一免疫球蛋白亚基多肽的细胞表面上表达或分泌的信号肽，其中所述第一文库构建在真核病毒载体中；(b) 通过可操纵地连接转录调控区，编码多个第二免疫球蛋白亚基多肽的第二多核苷酸文库，其中每个第二免疫球蛋白亚基多肽包含：(i) 选自重链恒定区和轻链恒定区的第二免疫球蛋白恒定区，其中该第二免疫球蛋白恒定区与第一免疫球蛋白恒定区不同，(ii) 与所述第二恒定区对应的免疫球蛋白可变区，以及(iii) 能够指导所述第二免疫球蛋白亚基多肽在细胞表面上表达或分泌的信号肽，其中所述第二免疫球蛋白亚基多肽能够与第一免疫球蛋白亚基多肽组合，从而形成表面免疫球蛋白分子，或其抗原特异性片段，附着到宿主细胞膜上，并且该第二文库构建在真核病毒载体中；和(c) 能够表达所述免疫球蛋白分子的宿主细胞群。在该试剂盒中，所述第一和第二文库都是以感染性病毒颗粒和灭活的病毒颗粒的形式提供的，其中所述灭活的病毒颗粒能感染宿主细胞，使它表达其中所包含的多肽，但不进行病毒复制。此外，试剂盒中提供的宿主细胞能表达可通过与抗原的相互作用来进行选择的抗原特异性免疫球蛋白分子。该试剂盒的用途与文中描述的方法相符。在某些实施方案中，试剂盒包括对照抗原和试剂以便使特定目的抗原的选择标准化。

分离的免疫球蛋白。本发明进一步提供了通过文中描述的任何一种方法制备的分离的抗原特异性免疫球蛋白或其片段。这些分离的免疫球蛋白可以用作诊断或治疗试剂。此外本发明提供了包含本发明所述分离的免疫球蛋白和药学可接受载体的组合物。

除非另外指出，实施本发明将采用细胞生物学，细胞培养，分子生物学，转基因生物学，微生物学，重组DNA和免疫学的常规技术，这些都是本领域的普通技术。这些技术在文献中有充分的解释。参见例如，Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1992), DNA Cloning, 卷 I 和 II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Mullis 等, 美国专利 4683195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins ed. 1984); Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins ed. 1984); Culture of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc. 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller 和 M. P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vol. 154 和 155 (Wu 等编辑), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer 和 Walker 编辑, Academic Press, London, 1987); Handbook of Experimental Immunology, Vol I-IV (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编辑, 1986); Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1986); 和 Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 和 Sons, Baltimore, Maryland (1989)。

Antibody Engineering, 2nd edition, C. A. K. Borrebaeck, ed., Oxford Univ. Press (1995) 中描述了抗体工程的一般原理。Protein Engineering, A Practical Approach, Richwood, D. 等, Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995) 中提出了蛋白质工程的一般原理。Nisonoff, A., Molecular Immunology, 2nd ed, Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); 以及 Steward, M. W., Antibodies, Their Structure and Function, Chapman and Hall, New York, NY (1984) 中分别提出了抗体和半抗体结合的基本原理。此外, 没有具体描绘的本领域已知的免疫学常规方法通常参照 Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites 等 (编辑), Basic and Clinical-Immunology (8th ed), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) 以及 Mishell 和 Shiigi (eds), Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., New York (1980) 进行。

提出免疫学基本原理的标准参考文献包括 Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein, J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, New York (1982); Kennett, R. 等, Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" in Burden, R. 等编辑, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol 13, Elsevier, Amsterdam (1984)。

实施例

实施例 1 构建特异性多样化的人免疫球蛋白文库

如下生成编码多种免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸文库。通过 PCR 扩增编码 VH (重链可变区)、VK (K 轻链可变区) 和 VL (入轻链可变区) 的基因。对于三种可变区基因家族的每一种, 构建重组质粒文库和痘苗病毒文库。将可变区基因插入基于 p7.5/tk 的转移/表达

质粒中，处于相应重链或轻链的免疫球蛋白前导序列和恒定区序列之间。应用该质粒，通过三分子重组来生成相应的疫苗病毒重组件，也可在转染进入经疫苗病毒感染的细胞后直接利用该质粒高水平表达免疫球蛋白链。首先用疫苗重链文库感染淋巴瘤细胞，然后用质粒轻链文库瞬时转染。IgM 与轻链的共表达将导致抗体分子的装配和表面表达。

1.1 按 pVHE。按如下所述构建包含人 μ 膜免疫球蛋白恒定区的表达载体，在本文中被命名为 PVHE。该策略如图 3 所示。利用可从 Clontech, Palo Alto, CA 获得的 SMART™ RACE cDNA 扩增试剂盒，从骨髓 RNA 分离编码膜结合型人 IgM 重链的 cDNA。利用下述引物进行 PCR：5' 引物 (huC μ 5B) /5'-ATTAGGATCCGGTCACCGTCTCCTCAGGG - 3'(SEQ ID NO:24) 和 3' 引物 (huC μ 3S) 5'-ATTAGTCGACTCATTTCACCTTGAACAAGGTGAC - 3' (SEQ ID NO: 25)。然后将 PCR 产物插入 pBluescript II/KS 的 BamHI 和 SalI 位点处，以便进行定点诱变，消除位于 CH2 和 CH4 结构域之间的 2 个 BstEII 位点。选择不改变这些位点处所编码的氨基酸的核苷酸取代。

通过下述方法，将如 Zauderer, PCT 公开号 WO 00/028016 以及下文实施例 5 中所述生成的质粒 p7.5/tk 转化成 pVHE。用包含下述限制性位点：NotI-NcoI-BssHII-BstEII-SalI 的盒子替换 P7.5/tk 中的多克隆位点 (MCS)，生成 p7.5/tk2。具有序列 5'-GCGGCCGCAAACCATGGAAAGCGCGCATATGGTCACCAAAGTCGAC - 3'的所述盒子在本文中被称作 SEQ ID NO: 26。将编码对应于 IgM 重链第 19—3 位氨基酸的信号肽序列的盒子克隆到 p7.5/tk2 内的 NcoI 和 BssHII 位点间，生成 p7.5/tk2L。然后将如上述生成的、经 BstEII 诱变的 IgM 重链克隆入 p7.5/tk2L 中的 BstEII 中的和 SalI 位点间，生成 pVHE。接着，将如下所述经 PCR 生成的、包含编码氨基酸 - 4 至 110 的核苷酸的重链可变区 (VH) 盒克隆到 pVHE 的 BssHII 和 BstEII 位点间，生成编码膜结合型重链的多核苷酸文库。由于 μ 重链序列和所选的限制酶位点之间的重叠，这将引起毗邻的膜结合型重链免疫球

蛋白亚基多肽以正确的翻译阅读框架进行表达。

1.2 pVHE. 如下构建文中称为 pVHE 的包含人 μ 分泌型免疫球蛋白恒定区的表达载体。图 8 显示了该策略。利用 SMART RACE cDNA Amplification Kit 从骨髓 RNA 中分离编码分泌型人 IgM 重链的 cDNA。上游引物 huC μ 5B 在 5' 端含有添加的 BamHI 位点和 BstEII 位点, 其后是 VH 的氨基酸 111-113 以及 C μ H1 的第一个氨基酸。下游引物 shuC μ 3S 含有分泌型 C μ 的最后 6 个氨基酸, 随后是一个终止密码子和 SalI 位点。这些引物具有以下序列:

huC μ 5B : 5'-ATTAGGATCCGGTCACCGTCTCCTCAGGG-3' (SEQ ID NO:27); 和

shuC μ 3S : 5'-ATTAGTCGACTCAGTAGCAGGTGCCAGCTGT-3' (SEQ ID NO:28).

然后将 PCR 产物插入 pBluescriptII/KS 的 BamHI 和 SalI 位点进行定点突变, 以便去掉位于 CH2 和 CH4 结构域的两个 BstEII 位点。选择这些位点编码的氨基酸没有发生变化的核苷酸取代。

通过以下方法将 1.1 部分制备的质粒 p7.5/tk2L 转化为 pVHEs。然后将如上所述制备的 BstEII 突变的分泌型 IgM 重链克隆到 p7.5/tk2L 中的 BstEII 和 SalI 位点, 从而产生 pVHEs。然后将通过以下描述的 PCR 制备的包含编码氨基酸-4 到 110 之核苷酸的重链可变区 (VH) 盒克隆到 pVHEs 中的 BssHII 和 BstEII 位点之间, 产生编码分泌型重链的多核苷酸文库。由于 μ 重链序列和所选的限制酶位点之间的重叠, 导致以正确的翻译读框表达毗邻的分泌型重链免疫球蛋白亚基多肽。

1.3 pVKE 和 pVLE. 如下构建文中命名为 pVKE 和 pVLE 的包含人 κ 和 λ 免疫球蛋白轻链恒定区的表达载体。图 4 显示了这个策略。

(a) 通过以下方法将质粒 p7.5/tk 转化为 pVKE。通过填平连接去掉 p7.5/tk 的两个 XhoI 和两个 HindIII 位点, 经标准方法将 3 个 ApaI 位点 (一个在主链中, 一个位于 ColE1 ori, 另一个在 Amp) 去掉, 用含有下列限制位点的盒替代 p7.5/tk 的多克隆位点 (MCS):

NotI-NcoI-ApaLI-XhoI-HindIII-SaII, 从而产生 p7.5/tk3。这个盒在文中称为 SEQ ID NO: 29, 其序列为 5'-GCGGCCGCC ATGGATACGT GCACTTGACT CGAGAAGCTT AGTAGTCGAC-3'。

将编码 κ 轻链中氨基酸-19 到-2 所对应的信号肽序列的盒克隆到 p7.5/tk3 中 NcoI 和 ApaLI 位点之间, 产生 p7.5/tk3L。利用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 如上所述从骨髓 RNA 中分离编码 C κ 区的 cDNA, 所用引物包含在编码氨基酸 104-107+C κ 的区域的 5'末端的 XhoI 位点, 终止密码子和 3'末端的 SaII。这些引物具有以下序列: huC κ 5 : 5'-CAGGACTCGA GATCAAACGA ACTGTGGCTG-3' (SEQ ID NO : 30); huC κ 3 : 5'AATATGTCGA CCTAACACTC TCCCCTGTTG AAGCTCTTT-3' (SEQ ID NO : 31); 以及 huC κ 3 : 5'-AATATGTCGA CCTAACACTC TCCCCTGTTG AAGCTCTT-3' (SEQ ID NO : 32)。然后将 C κ 盒克隆到 p7.5/tk3L 的 XhoI 和 SaII 位点之间, 产生 pVKE。然后将通过如下所述的 PCR 制备的包含编码氨基酸-3 到 105 的核苷酸的 κ 轻链可变区盒 (VK) 克隆到 pVKE 中 ApaLI 和 XhoI 位点之间。由于 κ 轻链序列和所选的限制酶位点存在重叠, 导致以正确翻译读框表达毗邻的 κ 轻链免疫球蛋白亚基多肽。

(b) 通过以下方法将质粒 p7.5/tk3L 转化为 pVLE。利用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 如上所述从骨髓 RNA 中分离编码 C κ 区的 cDNA, 所用引物在 5'末端有 HindIII 位点和编码 V λ 的氨基酸 105 到 107 的区域, 在 3'末端包含终止密码子和 SaII 位点。这些引物具有以下序列: huC λ 5 : 5'-ATTAAAGCTT ACCGTCCTAC GAACTGTGGC TGCACCATCT-3' (SEQ ID NO : 33); 和 huC λ 3 (SEQ ID NO : 31)。然后将 C κ 盒插入 p7.5/tk3L 中 HindIII 和 SaII 位点, 产生 pVLE。然后将通过如下所述 PCR 制备的包含编码氨基酸-3 到 140 的核苷酸的 λ 轻链可变区盒 (VL) 克隆到 pVLE 中 ApaLI 和 HindIII 位点之间。由于 λ 轻链序列和所选的限制酶位点存在重叠,

导致以正确翻译读框表达毗邻 λ 轻链免疫球蛋白亚基多肽。

1. 4 可变区。通过以下方法，经 PCR 分离重链， κ 轻链和 λ 轻链可变区，用于克隆到如上所述制备的表达载体中。分离自从多个供体收获到的正常人骨髓 RNA (Clontech 有售) 用于合成 cDNA。cDNA 制备物的小份试样用于 PCR 扩增，引物对选自以下几套引物：VH/JH, VK/JK 或 VL/JL。表 1 和 2 列出了用于扩增可变区的引物。

(a) 重链可变区。由于质粒表达载体的设计方式，VH 引物 (即用于扩增重链 V 区的引物对中的正向引物) 具有以下一般构型，其中 BssHII 限制位点用下划线显示：

VH 引物：GCGCGCACTCC- VH FR1 引物的开端。

设计引物之包含编码前导序列最后 4 个氨基酸的密码子，其中 BssHII 位点编码氨基酸-4 到-3，随后是 VH 家族特异的 FR1 序列。表 1 和 2 列出了不同家族特异性 VH 引物的序列。因为重链可变区最后 5 个氨基酸 (即氨基酸 109-113，在 6 种人重链 J 区中是相同的) 包含在质粒 pVHE 中，JH 引物 (即用于扩增重链可变区的反向引物) 具有以下构型从而包括编码氨基酸 109 到 110 的 BstEII 位点 (下划线显示)：

JH 引物：- VH 的氨基酸 103-108 的编码核苷酸序列 (以 G 结束) -GTCACC

利用这些引物，VH PCR 产物以编码氨基酸-4 到 110 的密码子开始，其中 BssHII 是氨基酸-4 和-3，以位于氨基酸 109 和 110 的密码子的 BstEII 位点结束。用合适的限制酶消化后，将这些 PCR 产物克隆到用 BssHII 和 BstEII 消化过的 pVHE 内。

为了扩增多数可能的重排重链可变区，使用表 1 和 2 所示的 VH 和 JH 引物族。VH1, 3, 和 4 家族占人基因组中存在的 51 种 V 区中的 44 种。表达载体中包含编码氨基酸 109-113 的密码子就排除了使用单个通用 JH 引物。但是，对每个 VH 引物可以合并表 1 和 2 所示的 5 个 JH 引物来减少所需 PCR 反应的次数。

(b) κ 轻链可变区。VK 引物，即用于扩增 κ 轻链可变区的正向引

物具有以下一般构型，其中下划线显示了 ApaLI 限制位点：

VK 引物：GTGCACTCC-V κ FR1 引物的开始

VK 引物含有编码 κ 轻链前导序列最后 3 个氨基酸的密码子，其中 ApaLI 位点编码氨基酸-3 和-2，随后是 VK 家族特异性 FR1 序列。因为编码 κ 轻链可变区最后 4 个氨基酸（氨基酸 104-107）的密码子包括在表达载体 pVKE 中，故 JK 引物，即用于扩增 κ 轻链可变区的反向引物，展现以下构型：

JK 引物：

-编码 VK 的氨基酸 98-103 的核苷酸序列-CTCGAG

XhoI 位点(以下划线显示)包含编码 κ 轻链可变区的氨基酸 104-105 的密码子。编码 κ 轻链可变区的 PCR 产物以氨基酸-3 的密码子开始，以氨基酸 105 的密码子结束，其中具有包含氨基酸-3 和-2 的密码子的 ApaLI 位点，和包含氨基酸 104 和 105 的密码子的 XhoI 位点。VK1/4 和 VK3/6 引物各有两个简并核苷酸位点。利用这些 JK 引物（参见表 1 和 2），JK1、3 和 4 在氨基酸 104 处将发生 Val 到 Leu 的突变，JK3 在氨基酸 105 处发生 Asp 到 Glu 的突变。

(c) λ 轻链可变区。VL 引物，即用于扩增 λ 轻链可变区的引物对中的正向引物具有以下一般构型，其中 ApaLI 限制位点以下划线显示：

VL 引物：GTGCACTCC-VL 的开端

所述 ApaLI 位点包含编码氨基酸-3 和-2 的密码子，随后是 VL 家族特异性 FR1 序列。因为编码 VL 最后 5 个氨基酸（氨基酸 103-107）的密码子包含在表达载体 pVLE 中，故 JL 引物显示出以下构型，从而包括含有编码氨基酸 103-104 的密码子的 HindIII 位点（以下划线显示）：

JL 引物：- VL 中氨基酸 97-102 的核苷酸序列-AAGCTT

编码 λ 轻链可变区的 PCR 产物以氨基酸-3 的密码子开始，以氨基酸 104 的密码子结束，其中的 ApaLI 位点包含氨基酸-3 和-2 的密码子，HindIII 位点包含氨基酸 103 和 104 的密码子。

表 1. 用于 PCR 扩增人免疫球蛋白可变区的寡核苷酸引物。克隆使

用的限制酶的识别位点以粗体字显示。引物序列从 5' 到 3'。

VH1 (SEQ ID NO:34)	TTT TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
VH2 (SEQ ID NO:144)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT GG
VH3 (SEQ ID NO:35)	TTT TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
VH4 (SEQ ID NO:36)	TTT TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG
VH5 (SEQ ID NO:145)	AATA TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT G

JH1 (SEQ ID NO:37)	GAC GGT GAC CAG GGT GCC CTG GCC CCA
JH2 (SEQ ID NO:38)	GAC GGT GAC CAG GGT GCC ACG GCC CCA
JH3 (SEQ ID NO:39)	GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC CCA
JH4/5 (SEQ ID NO:40)	GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA
JH6 (SEQ ID NO:41)	GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA
VK1 (SEQ ID NO:42)	TTT GTG CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
VK2 (SEQ ID NO:43)	TTT GTG CAC TCC GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC
VK3 (SEQ ID NO:44)	TTT GTG CAC TCC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC
VK4 (SEQ ID NO:45)	TTT GTG CAC TCC GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC
VK5 (SEQ ID NO:46)	TTT GTG CAC TCC GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC
VK6 (SEQ ID NO:47)	TTT GTG CAC TCC GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC
JK1 (SEQ ID NO:48)	GAT CTC GAG CTT GGT CCC TTG GCC GAA
JK2 (SEQ ID NO:49)	GAT CTC GAG CTT GGT CCC CTG GCC AAA
JK3 (SEQ ID NO:50)	GAT CTC GAG TTT GGT CCC AGG GCC GAA

JK4 (SEQ ID NO:51)	GAT CTC GAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA
JK5 (SEQ ID NO:52)	AAT CTC GAG TCG TGT CCC TTG GCC GAA
VL1 (SEQ ID NO:53)	TTT GTG CAC TCC CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC
VL2 (SEQ ID NO:54)	TTT GTG CAC TCC CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GC
VL3A (SEQ ID NO:55)	TTT GTG CAC TCC TCC TAT GTG CTG ACT CAG CCA CC
VL3B (SEQ ID NO:56)	TTT GTG CAC TCC TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC
VL4 (SEQ ID NO:57)	TTT GTG CAC TCC CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC
VL5 (SEQ ID NO:58)	TTT GTG CAC TCC CAG GCT GTG CTC ACT CAG CCG TC
VL6 (SEQ ID NO:59)	TTT GTG CAC TCC AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA
VL7 (SEQ ID NO:60)	TTT GTG CAC TCC CAG GCT GTG GTG ACT CAG GAG CC
JL1 (SEQ ID NO:61)	GGT AAG CTT GGT CCC AGT TCC GAA GAC
JL2/3 (SEQ ID NO:62)	GGT AAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA T

表 2. 用于 PCR 扩增人免疫球蛋白可变区的寡核苷酸引物。克隆使用的限制酶的识别位点以粗体字显示。引物序列以从 5'到 3'的方向表示。

VH1a (SEQ ID NO:63)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
VH2a (SEQ ID NO:64)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT GG
VH3a (SEQ ID NO:65)	AATA TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
VH4a (SEQ ID NO:66)	AATA TGC GCG CAC TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG
VH5a (SEQ ID NO:67)	AATA TGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT G
JH1a (SEQ ID NO:68)	GA GAC GGT GAC CAG GGT GCC CTG GCC CCA
JH2a (SEQ ID NO:69)	GA GAC GGT GAC CAG GGT GCC ACG GCC CCA
JH3a (SEQ ID NO:70)	GA GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC CCA
JH4/5a (SEQ ID NO:71)	GA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA
JH6a (SEQ ID NO:72)	GA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA
VK1a (SEQ ID NO:73)	CAGGA GTG CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
VK2a (SEQ ID NO:74)	CAGGA GTG CAC TCC GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC

VK3a (SEQ ID NO:75)	CAGGA GTG CAC TCC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC
VK4a (SEQ ID NO:76)	CAGGA GTG CAC TCC GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC
VK5a (SEQ ID NO:77)	CAGGA GTG CAC TCC GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC
VK6a (SEQ ID NO:78)	CAGGA GTG CAC TCC GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC
JK1a (SEQ ID NO:79)	TT GAT CTC GAG CTT GGT CCC TTG GCC GAA
JK2a (SEQ ID NO:80)	TT GAT CTC GAG CTT GGT CCC CTG GCC AAA
JK3a (SEQ ID NO:81)	TT GAT CTC GAG TTT GGT CCC AGG GCC GAA
JK4a (SEQ ID NO:82)	TT GAT CTC GAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA
JK5a (SEQ ID NO:83)	TT AAT CTC GAG TCG TGT CCC TTG GCC GAA
VL1a (SEQ ID NO:84)	CAGAT GTG CAC TCC CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC
VL2a (SEQ ID NO:85)	CAGAT GTG CAC TCC CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GC
VL3Aa (SEQ ID NO:86)	CAGAT GTG CAC TCC TCC TAT GTG CTG ACT CAG CCA CC
VL3Ba (SEQ ID NO:87)	CAGAT GTG CAC TCC TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC
VL4a (SEQ ID NO:88)	CAGAT GTG CAC TCC CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC

VL5a (SEQ ID NO:89)	CAGAT GTG CAC TCC CAG GCT GTG CTC ACT CAG CCG TC
VL6a (SEQ ID NO:90)	CAGAT GTG CAC TCC AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA
VL7a (SEQ ID NO:91)	CAGAT GTG CAC TCC CAG GCT GTG GTG ACT CAG GAG CC
JL1a (SEQ ID NO:92)	AC GGT AAG CTT GGT CCC AGT TCC GAA GAC
JL2/3a (SEQ ID NO:93)	AC GGT AAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA TAC

实施例 2

结合特异抗原的人免疫球蛋白的选择策略

如下选择包含编码重组体重链免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸的痘病毒表达载体，所述免疫球蛋白亚基多肽与某些未鉴定的轻链组合时能给特定抗原赋予特异性，如图 1 所示。特异免疫球蛋白重链和轻链的选择分两个阶段完成。首先，利用如实施例 1 所述构建的 pVHE 为转移质粒，通过三分子重组（见实施例 5），在基于痘病毒的载体中构建来自未免疫或免疫供体的抗体产生细胞的多样化重链文库；在如实施例 1 所述构建的比如 pVKE 和 pVLE 等质粒载体中构建免疫球蛋白轻链的类似文库，其中重组体基因的表达由 p7.5 痘病毒启动子调控。痘病毒构建体中的免疫球蛋白重链恒定区设计成保留跨膜结构域，导致在表面膜上表达免疫球蛋白受体。用感染复数为 1（MOI=1）的痘病毒重链文库感染宿主细胞，例如早期 B 细胞淋巴瘤细胞。2 小时后，用轻链质粒文库在允许每个细胞能摄取并表达平均 10 个或更多单独轻链质粒的条件下转染已被感染的细胞。因为该质粒中重组体基因的表达受到痘病毒启动子的调控，故重组体基因产物在感染了痘病毒的细胞的胞质内高水平表达，而无需核整合。在

这些条件下，单个细胞能表达多种抗体，其中不同轻链与相同重链相组合，在每个被感染细胞中形成特征性的 H2L2 结构。

2.1 直接的抗原诱导性细胞凋亡。用编码重组体重链免疫球蛋白亚基多肽的重组体痘苗病毒感染早期 B 细胞淋巴瘤宿主细胞，并用所述的编码重组体轻链免疫球蛋白亚基多肽的质粒进行转染。宿主细胞通过诱导自发的生长抑制和细胞程序化死亡而对抗原特异性免疫球蛋白受体的交联产生应答。如图 1 的概述，允许抗体分子的合成和装配进行 12 小时或更长，这个过程中特异性抗原呈递在合成颗粒或聚合物上，或者在抗原表达细胞的表面，以便与任何特异性免疫球蛋白受体发生交联，并诱导所选的抗原表达指示细胞的细胞凋亡。对提取自被诱导发生细胞凋亡的细胞的重组体痘苗病毒基因组中富集编码赋予所需特异性的免疫球蛋白重链基因的多核苷酸。

2.2 间接的抗原诱导性细胞死亡。如图 2A（下栏）和 2B（上栏）所示，用构建体转染早期 B 细胞淋巴瘤宿主细胞，该构建体中细胞凋亡诱导基因的启动子（BAX 启动子）驱动外来细胞毒性 T 细胞表位的表达。宿主细胞在应答抗原特异性免疫球蛋白受体的交联时表达 CTL 表位，这些交联的细胞在加入特异 CTL 时将发生水解现象。然后这些稳定转染的宿主细胞被编码重组体重链免疫球蛋白亚基多肽的重组体痘苗病毒感染，并转染编码重组体轻链免疫球蛋白亚基多肽的质粒。如图 1 所概括的，允许抗体分子的合成和装配进行 12 小时或更长，这个过程中特异性抗原呈递在合成颗粒或聚合物上，或者在抗原表达细胞的表面，以便使任何特异性免疫球蛋白受体发生交联。加入表位特异性 CTL 时，那些表面免疫球蛋白分子发生交联的细胞发生水解现象，从而间接诱导细胞死亡。

2.3 直接的抗原诱导性细胞死亡。如图 2A（上栏）和 2B（下栏）所示，用构建体转染早期 B 细胞淋巴瘤宿主细胞，该构建体中细胞凋亡诱导基因的启动子（BAX 启动子）驱动着白喉毒素的细胞毒性 A 亚基的表达。宿主细胞在应答抗原特异性免疫球蛋白受体的交联时表达毒素亚基，这些交联的细胞将经历细胞死亡。然后这些稳定转染

的宿主细胞被编码重组体重链免疫球蛋白亚基多肽的重组体痘苗病毒感染，并转染编码重组体轻链免疫球蛋白亚基多肽的质粒。如图 1 所概括的，使抗体分子的合成和装配进行 12 小时或更长，这个过程中特异性抗原呈递在合成颗粒或聚合物上，或者在抗原表达细胞的表面上，以便使任何特异性免疫球蛋白受体发生交联。那些表面免疫球蛋白分子发生交联的细胞迅速并直接经历细胞死亡。

2.4 讨论。这些重组体基因的表达被交联的表面 Ig 受体上调的原因是，两个构建体每个的表达都由这样一种基因的启动子调控，该基因在早期 B 细胞淋巴瘤细胞中的表达在 Ig 交联后被自然上调。这可以通过 BAX 启动子来说明。BAX 是前细胞凋亡性基因 (proapoptotic gene) 的例子，它们通常在这些条件下在早期 B 细胞淋巴瘤细胞中被上调。其他基因的调控区 (启动子) 可能表现一样好或更好。通过例如比较早期 B 细胞淋巴瘤细胞在微阵列上交联膜 Ig 前后的基因表达谱可以鉴定这类基因。

用构建体转染细胞，使之表达白喉 A 链 (dipA)，比只通过 Ig 交联发生更迅速的细胞凋亡。通过加入某些靶肽的特异细胞毒性 T 细胞可以诱导更迅速的细胞死亡，所述靶肽与该细胞上表达的天然 MHC 分子有关，是由其表达受到 BAX 或类 BAX 启动子调控的微小基因编码的。此外，将早期 B 细胞淋巴瘤细胞之外的其他宿主细胞同样地工程化使之表达在表面免疫球蛋白分子发生抗原交联时能直接或间接诱导细胞死亡的基因，所述细胞死亡独立于程序化细胞凋亡，后者发生在抗原交联时的早期 B 细胞淋巴瘤细胞系内。

在以上选择过程中，可以采用多种基质来呈递抗原和交联特异的膜免疫球蛋白受体。它们包括，但不限于磁珠，包被蛋白质的组织培养板，以及转染了编码目的抗原的基因的细胞。可以转染用于高效表达目的抗原的细胞的例子包括，但不限于 L 细胞和 NIH 3T3 细胞。但是，如果运用转染的细胞来表达和呈递重组体抗原，则有必要首先除去表达免疫球蛋白的宿主细胞群中的任何能表达与未转染细胞的膜抗原有反应的抗体的宿主细胞。这种去除可以通过一或多轮吸附到固定

在固体基质上的未转染细胞上来实现。然后就有可能利用表达抗原的转染子来正选择表达特异重组体抗体的细胞。在一个优选实施方案中，重复进行交替循环的负和正选择，直到达到预期的富集效果。

在正选择步骤的一个实施例中，使表达抗体的 B 淋巴细胞瘤细胞粘着在固体基质上，该基质上已经结合了 B 细胞特异性的抗 CD19 和/或抗 CD20 抗体。诱导发生水解现象的粘着指示细胞，以将它们的胞质内容物，包括所有病毒免疫球蛋白重链重组体释放到培养液中。将收获自从培养液中回收的细胞和细胞碎片的重组体病毒进行富集，富集那些编码在与某些还未被鉴定的轻链组合时能赋予对选择抗原的特异性的免疫球蛋白重链的重组体病毒。在新感染了该富集重组体病毒群并随后用同样的编码各种轻链的未经选择的起始质粒群转染的细胞中进行另外几轮抗原驱动的选择，导致进一步富集目的重链。将该选择过程重复几次后，分离到少量重链，这些重链在与某些未鉴定的轻链结合时对特定抗原具备最佳特异性。

为了选择到与先前选择的重链结合时能赋予所需特异性的轻链，通过以 MOI=1、用构建在基于痘苗的载体中的轻链重组体文库来感染宿主细胞，随后用先前选择的重链之一的质粒重组体进行转染来重复如上所述的整个选择过程。进行几个循环的上述抗原驱动的选择过程可以分离到该重链的最佳轻链搭档。

在另一个优选实施方案中，利用在膜表面表达特异抗体的细胞的结合特性进行了类似的策略。该策略如图 5 所阐述的，没有运用对受体交联产生细胞凋亡应答的早期 B 细胞淋巴瘤作为指示细胞，而是通过结合到偶联了抗原的合成颗粒或聚合物，或者结合到表达特异抗原的转染细胞的表面来选择表达目的免疫球蛋白特异性的宿主细胞。这种情况中，指示细胞是由于其高水平表达膜免疫球蛋白受体的能力，而非对膜免疫球蛋白受体交联产生细胞凋亡应答而被选用的。优选的细胞系包括免疫球蛋白阴性浆细胞瘤。与选择过程的特异性，背景和效率有关的其他问题按照以上的描述处理。

实施例 3

从 10^9 种免疫球蛋白重链和轻链组合的文库中选择具有特定特异性的抗体。

可选自一个文库的特异抗体的亲和力是该文库大小的函数。通常，文库所代表的重链和轻链组合的数目越大，存在并选择到高亲和力抗体的可能性就越大。采用噬菌体展示法进行的先前工作提示，对于许多抗原来说，一个包含 10^9 种免疫球蛋白重链和轻链组合的文库大小足够选择到比较高亲合力的特异性抗体。理论上，有可能构建一个有 10^9 个重组体的文库，其中每个重组体表达一种独特的重链和一种独特的轻链，或者具有包含了重链和轻链可变区的组合位点的单链构建体。但是最优选的方法是通过构建 10^5 个免疫球蛋白重链和 10^4 个免疫球蛋白轻链的两个文库，它们可以共表达出所有 10^9 种可能的组合，从而产生这个数目的抗体组合。本实施例中，重链池有更大的多样性，因为经常发现重链比相关的轻链对特异抗原结合位点起到更大的作用。

3.1 重链基因。由最小 10^5 个免疫球蛋白重链 cDNA 转移质粒重组体构建滴度约为 10^6 的痘苗重组体文库，其中的质粒重组体是通过前面描述的方法（实施例 1）由来源于 100 个骨髓供体池的 RNA 合成的。如下文所述，必须将该文库扩增至滴度至少为 10^9 个重链重组体。一个优选的扩增文库的方法是用有 10^3 个痘苗重链重组体的单个池感染大约 5×10^4 个 BSC1 细胞的微培养物。通常经过 48 小时的感染后，病毒滴度可以扩增 1000 倍以上。在多个单独集中扩增病毒滴度可以减少由于竞争性亚群生长相对迅速而丢失重组体亚群的危险。

3.2 轻链基因。由最小 10^4 个免疫球蛋白轻链 cDNA 转移质粒重组体构建滴度约为 10^5 的痘苗重组体文库，其中的质粒重组体是如实施例 1 所述由来源于骨髓供体池的 RNA 合成的。为了用于下文描述的重链的多轮选择，必须将该文库扩增至滴度为 10^{10} 到 10^{11} 个轻链重组体。一个优选的扩增文库的方法是用有 10^3 个痘苗轻链重组体的单个池感染大约 5×10^4 个 BSC1 细胞的 100 份微培养物。将从这 100 个被

感染培养物中的每一个回收的病毒重组体进一步扩增为滴度大约在 10^8 到 10^9 个病毒重组体的单独池。为方便起见，将这些轻链池标记为 L1 到 L100。

3.3 选择免疫球蛋白重链重组体。对 100 份 10^7 个非产生性骨髓瘤细胞的培养物，优选 Sp2/0，或早期 B 细胞淋巴瘤，优选 CH33，以 MOI=1 用活的疫苗重链重组体进行感染，同时感染 MOI=1 到 10 的经补骨脂素(4'-氨基三甲沙林)灭活的疫苗轻链重组体(见下文)。为了进行补骨脂素灭活，用 $10 \mu\text{g/ml}$ 的补骨脂素将 10^8 到 10^9 pfu/ml 的无细胞病毒在 25°C 处理 10 分钟，然后暴露于长波 UV 线(365-nm)2 分钟(Tsung, K., J. H. Yim, W. Marti, R. M. L. Buller, 和 J. A. Norton. *J. Virol.* 70: 165-171 (1996))。经补骨脂素处理的病毒不能复制，但能表达早期病毒基因，包括处于早期但不是晚期病毒启动子调控下的重组基因。在这些条件下，由经补骨脂素处理的重组体合成的轻链可以与每个感染细胞中表达的单种重链装配成免疫球蛋白分子。

选择以 MOI=1 还是 MOI=10 用经补骨脂素灭活的轻链重组体进行感染会影响特定 H+L 链组合在一个阳性细胞内的相对浓度，即在 MOI=1 时高，在 MOI=10 时比较低(因为被多个轻链稀释)。细胞表面上特异免疫球蛋白浓度低，相应地密度下降，会选择出对目的配体亲和力高的抗体。另一方面，预计高浓度的特异受体能促进经免疫球蛋白受体介导的结合或信号传导。

通过实施例 2 描述的结合或信号传导进行第一轮抗原特异性选择后，从每个培养物中回收重组体病毒的富集群，其滴度在这个初选过程中可能是加入病毒的滴度的 1%到 10%，取决于非特异性结合或病毒的自发释放的背景水平。为方便起见，将第一轮选择中回收的重链重组体池标记为 H1a 到 H100a，所述池获得了分别来自起始轻链重组体池 L1 到 L100 的经补骨脂素处理的病毒。

为了在与第一轮相同的条件下进行第二轮选择，还是有必要将回收到的重链重组体的滴度扩增 10 到 100 倍。对于第二轮选择，再用

活的病毒重链重组体和经补骨脂素处理过的轻链重组体感染非产生性骨髓瘤或早期 B 细胞淋巴瘤，从而，例如用从池 H37a 中回收的重链重组体和来自用于选择 H37a 的起始 L37 池的经补骨脂素处理的轻链重组体感染 10^7 个细胞的不同培养物。为方便起见，将第二轮选择中回收自 H37a 池的重链重组体标记为 H37b 等。

第二轮选择后，特异病毒重组体与开始的病毒群体相比通常可能被富集了 10 倍或以上。这种情况下，不需要在和第一轮或第二轮相同的条件下进行第三轮选择，因为即使是在低 10 倍的滴度下，特异克隆也可以得到很好体现。因此对于第三轮选择，再用活的病毒重链重组体和来自相同池的经补骨脂素处理过的轻链重组体感染 10^6 个非产生性骨髓瘤或早期 B 细胞淋巴瘤细胞的 100 份培养物。第 5 轮选择后，感染细胞的数量可以再减少 10 倍。

3.4 鉴定抗原特异性重链重组体。

(a) 每轮选择后，都可以确定特定池（例如 H37f）中抗原特异性重链是否富集到 10% 或以上，这可以通过从该重链集中挑出 10 个单个病毒 pfu 检测与原始 L37 池的轻链相连时的抗原特异性。因为轻链群体包含分布在 100 个单独集中的 10^4 个不同 cDNA，每个池平均有大约 10^2 个不同轻链。即使所选的重链仅在与可供利用的轻链集中的某一类轻链结合时才能赋予所需抗原特异性，仍有 1% 感染了所选重链重组体和 MOI=1 的随机轻链池的细胞能表达所需特异性。如果细胞是用 MOI=10 的轻链感染的，这个频率可以提高到平均 10%。优选的证实特异性的方法是用免疫球蛋白重链和轻链池感染 CH33 早期 B 细胞淋巴瘤细胞系，该细胞系已经转染了容易检测的报道分子构建体，例如由 BAX 或另一个可被膜受体交联激活的 CH33 基因的启动子所驱动的萤光素。如果选择出来的重链在与该集中的 100 种或更多轻链中的任何一种相连时能赋予所需的抗原特异性，则用噬斑纯化的重链重组体和相关轻链池感染该转染子后会产生容易检测到的信号。注意这一相同的方法可以用于分析重链，无论它们是通过被感染细胞的免疫球蛋白受体介导的特异结合还是特异信号传导选择的。

(b) 鉴定最有前景的抗原特异性重链的替代方法是筛选在所选群体中最有代表性的那些。可以利用插入位点旁侧的载体特异引物通过 PCR 扩增分离插入片段, 并且可以将这些插入片段测序来确定所观察到的序列的频率。但是, 这种情况中, 仍然需要象下文描述的那样鉴定相关的轻链。

3.5 选择免疫球蛋白轻链重组体。一旦分离到抗原特异性重链, 可以如 3.4(a) 所述从用于选择重链的集中分离与该重链结合时能赋予抗原特异性的轻链。或者, 也可以从更大的文库中选择在与同一重链结合时能增强亲和力的另一个轻链。为了这个目的, 由最少 10^5 个免疫球蛋白轻链 cDNA 转移质粒重组体构建滴度大约为 10^6 的痘苗重组体文库, 其中转移质粒重组体是通过前面描述的方法 (实施例 1) 合成的。将 3.3 中描述的程序颠倒, 现在用 MOI=1 的活病毒轻链重组体和选择出来的补骨脂素处理过的单个特异性重链重组体来感染非产生性骨髓瘤或早期 B 细胞淋巴瘤。为了促进选择到更高亲和力的免疫球蛋白, 优选通过用 MOI=10 的轻链进行感染来稀释每个特异 H+L 链对的浓度。

3.6 在有单个免疫球蛋白轻链存在的情况下选择免疫球蛋白重链重组体。如果已经鉴定到一个候选轻链, 则可以简化对特定抗体特异性有贡献的免疫球蛋白重链的选择过程。在例如先前选择一个鼠单克隆抗体时就可能如此。可以将鼠轻链可变区移植到人轻链恒定区上来优化与人重链的配对, 这个过程以前被其他采用噬菌体展示法的研究人员称为“指导性选择”(Jespers, L. S., A. Roberts, S. M. Mahler, G. Winter, H. R. 和 Hoogenboom. *Bio/Technology* 12: 899-903, 1994; Figini, M., L. Obici, D. Mezzanzanica, A. Griffiths, M. I. Colnaghi, G. Winters, 和 S. Canevari. *Cancer Res.* 58: 991-996, 1998)。理论上, 如果人可变区基因框架区也被移植到鼠轻链可变区序列上, 则可以进一步进行这种分子匹配 (Rader, C., D. A. Cheresh, 和 C. F. Barbas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8910-8915)。选择出来与这个被修饰的抗原特异性轻

链配对的任何人重链自身都可以作为从更多样化的集中如 3.5 所述选择最佳人轻链的基础。

实施例 4

从构建在腺病毒，疱疹病毒或逆转录病毒载体中的 cDNA 文库选择特异性人抗体

4.1 疱疹病毒。产生重组感染性单纯疱疹病毒扩增子 (Herpes Simplex Virus Amplicons) 的无辅助病毒原液的方法已有描述 (T. A. Stavropoulos, C. A. Strathdee. 1998 J. Virology 72 : 7137-7143)。利用这种方法，构建在质粒扩增子载体中的人免疫球蛋白重链和/或轻链基因或其片段 (包括单链片段) 的 cDNA 文库有可能被包装成感染性扩增子颗粒文库。利用免疫球蛋白重链基因构建的扩增子文库，和利用免疫球蛋白轻链基因构建的另一个扩增子文库可以共感染非产生性骨髓瘤细胞系。通过选择与目的抗原的结合，可以富集能表达具有所需特异性的免疫球蛋白基因组合的骨髓瘤细胞。疱疹病毒扩增子能够在感染细胞内稳定地表达转基因。在第一轮中针对结合性选择到的细胞将保留它们的免疫球蛋白基因组合，并能稳定地表达具有这种特异性的抗体。这使得能重复选择循环直到分离到具有所需特异性的免疫球蛋白基因。还可以尝试导致细胞死亡的选择策略。从那些死亡的被选细胞中回收的扩增子载体不能用于感染新鲜的靶细胞，因为在没有辅助病毒的情况下，这些扩增子是复制缺陷的，不能包装成感染性形式。扩增子载体含有质粒的复制原点和抗生素抗性基因。这使得能通过将从所选细胞中纯化得到的 DNA 转化到细菌中来回收所选的扩增子载体。用合适的抗生素进行选择就能够分离到已经转化了该扩增子载体的细菌细胞。若对重链和轻链扩增子载体使用不同的抗生素 (例如氨苄和卡那霉素) 抗性基因，则可以从相同的被选细胞群中分别选择到重链和轻链基因。可以从细菌中提取扩增子质粒 DNA，并通过用扩增子 DNA 和包装缺陷的 HSV 基因组 DNA 共转染包装细胞来将其包装成感染性病毒颗粒。然后可以收获感染性扩增子颗粒，用它感染新鲜的靶细胞群进行另一轮选择。

4. 2 腺病毒。制备重组体腺病毒的方法已有描述(S. Miyake, M. Makimura, Y. Kanegae, S. Harada, Y. Sato, K. Takamori, C. Tokuda, I. Saito. 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1320-1324; T. C. He, S. Zhou, L. T. Da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler, B. Vogelstein. 1998 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2509-2514)。利用这些方法之一,可以在腺病毒载体中构建 cDNA 文库。cDNA 插入腺病毒的 E3 或 E4 区将产生能复制的重组体病毒。该文库可以用于类似的应用,比如通过三分子重组构建痘苗 cDNA 文库。例如可以将重链 cDNA 文库插入腺病毒的 E3 或 E4 区。这将产生能复制的重链文库。可将轻链 cDNA 文库插入腺病毒的 E1 基因,产生复制缺陷文库。通过感染能反式提供腺病毒 E1 的细胞,比如 293 细胞,可以扩增该复制缺陷型轻链文库。这两个文库可以用于与已经描述过的使用能复制的痘苗重链文库和经补骨脂素灭活的痘苗轻链文库的类似的选择策略中。

4. 3 痘苗病毒的优点。痘苗病毒比疱疹病毒或者腺病毒在构建 cDNA 文库方面有一些优点。首先,痘苗病毒在宿主细胞的胞质内复制,而 HSV 和腺病毒在核中复制。对于痘苗病毒,cDNA 重组转移质粒在胞质内进行重组的频率比 HSV 或腺病毒转运到核中进行包装/重组的效率高。第二,痘苗病毒能以不依赖序列的方式复制质粒,而腺病毒或疱疹病毒不能(M. Merchinsky, B. Moss. 1988 Cancer Cells 6: 87-93)。cDNA 重组体转移质粒在痘苗中复制可能导致产生重组体病毒的概率更高。虽然我们描述了在疱疹病毒或腺病毒载体中构建 cDNA 文库的可能性,但应当强调还没有报道过利用这些方法在这些病毒载体中构建 cDNA 文库。

4. 4 逆转录病毒。在复制缺陷的逆转录病毒载体中构建 cDNA 文库已有描述(T. Kitamura, M. Onishi, S. Kinoshita, A. Shibuya, A. Miyajima, 和 G. P. Nolan. 1995 PNAS 92: 9146-9150; I. Whitehead, H. Kirk, 和 R. Kay. 1995 Molecular and Cellular Biology 15 : 704-710.)。逆转录病毒载体感染靶细胞后发生整合,

由于它们能有效地转导靶细胞、并且能够诱导稳定的转基因表达，逆转录病毒载体已被广泛地应用。利用免疫球蛋白重链基因构建的逆转录病毒 cDNA 文库，和用免疫球蛋白轻链基因构建的另一个逆转录病毒文库可以用于共感染非产生性骨髓瘤细胞系。通过选择与目的抗原的结合，可以对表达具有所需特异性的免疫球蛋白基因组合的骨髓瘤细胞进行富集。第一轮中通过结合选择到的细胞将保留其免疫球蛋白基因组合，并稳定地表达具有该特异性的免疫球蛋白。这使得能重复该选择循环直至分离到具有所需特异性的免疫球蛋白基因。

实施例 5

三分子重组

5.1 表达文库的制备。本实施例描述了一种三分子重组法，该方法利用修饰过的痘苗病毒载体和相关的转移质粒，产生接近 100% 的重组体痘苗病毒，并且首次在痘苗病毒中有效地构建了代表性 DNA 文库。图 6 阐明了该三分子重组法。

5.2 载体的构建。先前描述的痘苗病毒转移质粒 pJ/K (衍生自 pUC13 的质粒) 携带含有框内 NotI 位点的痘苗病毒胸苷激酶基因 (Merchlinisky, M. et al., Virology 190: 522-526), 将其进一步修饰以带上一个强痘苗病毒启动子, 随后是 Not I 和 Apa I 限制位点。两个不同载体 p7.5/tk 和 pELJtk 分别包括 7.5K 痘苗病毒启动子或强合成早期/晚期 (E/L) 启动子 (图 7)。Apa I 位点前面是一个包括 ATG 密码子的强翻译起始序列。在痘苗病毒胸苷激酶(tk)基因中导入该修饰, 使它旁侧为病毒 tk 基因的调控和编码序列。这两个新质粒载体中 tk 基因内的修饰通过旁侧 tk 序列的同源重组被转移到痘苗病毒 WR 株的基因组衍生的 vNotI 载体中, 产生新病毒载体 v7.5/tk 和 vEL/tk。重要的是, 将这些病毒载体进行 Not I 和 Apa I 限制性内切酶消化后, 分离两个大的病毒 DNA 片段, 它们各含有痘苗 tk 基因的单独的非同源区段, 而一起则包含装配感染性病毒颗粒所需要的所有基因。实施例 1 描述了关于这些载体的构建和鉴定的其他细节, 以及它们在痘苗病毒中直接连接 DNA 片段的其它应用。

5.3 提高痘苗病毒重组体的频率。在痘苗病毒中制备重组体的常规方法利用了重组体痘苗转移质粒和病毒基因组之间的同源重组。表3显示了一个模型实验的结果，该实验在标准条件下测定重组体转移质粒转染到感染了痘苗病毒的细胞后发生同源重组的频率。为了促进功能检测，在转移质粒 tk 基因的 NotI 位点插入编码与 H-2K^b 连在一起的卵清蛋白免疫显性 257-264 肽表位的小基因。同源重组的结果是，所有重组体病毒中被打断的 tk 基因都被野生型 tk⁺ 基因取代。这可以作为重组的标记，因为感染了 tk⁻ 病毒的 tk⁻ 人 143B 细胞对 BrdU 的毒性有抗性，与感染了野生型 tk⁺ 病毒的细胞不同。可以通过在有 125 mM BrdU 的情况下培养的 143B 细胞上的病毒 pfu 来给重组体病毒打分。

以这种方式得到的重组体的频率是 0.1% 数量级 (表 3)。

病毒*	DNA	滴度 w/o BrdU	滴度 w/ BrdU	%重组体**
痘苗	---	4.6×10^7	3.0×10^3	0.006
痘苗	30 ng pE/Lova	3.7×10^7	3.2×10^4	0.086
痘苗	300 ng pE/Lova	2.7×10^7	1.5×10^4	0.056

* 痘苗病毒株 vNotI

** %重组体 = (有 BrdU 时的滴度 / 没有 BrdU 时的滴度) × 100

这样的重组频率太低了，不能有效地在痘苗载体中构建 cDNA 文库。利用下列两个步骤来产生更高频率的痘苗病毒重组体。

(1) 质粒转移载体转染到感染了痘苗病毒的细胞后，通过同源重组产生病毒重组体的频率的一个限制因素是，病毒感染效率很高，而质粒 DNA 转染相对效率低。结果许多感染细胞没有摄取重组体质粒，因此只能产生野生型病毒。为了减少对重组效率的稀释，将裸病毒 DNA 和重组体质粒 DNA 的混合物转染到感染了禽痘病毒 (FPV) 的哺乳动物细胞中。正如其他研究人员以前描述过的 (Scheifflinger, F. 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9977-9981), FPV 在哺

乳动物细胞内不复制，但能为转染了非感染性裸露痘苗 DNA 的细胞提供包装成熟痘苗病毒颗粒所必需的辅助功能。仅对同源重组技术的这个修饰就能将病毒重组体的频率提高大约 35 倍，达到 3.5% (表 4)。

表 4: 通过修饰的同源重组产生重组体痘苗病毒。

病毒	DNA	滴度 w/o BrdU	滴度 w/ BrdU	%重组体
PFV	无	0	0	0
无	痘苗 WR	0	0	0
PFV	痘苗 WR	8.9×10^6	2.0×10^2	0.002
PFV	痘苗 WR +pE/Lova(1:1)	5.3×10^6	1.2×10^5	2.264
PFV	痘苗 WR +pE/Lova(1:10)	8.4×10^5	3.0×10^4	3.571

* % 重组体 = (有 BrdU 时的滴度/没有 BrdU 时的滴度) x 100

表 4. 用 MOI=1.0 的禽痘病毒株 HP1 感染单层铺满 BSC1 细胞 (5×10^5 细胞/孔)。两小时后，吸去上清，用 Opti-Mem I 培养基将细胞洗两次，经 lipofectamine 用 600ng 痘苗株 WR 基因组 DNA 单独或者与 1:1 或 1:10 (痘苗: 质粒) 摩尔比率的质粒 pE/Lova 转染。该质粒含有卵清蛋白 cDNA 的一个编码 SIINFEKL 表位的片段，已知该表位与小鼠 I 类 MHC 分子 K^b 高亲和力结合。这个小基因的表达受到一个强的合成性早/晚期痘苗启动子调控。该插入片段旁侧是痘苗 tk DNA。三天后收获细胞，在干冰异戊醇/37℃ 水浴中冻/融三轮来提取病毒。通过在人 TK-143B 细胞上有和没有 BrdU 时进行噬菌斑检测来测定粗病毒原液的滴度。

(2) 通过用重组体质粒和两个大的接近 80kb 和 100kb 的痘苗病毒 v7.5/tk DNA 片段的混合物转染感染了 FPV 的细胞，使病毒重组体的频率有了另一个明显的提高，其中所述的两个片段是用 Not I 和 Apa I 限制性内切酶消化产生的。因为 tk 基因中已经导入了 Not I 和 Apa I 位点，这些大痘苗 DNA 臂每个都包括 tk 基因的一个片段。由于这两个 tk 基因片段之间没有同源性，可以将这两个痘苗臂连接起来的唯一方法是通过重组体转移质粒中插入片段旁侧的同源 tk 序

列来桥接。表 5 的结果显示，通过被感染的 tk-细胞的 BrdU 抗性确定，三重转染细胞中产生的感染性痘苗病毒 99%以上重组了 DNA 插入片段。

表 5: 利用三分子重组产生 100%重组体痘苗病毒。

病毒	DNA	滴度 w/o BrdU	滴度 w/ BrdU	%重组体*
PFV	没有切割的 v7.5/tk	2.5×10^6	6.0×10^3	0.24
PFV	NotI/ApaI v7.5/tk 臂	2.0×10^2	0	0
PFV	NotI/ApaI v7.5/tk 臂 + pE/Lova (1:1)	6.8×10^4	7.4×10^4	100

* % 重组体 = (有 BrdU 时的滴度/没有 BrdU 时的滴度) x 100

表 5. 用 ApaI 和 NotI 限制性内切酶消化痘苗株 V7.5/tk 的基因组 DNA (1.2 微克)。将消化好的 DNA 分成两份。一份以 1: 1 (痘苗: 质粒) 摩尔比率与 pE/Lova 混合。该质粒含有卵清蛋白 cDNA 的一个编码 SIINFEKL 表位的片段, 已知该表位与小鼠 I 类 MHC 分子 K^b 高亲和力结合。这个小基因的表达受到一个强的合成早/晚期痘苗启动子调控。该插入片段旁侧是痘苗 tk DNA。用 lipofectamine 将 DNA 转染到铺满的单层 BSC1 细胞中 (5×10^5 细胞/孔), 该细胞已经先用 MOI=1.0 的 FPV 感染了两个小时。一份样品用 600ng 未处理的基因组 V7.5/tk DNA 转染。三天后收获细胞, 在干冰异戊醇/37℃ 水浴中冻/融三轮来提取病毒。通过在 TK-143B 细胞上有和没有 BrdU 选择时进行噬菌斑检测来测定粗病毒原液的滴度。

5.4 在痘苗病毒中构建代表性 cDNA 文库。在痘苗载体中构建 cDNA 文库来显示已知细胞 mRNA 序列被代表性地表达。在 p7.5/tk 转移质粒和 v7.5/tk 病毒载体中导入另外的修饰, 以便提高感染细胞内重组体表达的效率。所述修饰包括在三个不同读框中导入翻译起始位点, 导入翻译和转录终止信号以及用于 DNA 插入的其他限制位点。

首先, 将 p7.5/tk 的 HindIII J 片段 (痘苗 tk 基因) 从该质粒亚

克隆到 pBS 噬菌粒 (Stratagene) 的 HindIII 位点, 产生 pBS.Vtk.

其次, 用 SmaI 和 PstI 消化 pBS.Vtk, 去掉该质粒原来的多克隆位点的一部分, 用绿豆核酸酶处理, 重新连接, 产生 pBS.Vtk.MCS-。这个处理过程去掉了 pBS.Vtk 中的 SmaI, BamHI, SalI 和 PstI 单酶切位点。

再次, 这里的目的是在 pBS.Vtk.MCS- 的 7.5k 启动子的下游导入新的多克隆位点。这个新的多克隆位点是通过利用 4 个不同上游引物和一个共用下游引物经 PCR 产生的。这 4 个 PCR 产物将不含 ATG 起始密码子或含有处于三个可能读框中的每一种的 ATG 起始密码子。此外, 每个 PCR 产物在 3' 末端含有三种读框的翻译终止密码子, 以及痘苗病毒转录双重终止信号。将这 4 个 PCR 产物分别连接到 pBS.Vtk.MCS- 的 NotI/ApaI 位点, 产生 4 个载体, p7.5/ATG0/tk, p7.5/ATG1/tk, p7.5/ATG2/tk, 和 p7.5/ATG3/tk, 图 12 显示了它们相对于 p7.5/tk 的序列修饰。每个载体均包括 BamHI, SmaI, PstI 和 SalI 单酶切位点, 用于克隆 DNA 插入片段, 它们或者利用自身的内源翻译起始位点 (p7.5/ATG0/tk 载体中), 或者利用处于三种可能读框之一的载体翻译起始位点 (p7.5/ATG1/tk, p7.5/ATG3/tk 和 p7.5/ATG4/tk)。

在一个模型实验中, 由鼠肿瘤细胞系 (BCA39) 的 poly-A⁺ mRNA 合成 cDNA, 并连接到四个被修饰的 p7.5/tk 转移质粒中的每一个内。通过在原核宿主细胞比如大肠杆菌中如文中所述或者本领域已知的其他方法进行传代来扩增转移质粒。将 20 微克经 Not I 和 Apa I 消化的 v/tk 痘苗病毒 DNA 臂和四种重组体质粒 cDNA 文库的等摩尔混合物转染到已感染 FPV 辅助病毒的 BSC-1 细胞中进行三分子重组。收获到的病毒总滴度为 6×10^6 pfu, 其中 90% 以上是 BrdU 抗性的。

为了确定重组体痘苗文库中 cDNA 插入片段的大小分布, 用无菌巴斯德移液管挑出单个的分离噬菌斑, 转移到含有 100ul 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的 1.5ml 试管中。通过在干冰/异戊醇中于 37℃ 冻/融三轮使病毒从细胞中释放出来。大约每个病毒噬菌斑的三分之一用来感染

12 孔板的一个孔，其中含有在 250 μ l 终体积中的 tk-人 143B 细胞。两小时感染期的最后，用 1ml 含有 2.5%胎牛血清的 DEME (DEME-2.5) 和 BudR 覆盖每个孔，Brd11 的用量足以使终浓度达到 125 μ g/ml。将细胞于 37 $^{\circ}$ C 在 CO₂ 培养箱中保温 3 天。第 3 天收获细胞，离心沉淀，重悬于 500 μ l PBS 中。如上所述经三轮冻/融循环从细胞中释放病毒。用每份病毒储液的 20%感染 50mm 组织培养皿中铺满的 BSC-1 单层细胞，终体积为 3ml DEME-2.5。2 小时感染期的最后，用 3ml DMEM-2.5 覆盖细胞。将细胞在 CO₂ 培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 保温 3 天。第 3 天收获细胞，离心沉淀，重悬于 300 μ l PBS。如上所述经三轮冻/融循环释放细胞中的病毒。将 100 μ l 粗病毒储液转移到 1.5 ml 试管中，加入等体积融化好的 2%低熔点琼脂糖，将病毒/琼脂糖混合物转移到脉冲场凝胶样品槽中。琼脂凝固后将它们从样品槽上取下来，切成相等的三份。将全部三份都转移到同一个 1.5 ml 试管中，加入 250 μ l 0.5M EDTA, 1% Sarkosyl 和 0.5mg/ml 蛋白酶 K。将胶条在溶液于 37 $^{\circ}$ C 保温 24 小时。在 500 μ l 0.5X TBE 缓冲液中洗几次，将每个胶块的一部分转移到 1%低熔点琼脂糖凝胶的一个孔中。加入胶条后，通过另外添加融化好的 1%低熔点琼脂糖将孔密封。然后将凝胶在 Bio-Rad 脉冲场凝胶电泳装置中于 200 伏，8 秒脉冲时间，在 0.5X TBE 中电泳 16 小时。将胶在 EB 中染色，从胶上切下含有痘苗基因组 DNA 的琼脂糖部分，转移到 1.5 ml 试管中。用 β -琼脂糖酶 (Gibco) 按照制造商的建议从琼脂糖中纯化痘苗 DNA。将纯化好的痘苗 DNA 重悬于 50 μ l ddH₂O。DNA 储液各 1 μ l 用作聚合酶链式反应 (PCR) 的模板，PCR 使用痘苗 TK 特异引物 MM428 和 MM430 (在插入位点的旁侧) 和 Klentaq 聚合酶 (Clontech) 按照制造商的推荐在 20 μ l 终体积中进行。反应条件包括 95 $^{\circ}$ C 5 分钟的起始变性步骤，然后是 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒，68 $^{\circ}$ C 3 分钟。PCR 反应体系各 2.5 μ l 在 1%琼脂糖凝胶上进行分离，用 EB 染色。观察到不同大小的扩增片段。针对 PCR 中扩增的旁侧载体序列进行校正后，插入片段的大小在 300 到 2500bp 之间。

该文库中基因产物的代表性表达是通过显示痘苗文库中特异 cDNA 重组体的频率与同样的 cDNA 重组体在标准质粒文库中出现的频率没有区别来建立的。在表 6 中以 IAP 序列为例说明了这一点, 该序列先前显示在鼠肿瘤中被上调。通过在有 BDUR 存在的情况下感染 143B tk- 细胞的微培养物来扩增 20 个来自痘苗文库的单独的池, 其中各平均有 800 或 200 个病毒 pfu。3 天后从每个被感染培养物中提取 DNA, 用序列特异性引物经 PCR 检测是否存在以前鉴定的内源逆转录病毒 (IAP, intracisternal A particle) 序列。对阳性池频率进行的泊松分析表明频率为大约每 500 个病毒 pfu 有一个 IAP 重组体 (表 6)。类似地, 通过转化 DH5 α 细菌将来自质粒文库的 20 个单独的池扩增, 所述池有平均 1400 或 275 个细菌 cfu。检测来自每个池的质粒 DNA 看是否存在相同的 IAP 序列。对阳性池进行的泊松分析显示频率为每 450 个质粒有一个 IAP 重组体 (表 6)。

	PCR#阳性孔	F ₀	μ	频率
#PFU/孔		痘苗文库		
800	18/20	0.05	2.3	1/350
200	6/20	0.7	0.36	1/560
#PFU/孔		质粒文库		
1400	20/20	0	-	-
275	9/20	0.55	0.6	1/450

F₀ = 阴性孔的比例; μ = DNA 前体/孔 = $-\ln F_0$

对 α 微管蛋白序列在痘苗文库中的展示进行了类似的分析, 得到了类似的结果。随机选择的序列在由相同的肿瘤 cDNA 构建的两个文库中的频率相当, 这说明虽然构建痘苗文库比构建质粒文库更复杂, 并且当然不象后者那么常规, 但同样可代表肿瘤 cDNA 序列。

讨论

上面描述的分分子重组策略可以产生将近 100% 的病毒重组体。这比目前通过用质粒转移载体转染感染了痘苗病毒的细胞来制备病毒重

组体的方法有了明显提高。后一种方法产生病毒重组体的频率仅有0.1%数量级。三分子重组中病毒重组体的高产率使得第一次能高效地在痘苗病毒衍生载体中构建基因组或 cDNA 文库。在首批实验中，在用 20 微克 NotI 和 ApaI 消化过的痘苗载体臂的混合物和等摩尔浓度肿瘤细胞 cDNA 一起转染后，得到滴度为 6×10^6 的重组体病毒。这项技术进步创造了分离特异基因组和 cDNA 克隆的新的、有效的筛选和选择策略。

文中描述的二分子重组法可以用于其他病毒，比如哺乳动物病毒，包括痘苗和疱疹病毒。通常产生两个没有同源性的病毒臂。这两个病毒臂能够连起来的唯一途径是通过转移载体（比如质粒）中插入片段的旁侧同源序列来桥接。当两个病毒臂和转移载体存在于相同细胞时，产生的唯一感染性病毒是转移载体中的 DNA 插入片段的重组体。

通过本发明的三分子重组法在痘苗和其他哺乳动物病毒中构建的文库具有与文中针对痘苗病毒及其在本发明所述 CTL 筛选系统中鉴定目的抗原中的用途所述有类似的优点。预计构建在痘苗或其他哺乳动物病毒中的 DNA 文库在真核细胞内进行更复杂的分析时有类似的优点。这类分析包括，但不限于筛选编码真核细胞受体和配体的 DNA。

实施例 6

转移质粒的制备

可以通过已知的方法制备用于克隆的转移载体。优选的方法包括用合适的限制性内切酶（例如 SmaI, SalI 或者 BamHI 和 SalI）在适当的缓冲液中，于适当的温度将 1-5 微克载体切割至少 2 小时。经 0.8% 琼脂糖凝胶通过电泳已消化好的载体来分离线性消化的载体。将线性质粒从胶上切下来，利用公知的方法从琼脂糖上纯化。

连接。利用公知方法将 cDNA 和消化好的转移载体连接在一起。在一个优选方法中，用 T4 DNA 连接酶将 50-100ng 转移载体与不同浓度的 cDNA 进行连接，使用合适的缓冲液在 14℃ 连接 18 到 24 小时。

转化。利用公知的方法将连接反应的样液通过电穿孔转化到大肠

杆菌比如 DH10B 或 DH5 α 中。将转化反应体系铺到含有选择抗生素（氨苄青霉素）的 LB 琼脂板上，在 37 $^{\circ}$ C 生长 14-18 小时。将所有的转化细菌合并到一起，用公知方法分离质粒 DNA。

制备根据上面对本发明优选方法的描述中提及的缓冲液对本领域技术人员是显而易见的。

实施例 7

将痘苗病毒 DNA 片段和转移质粒导入组织培养细胞进行三分子重组

如实施例 5 所述或者通过其他本领域已知的技术在 4 个转移质粒中构建 cDNA 或其他文库。采用三分子重组将该 cDNA 文库导入痘苗病毒。用禽痘病毒 HP1 于 MOI=1-1.5 感染铺满的 BSC1 单层细胞。感染在补充有 0.1% 牛血清白蛋白的无血清培养基中进行。BSC1 细胞可以放在 12 孔或 6 孔板，60 mm 或 100mm 组织培养板，或 25cm²，75cm²，或者 150cm² 瓶子中。用限制性内切酶 ApaI 和 NotI 消化来自 v7.5/tk 或 vEL/tk 的纯化 DNA。消化完成后，将酶热灭活，用 centricon 100 柱子将消化好的痘苗臂纯化。然后在消化好的痘苗 DNA 和转移质粒 cDNA 文库之间形成转染复合物。优选使用 Lipofectamine 或 Lipofectamine Plus (Life Technologies, Inc.) 来形成这些转染复合物。在 12 孔板中进行的转染通常需要 0.5 微克消化好的痘苗 DNA 和 10ng 到 200ng 来自文库的质粒 DNA。在更大的培养管中进行的转染需要痘苗 DNA 和转移质粒的量按比例增加。在 37 $^{\circ}$ C 感染 2 小时后，除去禽痘病毒，加入痘苗 DNA、转移质粒转染复合物。将细胞与转染复合物温育 3 到 5 小时，之后去掉转染复合物，换入 1 ml 补充有 2.5% 胎牛血清的 DMEM。将细胞在 CO₂ 培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 培养 3 天。3 天后收获细胞，通过三轮干冰/异戊醇/37 $^{\circ}$ C 水浴的冻/融释放病毒。

实施例 8

感染哺乳动物细胞

本实施例描述了用痘苗 DNA 和转移质粒转染细胞的其它方法。可以利用例如如下方法，通过将消化好的痘苗 DNA 和转移质粒转染到宿

主细胞中进行三分子重组：磷酸钙沉淀法 (F. L. Graham, A. J. Van derEb (1973) *Virology* 52: 456-467, C. Chen, H. Okayama (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745-2752), DEAE-Dextran (D. J. Sussman, G. Milman (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4: 1641-1643), 或电穿孔 (T. K. Wong, E. Neumann (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 584-587, E. Neumann, M. Schafer Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider (1982) *EMBO J.* 1: 841-845).

实施例 9

MVA 三分子重组载体的构建

为了构建适用于三分子重组的经修饰的痘苗 Ankara (MVA) 载体, 必须在 MVA tk 基因中插入两个单酶切限制性内切酶位点。完整的 MVA 基因组序列是已知的 (GenBank U94848)。对该序列进行的检索显示限制性内切酶 AscI, RsrII, SfiI, 和 XmaI 不切割 MVA 基因组。我们选择了限制性内切酶 AscI 和 XmaI, 因为这两种酶容易买到, 并且 AscI 和 XmaI 的识别序列大小分别为 8bp 和 6bp。为了将这些位点导入 MVA tk 基因, 要制备一个含有两侧是 XmaI 和 AscI 位点的报道基因 (大肠杆菌 gusA) 的构建体。Gus 基因可以从 pCRII.Gus (M. Merchlinsky, D. Eckert, E. Smith, M. Zauderer. 1997 *Virology* 238: 444-451) 中得到。将该报道基因构建体克隆到转移质粒中, 后者含有痘苗 tk DNA 旁侧序列和控制报道基因的表达的早/晚期 7.5k 启动子。用 Gus 特异引物由该构建体 PCR 扩增 Gus 基因。Gus 有义链 5'

ATGTTACGTCCTGTAGAAACC 3' (SEQ ID NO : 94), 和 Gus 反义链 5' TCATTGTTTGCCTCCCTGCTG 3' (SEQ ID NO : 95)。然后用 Gus 特异引物将该 Gus PCR 产物做 PCR 扩增, 其中所述引物已被修饰, 从而有义引物中包含 NotI 和 XmaI 位点, 反义引物包含 AscI 和 ApaI 位点。这些引物的序列是:

NX-Gus 有义 5' AAAGCGGCCGCCCCGGGATGTTACGTCC3' (SEQ ID

NO:96);和

AA-Gus 反义 5' AAAGGGCCCGGCGCGCCTCATTGTTTGCC3' (SEQ ID NO:97)。

这个 PCR 产物用 NotI 和 ApaI 消化, 克隆到 p7.5/tk (M. Merchlinsky, D. Eckert, E. Smith, M. Zauderer. 1997 *Virology* 238 : 444-451) 的 NotI 和 ApaI 位点。通过常规的同源重组, 在许可性 QT35 或 BHK 细胞中将 7.5k-XmaI-gusA-AscI 构建体导入 MVA。经 Gus 底物 X-Glu (5-溴-3 吡啶-ss-D-葡糖醛酸; Clontech) (M. W. Carroll, B. Moss. 1995 *Biotechniques* 19 : 352-355) 染色来选择重组体噬菌斑。将 MVA-Gus 克隆 (它也含有 XmaI 和 AscI 单酶切位点) 噬菌斑纯化至均质。在 BHK 细胞上扩增 MVA-Gus 的大规模培养物, 从纯化的病毒中分离裸 DNA。用 XmaI 和 AscI 消化后, 将 MVA-Gus DNA 用于三分子重组以便在 MVA 中构建 cDNA 表达文库。

MVA 在多数哺乳动物细胞内不能完成其生命周期。这种减毒将导致更长时间地高水平表达重组体 cDNAs, 但不能从被感染细胞中回收到的活的 MVA。无法从选择的细胞中回收到的活的 MVA 将妨碍分离目的功能性 cDNA 重组体所必须进行的反复选择循环。这个问题的一个解决方法是用能补偿 MVA 的宿主范围缺陷的辅助病毒去感染已经感染了 MVA 的细胞。该辅助病毒能提供 MVA 缺少的完成其生命周期所必需的基因产物。不太可能另外一种宿主范围受限的辅助病毒 (比如禽痘病毒) 也可补偿 MVA 的缺陷, 因为这些病毒同样在哺乳动物细胞内受到限制。痘苗病毒的野生型株应能补偿 MVA。但是这种情况中, 产生能复制的痘苗病毒将使得选择和分离重组体 MVA 克隆的周期复杂化。可以使用条件缺陷的痘苗病毒, 该病毒能提供在非许可条件下从哺乳动物细胞中回收活的 MVA 所需要的辅助功能, 但不会产生能复制的病毒。痘苗 D4R 开放读框 (orf) 编码尿嘧啶 DNA 糖基化酶。该酶是痘苗病毒复制所必需的, 在感染后早期表达 (在 DNA 复制前), 破坏该基因对痘苗是致死的。已经证实, 表达痘苗 D4R 基因的稳定转染的哺乳动物细胞系能够补偿 D4R 缺陷型痘苗病毒 (G.W. Holzer, F. G.

Falkner. 1997 J. Virology 71 : 4997-5002)。D4R 缺陷型痘苗病毒是一个极佳的能够在哺乳动物细胞内补偿 MVA 的候选辅助病毒。

为了构建 D4R 补偿细胞系，利用引物 D4R 有义链 5' AAAGGATCCA TAATGAATTC AGTGACTGTA TCACACG 3' (SEQ ID NO : 98) 和 D4R 反义链 5' CTTGCGGCCG CTTAATAAATAAACCCCTTGA GCCC 3' (SEQ ID NO : 99)，从痘苗株 v7.5/tk 中经 PCR 扩增克隆 D4R orf。其中的有义引物已被修饰而包含 BamHI 位点，反义引物被修饰而包含 NotI 位点。PCR 扩增并用 BamHI 和 NotI 消化后，将 D4R orf 克隆到 pIRESHyg(Clontech) 的 BamHI 和 NotI 位点。这个哺乳动物表达载体含有强 CMV 立即早期启动子/增强子和 ECMV 内部核糖体进入位点 (IRES)。将 D4RIRESHyg 构建体转染到 BSC1 细胞中，用潮霉素选择被转染的克隆。IRES 使得能高效地翻译其 5' 端含有 D4R orf、3' 段含有潮霉素磷酸转移酶基因的多顺反子 mRNA。这将使得高频率的潮霉素抗性克隆具有所需功能(这些克隆表达 D4R)。表达 D4R 的 BSC1 细胞(BSC1. D4R)能够补偿 D4R 缺陷型痘苗，使得能产生和繁殖该缺陷株。

为了构建 D4R 缺陷型痘苗，从痘苗基因组中经 PCR 扩增 D4R orf (痘苗基因组的 100732 到 101388 位)以及 983 bp (5' 末端)和 610 bp (3' 末端)的旁侧序列。引物 D4R 旁侧有义 5' ATTGAGCTCT TAATACTTTT GTCGGGTAAC AGAG 3' (SEQ ID NO : 100)，和 D4R 旁侧反义 5' TTACTIONGAGA GTGTCGCAAT TTGGATTTT 3' (SEQ ID NO: 101)含有用于克隆的 SacI (有义链)和 XhoI (反义)位点，会扩增痘苗基因组的 99749 到 101998 位。将该 PCR 产物克隆到 pBluescript II KS (Stratagene)的 SacI 和 XhoI 位点，产生 pBS. D4R. Flank。D4R 基因含有起始于 657bp orf 的核苷酸 3 的 EcoRI 单酶切位点，起始于该 orf 的核苷酸 433 的 PstI 单酶切位点。在 D4R 的 EcoRI 和 PstI 位点插入 Gus 表达盒将去除大部分 D4R 编码序列。已有人构建了 7.5k 启动子-Gus 表达载体(M. Merchlinsky, D. Eckert, E. Smith, M. Zauderer. 1997 Virology 238 : 444-451)。利用引物 7.5 Gus 有

义 5' AAAGAATTCC TTTATTGTCATCGGCCAAA 3' (SEQ ID NO : 102) 和 7.5 Gus 反义 5' AATCTGCAGTCATTGTTTGC CTCCTGCTG 3' (SEQ ID NO: 103) 从这个载体中经 PCR 分离 7.5-Gus 表达盒。所述 7.5Gus 有义引物含有 EcoRI 位点, 7.5Gus 反义引物含有 PstI 位点。PCR 扩增后, 用 EcoRI 和 PstI 消化 7.5Gus 分子, 并插入到 pBS.D4R.Flank 的 EcoRI 和 PstI 位点中, 产生 pBS.D4R-/7.5Gus+。通过将 pBS.D4R-/7.5Gus+ 构建体转染到感染了 v7.5/tk 的 BSC1.D4R 细胞中, 经过常规的同源重组可以产生 D4R-/Gus+ 痘苗。通过在 BSC1.D4R 细胞上进行噬菌斑纯化和用 X-Glu 染色来分离 D4R-/Gus+ 病毒。这种 D4R-病毒可以用于在哺乳动物细胞中补偿和拯救 MVA 基因组。

在一个相关的实施方案中, 可以用其他缺陷型痘病毒, 也可以用补骨脂素/UV 灭活的野生型痘病毒在哺乳动物细胞中拯救 MVA 基因组。文中讨论了补骨脂素/UV 灭活。

实施例 10

D4R 三分子重组载体的构建和使用

痘病毒感染对宿主细胞蛋白质和 RNA 合成有明显的抑制效应。这些对宿主基因表达的影响在某些情况下会干扰对那些对宿主细胞有特定生理效应的特异痘病毒重组体的选择。痘苗病毒的关键早期基因缺陷的某些株显示出对宿主细胞蛋白质合成的抑制效果大大下降。因此在某个早期基因功能缺陷的痘病毒载体中构建重组体 cDNA 文库有利于依赖某些宿主基因连续活跃表达来实现其生理效应的某些重组体的选择。破坏关键病毒基因能阻止突变株的繁殖。但是可以通过宿主细胞的反式补偿或能被诱导表达该基因的辅助病毒提供丢失的功能来拯救复制缺陷型痘苗株。

用构建在复制缺陷株中的痘病毒文库感染细胞群能大大减弱感染对宿主细胞信号传导机制、分化途径和转录调控造成的影响。这种策略的另一个重要益处是, 在靶转录调控区控制下表达关键基因本身就是一个选择直接或间接导致该转录调控区被激活的重组体病毒的手

段。这类例子包括因早期 B 细胞前体上的表面免疫球蛋白受体交联而激活的基因的启动子；或者编码干细胞分化后被诱导的标记物的基因的启动子。如果这样的启动子驱动关键病毒基因的表达，那么只有那些直接或间接激活该转录调控子的表达的病毒重组体能复制，并被包装成感染性颗粒。该方法有可能产生比基于 dipA 或 CTL 靶表位的表达的选择方法低得多的背景，因为未被诱导的细胞不含能复制的痘苗病毒，而能复制的痘苗病毒可能通过非特异性侧效应释放出来。选择出的重组体可以进一步在补偿细胞系中或在有补偿辅助病毒或转染质粒存在的情况下进行扩展。

许多关键早期痘苗基因已有描述。优选采用 D4R 基因缺陷的痘苗株。痘苗 D4R 开放读框(orf)编码尿嘧啶 DNA 糖基化酶。该酶是病毒 DNA 复制所必需的，破坏该基因对痘苗是致死的(A. K. Millns, M. S. Carpenter, 和 A. M. Delange. 1994 *Virology* 198 : 504-513)。有人已经证实，表达痘苗 D4R 基因的稳定转染哺乳动物细胞系能够补偿 D4R 缺陷型痘苗病毒(G. W. Holzer, F. G. Falkner. 1997 *J. Virology* 71 : 4997-5002)。没有 D4R 补偿的情况下，用 D4R 缺陷型痘苗进行感染导致对宿主细胞蛋白质合成的抑制大大减少(Holzer 和 Falkner)。还已显示，插入 D4R 缺陷型痘苗的 tk 基因内的外来基因能继续被高水平表达，即使不存在 D4R 补偿时也如此(M. Himly, M. Pfleiderer, G. Holzer, U. Fischer, E. Hannak, F. G. Falkner, 和 F. Dorner. 1998 *Protein Expression and Purification* 14: 317-326)。因此，复制缺陷的 D4R 株非常适合用于选择那些依赖某些宿主基因连续活跃表达来实现其生理作用的病毒重组体。

为了利用该策略从构建于 D4R 缺陷型痘苗株中的代表性 cDNA 文库中选择特异重组体，需要以下细胞系和载体：

1. 需要表达 D4R 的补偿细胞系来扩展 D4R 缺陷型病毒储液。
2. 适用于三分子重组的病毒株的 D4R 基因必须被删除或灭活。
3. 必须制备在不同诱导性启动子调控下表达 D4R 的质粒或病毒构

建体, 所述启动子包括比如调控 BAX 或者在 CH33 B 淋巴瘤细胞上的膜免疫球蛋白受体交联后被诱导的其他基因的表达的启动子; 或者在诱导 C3H10T1/2 祖细胞分化为软骨细胞后表达 X 型胶原蛋白的启动子。需要这些构建体在相关细胞系内的稳定转染子来拯救特异重组体。或者, 可以采用表达相关构建体的辅助病毒在细胞系或初级培养物中进行诱导表达。

10.1 D4R 补偿细胞系的构建。如下构建 D4R 补偿细胞系。首先, 利用以下引物经 PCR 扩增从痘苗株 v7.5/tk 中克隆 D4R orf (痘苗基因组 100732 到 101388 位)。

D4R-有义, 5' AAAGAATTCA TAATGAATTC AGTGACTGTA TCACACG 3', 文中称为 SEQ ID NO: 104;

和 D4R-反义, 5' CTTGGATCCT TAATAAATAA ACCCTTGAGC CC 3', 文中称为 SEQ ID NO: 105。

有义引物被修饰成包含 EcoRI 位点, 反义引物被修饰成包含 BamHI 位点(均加了下划线表示)。进行标准 PCR 扩增并用 EcoRI 和 BamHI 消化后, 将得到的 D4R orf 克隆到 pIRESneo (购自 Clontech, Palo Alto, CA) 中的 EcoRI 和 BamHI 位点中。这个哺乳动物表达载体含有强 CMV 立即早期启动子/增强子和 ECMV 内部核糖体进入位点(IRES)。将 D4R/IRESneo 构建体转染到 BSC1 细胞中, 用 G418 选择转染克隆。IRES 能使 5'端含有 D4R orf、3'端含有新霉素磷酸转移酶的多顺反子 mRNA 被高效地翻译。这使得高频率的 G418 抗性克隆都是有功能的(这些克隆表达 D4R)。用 D4R 基因作为探针经 Northern 印迹检测转染克隆, 以便鉴定高水平表达 D4R mRNA 的克隆。表达 D4R 的 BSC1 细胞(BSC1. D4R)能补偿 D4R 缺陷型痘苗, 使得能产生和繁殖 D4R 缺陷型病毒。

10.2. D4R 缺陷型痘苗载体的构建。按下述构建适于如前面实施例 5 所述进行三分子重组的 D4R 缺陷型痘苗病毒: 将大肠杆菌 GusA 表达盒插入 300bp 缺失片段从而打断 D4R orf (痘苗基因组的 100732 到 101388 位)。

为了插入 GusA 基因，如下从痘苗病毒扩增插入位点的旁侧区域。左边的旁侧区用以下引物扩增：

D4R 左侧有义：5' AATAAGCTTT ACTCCAGATA ATATGGA 3'；文中称为 SEQ ID NO: 106；

D4R 左侧反义：5' AATCTGCAGC CCAGTTCCAT TTT 3'，文中称为 SEQ ID NO: 107。

这些引物扩增了从痘苗基因组 100167 位延伸到 100960 位的一个区域，它们已被修饰从而包括用于克隆的 HindIII（有义）和 PstI（反义）位点（均加下划线表示）。用 HindIII 和 PstI 消化得到的 PCR 产物，克隆到 pBS（购自 Stratagene）的 HindIII 和 PstI 位点，产生 pBS.D4R.LF。用以下引物扩增右边的旁侧区域：D4R 右侧有义：5' AATGGATCCT CATCCAGCGG CTA 3'，文中称为 SEQ ID NO: 108；D4R 右侧反义：5' AATGAGCTCT AGTACCTACA ACCCGAA 3'，文中称为 SEQ ID NO: 109。

这些引物扩增到一个从痘苗基因组 101271 延伸到 101975 位的区域，它们已被修饰从而包括用于克隆的 BamHI（有义）和 SacI（反义）位点（均有下划线表示）。用 BamHI 和 SacI 消化得到的 PCR 产物，克隆到 pBS.D4R.LF 的 BamHI 和 SacI 位点，得到 pBS.D4R.LF/RF。

通过以下方法，将包含与痘病毒合成早/晚期（E/L）启动子可操纵地连在一起的 GusA 编码区的表达盒插入 pBS.D4R.LF/RF。所述 E/L 启动子-Gus 盒来源于 pEL/tk-Gus 购建体，在 Merchlinsky, M. 等, Virology 238 : 444-451 (1997) 中有描述。用 NotI 消化 pEL/tk-Gus，然后用 Klenow 片段进行填平，以去掉 Gus ATG 起始密码子上游紧邻的 NotI 位点，重新自身连接产生 pEL/tk Gus(NotI-)。用以下引物从 pEL/tk-Gus (NotI-) 中经标准 PCR 分离 E/L-Gus 表达盒：

EL-Gus 有义：5' AAAGTCGACG GCCAAAAATT GAAATTTT 3'，文中称为 SEQ ID NO: 110，和

EL-Gus 反义：5' AATGGATCCT CATTGTTTGC CTCCC 3'，文中称为 SEQ ID NO: 111。

EL-Gus 有义引物含有一个 SalI 位点, EL-Gus 反义引物含有一个 BamHI 位点(均加有下划线)。PCR 扩增后, EL-Gus 盒用 SalI 和 BamHI 消化, 插入 pBS.D4R.LF/RF 的 SalI 和 BamHI 位点, 产生 pBS.D4R-/ELGus。这个转移质粒含有两侧是 D4R 序列的 EL-Gus 表达盒。还在 D4R orf 中产生了一个 300bp 的缺失。

将 pBS.D4R-/EL Gus 构建体转染到感染了 v7.5/tk-的 BSC1.D4R 细胞中后, 经常规同源重组制备适用于三分子重组的 D4R-/Gus+ 痘苗病毒。通过在 BSC1.D4R 细胞上进行噬斑纯化并用 X-Glu 染色来分离 D4R-/Gus+ 病毒 (M. W. Carroll, B. Moss. 1995. Biotechniques 19: 352-355)。这个新病毒株命名为 v7.5/tk/Gus/D4R。

用纯化自 v7.5/tk/Gus/D4R 的 DNA 按照实施例 5 描述的方法通过三分子重组来构建代表性痘苗 cDNA 文库, 但反应是在 BSC1.D4R 补偿细胞系中进行。

10.3. 制备表达受诱导型启动子调控的 D4R 的宿主细胞。如下制备诱导型启动子被诱导时表达 D4R 基因的宿主细胞。制备能表达在诱导型启动子调控下痘苗 D4R 基因的质粒构建体。诱导型启动子的例子包括, 但不限于 CH33 细胞上的膜免疫球蛋白发生交联时被上调的启动子(用于抗体选择), 例如实施例 2 和 3 中描述的 BAX 启动子。用上面 10.1 部分描述的引物 D4R 有义和 D4R 反义经 PCR 扩增痘苗 D4R orf。根据需要将这些 PCR 引物修饰, 使它们包含所需的限制性内切酶位点。然后采用本领域普通技术人员已知的方法将 D4R orf 克隆到合适的真核表达载体(使得能选择稳定转化细胞)中, 与所需的任何启动子可操纵地连接在一起。

然后将该构建体转染到合适的宿主细胞中, 例如实施例 2 和 3 描述的用于选择抗体的那些细胞。可操纵地连接了 BAX 启动子的 D4R 基因被稳定地转染到合适的细胞系中, 例如 CH33 细胞系, CH31 细胞系或者 WEHI-231 细胞系。得到的宿主细胞基本上按照实施例 3 描述的那样利用构建在 v7.5/tk/Gus/D4R 中的文库用于生产抗体。宿主细胞表面上膜表达免疫球蛋白分子的抗原诱导的交联导致交联细胞中

D4R 基因产物的表达受到诱导。D4R 的表达补偿了 v7.5/tk/Gus/D4R 基因组（用于在其中制备文库）的缺陷，从而产生感染性病毒颗粒。

实施例 11

DNA 合成的可逆抑制剂对痘病毒介导的宿主抑制的减毒

如前文讨论的，有时需要减毒或缺陷型病毒来减少致细胞病变效应。病毒感染过程中的致细胞病变效应可能干扰利用宿主细胞死亡（例如交联诱导的细胞凋亡）来对免疫球蛋白分子进行的选择和鉴定。这类效应可以用 DNA 合成的可逆抑制剂比如羟脲(HU) (Pogo, B. G. 和 S. Dales *Virology*, 1971. 43 (1) : 144-51) 来削弱。HU 通过夺取复制复合体中的脱氧核苷酸前体来抑制细胞和病毒的 DNA 合成 (Hendricks, S. P. 和 C. K. Mathews *J Biol Chem*, 1998. 273 (45): 29519-23)。病毒 DNA 复制被抑制将阻断晚期病毒 RNA 转录，但允许早期痘苗启动子调控下的转录和翻译 (Nagaya, A., B. G. Pogo, 和 S. Dales *Virology*, 1970. 40 (4): 1039-51)。因此用 DNA 合成的可逆抑制剂（比如 HU）进行处理可以检测交联的效应。适当地温育后，通过洗涤宿主细胞可以解除 HU 抑制，从而病毒复制循环得以继续，进而回收到感染性重组体 (Pogo, B. G. 和 S. Dales *Virology*, 1971. 43 (1) : 144-51)。

图 9 中的结果显示，用 BMP-2（骨骼形态发生蛋白-2）处理过的 C3H10T 1/2 祖先细胞中 X 型胶原蛋白（它是软骨细胞分化的标志）合成的诱导被痘苗感染所阻断，但 HU 介导的对病毒 DNA 合成的抑制能拯救该蛋白的合成。当用新鲜培养基清洗培养物来除去 HU 时，病毒 DNA 合成和感染颗粒的装配进行得非常迅速，洗涤后 2 小时即可分离感染性病毒颗粒。

用 MOI=1 的 WR 痘苗病毒感染 C3H10T 1/2 细胞，1 小时后在有或没有 2mM HU 的情况下加入培养基或 400 ng/ml 的 BMP-2。在 37℃ 再培养 21 小时后，用新鲜培养基清洗来除去 HU。令感染周期继续 2 小时，以便起始病毒 DNA 复制和感染颗粒的装配。第 24 小时，从保持在 4 种不同培养条件下的细胞中提取 RNA。用 X 型胶原蛋白特异探针

进行 Northern 分析。未被诱导的 C3H10T1/2 细胞具有间充质祖先细胞表型，并且不表达 X 型胶原蛋白（左起第一栏）。向正常的未被感染的 C3H10T 1/2 细胞加入 BMP-2 能诱导其分化为成熟的软骨细胞，并表达 X 型胶原蛋白（比较左起第一和第二栏），而给感染疫苗的 C3H10T 1/2 细胞加入 BMP-2 不能诱导合成 X 型胶原蛋白（左边第三栏）。在有 2mM HU 存在的情况下，BMP-2 甚至在感染了疫苗病毒的 C3H10T 1/2 细胞中也能诱导合成 X 型胶原蛋白（左边第四栏）。

这个削弱病毒致细胞病变效应的策略可以用于其他病毒，其他细胞类型，并且可以用于选择例如交联时诱导细胞凋亡的免疫球蛋白分子。

实施例 12

多种特异性的人 Fab 片段文库的构建

如下制备编码完全人的多样化免疫球蛋白 Fab 片段的多核苷酸文库。这些 Fab 片段包含与第一恒定区结构域（VH-CH1）连在一起的重链可变区，并与免疫球蛋白轻链配对。经 PCR 扩增人 VH（重链可变区），VK（ κ 轻链可变区）和 VL（ λ 轻链可变区）的基因。对于这三个可变区基因家族的每一个，构建重组体质粒文库和疫苗病毒文库二者。将可变区基因插入基于 p7.5/tk 的转移/表达质粒中紧接恒定区序列的上游，所述恒定区序列对应重链的 CH1 结构域或 κ 轻链恒定区 CK。应用这些质粒通过三分子重组来产生相应的疫苗病毒重组体，也可以将 1 个免疫球蛋白链或其片段转染到感染了第二免疫球蛋白链或其片段的疫苗病毒重组体的细胞之后，用这些质粒直接高水平表达 Fab 片段。这两个链被合成并装配形成 Fab 片段。正如本领域普通技术人员能够理解的，通过接上信号序列、跨膜结构域和/或胞内结构域的编码序列，这些 Fab 片段可以是膜结合或者分泌型的。

12.1 pVHEc。如下构建编码包含 C μ 的 VH 和 CH1 结构域的人重链片段的表达载体，称为 pVHEc。按照前面实施例 1.1 的描述制备质粒 p7.5/tk2。由按照实施例 1 所述分离的 IgM 重链基因扩增编码 VH 的氨基酸 109-113 和 CH1 结构域（即 C μ 的氨基酸 109-223B）的 DNA 构

建体，经 PCR 修饰使其在编码氨基酸 109-113+ $C\mu$ CH1 结构域的区域 5'端包含一个 BstEII 位点，在 3'端包含一个终止密码子和一个 SalI 位点。将该 DNA 插入 p7.5/tk2 中 BstEII 和 SalI 之间，产生 pVHEc。将利用表 1 和 2 所列的引物，按照实施例 1.4(a)所述制备的重链可变区 (VH) PCR 产物(氨基酸(-4)到(110))克隆到 BssHII 和 BstEII 位点。因为 CH1 结构域序列和所选的限制酶位点存在重叠，这将导致构建了缺乏功能性信号肽、但处于正确翻译读框的连续重链片段。

12.2 pVKEc 和 pVLEc。如下构建编码人 κ 和 λ 免疫球蛋白轻链恒定区的表达载体，命名为 pVKEc 和 pVLEc。如前面实施例 1.3 所述制备质粒 p7.5/tk3.1。

(a) 通过以下方法将质粒 p7.5/tk3.1 转化为 pVKEc。用引物按照实施例 1 的描述分离编码 $C\kappa$ 区域的 cDNA，使其在编码氨基酸 104-107+ $C\kappa$ 的区域的 5'端包含一个 XhoI 位点，3'端包含一个终止密码子和一个 SalI 位点，然后克隆到 p7.5/tk3.1 的 XhoI 和 SalI 位点，产生 pVKEc。然后将利用表 1 和 2 所列的引物、按照实施例 1.4(b)所述制备的 κ 轻链可变区 (VK) PCR 产物(氨基酸(-3)到(105))克隆到 pVKEc 的 ApaLI 和 XhoI 位点。由于 κ 轻链序列和所选的限制酶位点之间存在重叠，这导致构建了一个缺少功能性信号肽、但处于正确的翻译读框的连续 κ 轻链。

(b) 通过以下方法将质粒 p7.5/tk3.1 转化为 pVLEc。用引物按照实施例 1 的描述分离编码 $C\kappa$ 区域的 cDNA，使其在编码 $V\lambda$ 的氨基酸 105-107 区域的 5'端包含一个 HindIII 位点，在 3'端包含一个终止密码子和一个 SalI 位点，然后克隆到 p7.5/tk3 的 HindIII 和 SalI 位点，产生 pVLEc。然后将利用表 1 和 2 所列的引物、按照实施例 1.4(c)所述制备的 λ 轻链可变区 (VL) PCR 产物(氨基酸(-3)到(104))克隆到 pVLEc 的 ApaLI 和 HindIII 位点。由于 λ 轻链序列和所选的限制酶位点之间存在重叠，这导致构建了一个缺少功能性信号肽、但处于正确的翻译读框的连续 λ 轻链。

12.3 分泌或膜结合形式的 Fab。表达载体 (pVHEc, pVKEc 和 pVLEc) 可以作为原型载体, 其中克隆上分泌信号、跨膜结构域、胞质结构域或者它们的组合就可以将 Fab 定位到细胞表面或胞外空间。这些信号和结构域 (表 7 列出了它们的例子) 可以插入 Fab 的 N 末端处于 pVHEc 的 NcoI 和 BssHE 之间 (或者 pVKEc 和 pVLEc 的 NcoI 和 ApaLI 之间) 和/或 C 末端的 SalI 位点。为了将 Fab 靶向分泌到胞外区室, 在 Fab 链, VH-CH1 或轻链之一或两者的 N 末端插上一个信号肽。为了将 Fab 锚定在质膜上进行胞外递呈, 给 VH-CH1 链和/或轻链的羧基端添加一个跨膜结构域。还可以加上胞质结构域。

信号序列	末端	位置	蛋白质
MGWSCIIILFLVATATGAHS(S EQ ID NO:146)	N	ES	IgG1
NLWTTASTFIVLFLLSLFYST TVTFLF (SEQ ID NO:147)	C/N	PM	IgM

位置下的项目的缩写: ES, 胞外周质; PM, 质膜。

实施例 13

人单链-Fv (ScFv) 抗体文库的构建

13.1 如图 10 所示, 通过以下方法构建人 scFv 表达载体 p7.5/tk3.2 和 p7.5/tk3.3。按照前面实施例 1.3 的描述制备质粒 p7.5/tk3。通过将 NcoI 和 ApaLI 之间的 4 个核苷酸 ATAC 换成 ATAGC, 将质粒 p7.5/tk3 转化为 p7.5/tk3.1, 这样 NcoI 中的起始密码子 ATG 在没有插入的信号肽时与 ApaLI 读框相符。通过用具有序列 5'-GCGGCCGCC ATGGATAGCG TGC ACTTGAC TCGAGAAGCT TAGTAGTCGA C-3' (文中称为 SEQ ID NO: 112) 的盒代替实施例 1.3 中描述的 NotI-to-SaII 盒 (SEQ ID NO: 29) 可以很方便地实现转化。

通过用以下序列盒: XhoI- (编码 V κ 的氨基酸 106-107 的核苷

酸)-(编码 10 氨基酸接头的核苷酸)-G-BssHII-ATGC-BstEII-(编码 VH 的氨基酸 111-113 的核苷酸)-终止密码子-SalI 来替代 XhoI 和 SalI 之间的区域(即 SEQ ID NO: 12 的核苷酸 30 到 51, 文中称为 SEQ ID NO: 113), 将质粒 p7.5/tk3.1 转化为 p7.5/tk3.2。这是通过用 XhoI 和 SalI 消化 p7.5/tk3.1, 并插入一个序列为 5' CTCGAGAT CAAAGAGGGT AAATCTTCCG GATCTGGTTC CGAAGGCGCG CATGCGGTCA CCGTCTCCTC ATGAGTCGAC 3' 的盒(文中称为 SEQ ID NO: 114)实现的。V κ 和 VH 之间的接头最终大小为 14 个氨基酸, 其中最后的 4 个氨基酸来自如下插入的 VH PCR 产物。接头的序列是 5' GAG GGT AAA TCT TCC GGA TCT GGT TCC GAA GGC GCG CAC TCC 3' (SEQ ID NO: 115), 其编码氨基酸 EGKSSGSGSEGAHS (SEQ ID NO: 116)。

通过用以下序列盒: HindIII-(编码 V λ 的氨基酸 105-107 的核苷酸)-(编码 10 氨基酸接头的核苷酸)-G-BssHII-ATGC-BstEII-(编码 VH 的氨基酸 111-113 的核苷酸)-终止密码子-SalI 来替代 HindIII 和 SalI 之间的区域(即 SEQ ID NO: 112 的核苷酸 36 到 51) (文中称为 SEQ ID NO: 117), 将质粒 p7.5/tk3.1 转化为 p7.5/tk3.3。这是通过用 HindIII 和 SalI 消化 p7.5/tk3.1, 并插入一个序列为 5' AAGCTTACCG TCCTAGAGGG TAAATCTTCC GGATCTGGTTC CGAAGGCGCG CATGCGGTCA CCGTCTCCTC ATGAGTCGAC 3' 的盒(文中称为 SEQ ID NO: 118)实现的。V λ 和 VH 之间的接头最终大小为 14 个氨基酸, 其中最后的 4 个氨基酸来自如下插入的 VH PCR 产物。接头的序列是 5' GAG GGT AAA TCT TCC GGA TCT GGT TCC GAA GGC GCG CAC TCC 3' (SEQ ID NO: 119), 其编码氨基酸 EGKSSGSGSEGAHS (SEQ ID NO: 120)。

13.2 scFv 的胞质形式。如下构建编码包含人 κ 或 λ 免疫球蛋白轻链可变区、并与人重链可变区融合在一起的 scFv 多肽的表达载体。

(a) 如下构建胞质 V κ VH scFv 表达产物。将利用表 1 和 2 列出

的引物，按照实施例 1.4(b)的描述制备的 κ 轻链可变区(V_{κ}) PCR 产物(氨基酸(-3)到(105))克隆到 p7.5/tk3.2 中的 ApaLI 和 XhoI 位点之间。因为 κ 轻链序列和所选的限制酶位点存在重叠，这导致构建出与下游接头翻译读框相同的连续 κ 轻链。将利用表 1 和 2 列出的引物，按照实施例 1.4(a)的描述制备的重链可变区(V_H) PCR 产物(氨基酸(-4)到(110))克隆到 p7.5/tk3.2 的 BssHII 和 BstEII 位点之间，形成一个完整的 scFv 开放读框。得到的产物是通过 14 氨基酸接头连接的胞质形式的 V_{κ} - V_H 融合蛋白。ScFv 前面还有位于氨基端的由限制位点编码的 6 个附加的氨基酸和部分 V_{κ} 信号肽。

(b) 如下构建胞质 V_{λ} V_H scFv 表达产物。将利用表 1 和 2 列出的引物，按照实施例 1.4(c)的描述制备的 λ 轻链可变区(V_{λ}) PCR 产物(氨基酸(-3)到(104))克隆到 p7.5/tk3.3 中的 ApaLI 和 HindIII 位点之间。因为 λ 轻链序列和所选的限制酶位点存在重叠，这导致构建出与下游接头翻译读框相同的连续 λ 轻链。将利用表 1 和 2 列出的引物，按照实施例 1.4(a)的描述制备的重链可变区(V_H) PCR 产物(氨基酸(-4)到(110))克隆到 p7.5/tk3.3 的 BssHII 和 BstEII 位点之间，形成一个完整的 scFv 开放读框。得到的产物是通过 14 氨基酸接头连接的胞质形式的 V_{λ} - V_H 融合蛋白。ScFv 前面还有位于氨基端的由限制位点编码的 6 个附加的氨基酸和部分 V_{λ} 信号肽。

13.3 分泌或膜结合形式的 scFv。13.2 部分描述的胞质 scFv 表达载体可以作为原型载体，其中克隆入分泌信号、跨膜结构域、胞质结构域或者它们的组合后就可以将 scFv 定位到细胞表面或胞外空间。表 7 列出了信号肽和膜锚定结构域的例子。为了将 scFv 多肽分泌到胞外空间，将一个编码符合读框的分泌信号肽的盒子插入 p7.5/tk3.2 或 p7.5/tk3.3 的 NcoI 和 ApaLI 位点之间，使它表达在 scFv 多肽的 N 末端。为了产生用于基于 Ig-交联或 Ig-结合的选择的膜结合型 scFv，除了信号肽，还将编码膜结合形式的 C_{μ} 的盒子克隆到 scFv 的 C 末端 BstEII 和 SalI 位点之间，处于编码 V_H 氨基酸

111-113 的核苷酸下游并与之读框相符。还可以加上一个胞质结构域。

实施例 14

骆驼化的人单链抗体文库的构建

Camelid 物种只用重链形成被称为重链抗体的抗体。痘病毒表达系统可以用于产生分泌型或膜结合的人单结构域文库，其中的人 V_H 结构域被“骆驼化”了，即被改变成与 camelid 抗体的 V_{Hh} 结构域相同，然后可以根据功能检测或 Ig-交联/结合进行选择。通过常规突变方法可以将人 V_H 基因骆驼化，使它更接近 camelid V_{Hh} 基因。例如，通过用 E 取代 G44, R 取代 L45, 以及 G 或 I 取代 W47, 可以将利用选自表 1 和 2 的合适引物对、按照实施例 1.4 的描述制备的人 V_H3 基因骆驼化。参见例如 Riechmann, L., 和 Muyldermans, S. J. Immunol. Meth. 231 : 25-38。为了产生分泌型单结构域抗体文库，将编码骆驼化的人 V_H 基因的盒子克隆到实施例 1.2 中制备的 pVHEs 的 BssHII 和 BstEII 位点，并读框相符地表达。为了产生膜结合的单结构域抗体文库，将编码骆驼化的人 V_H 基因的盒子克隆到如实施例 1.1 所述制备的 pVHE 的 BssHII 和 BstEII 位点，并读框相符地表达。载体 pVHE 和 pVHEs 已有克隆在 NcoI 和 BssHII 位点间的信号肽。对骆驼化的人 V_H 基因中三个 CDR 区的氨基酸残基进行广泛的随机化，然后在痘病毒中如文中所述对所得文库进行选择。

实施例 15

选择免疫效应子功能增强的 Fc 被修饰的抗体

人单克隆抗体正被用于医疗应用来治疗越来越多的人类疾病。人抗体可能通过特异细胞受体诱导或阻断信号传导。在某些应用中，人抗体可能通过抗体分子的 Fc 部分与这些效应细胞上的匹配 Fc 受体 (FcR) 之间的相互作用，激活许多辅助效应细胞。因此鉴定那些能增强或抑制 FcR 介导的结合和信号传导或者免疫效应子功能的其他介质 (比如补体系统的成分) 的结合和激活的免疫球蛋白重链恒定区序列的修饰很有趣。参见例如美国专利 5,624,821; Xu, D. 等, Cell

Immunol 200 : 16-26 (2000); 和美国专利 6,194,551, 这些文献全文引入此处作为参考。

一个这样的特异效应子功能是抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC), 该过程中包被抗体的靶细胞被 NK 细胞或其他单核细胞破坏。ADCC 是由这样的抗体分子介导的, 该分子具有编码针对靶细胞表面分子有特异性的可变区, 和编码针对 NK 细胞上的 Fc γ RIII 有特异性的恒定区。通过晶体结构分析和定点突变, 已经确定了人 IgG1 上的 Fc γ RIII 结合位点主要位于下铰链, 即 IgG1 的大约氨基酸 247-252, 以及邻近的 CH2 区域。参见例如 Sarmay G. 等, Mol Immunol 29: 633-639 (1992); 和 Michaelsen, T. E. 等, Mol Immunol 29: 319-26 (1992)。通过在可选择的哺乳动物表达载体中构建编码具有随机突变的下铰链区的抗体分子的基因文库, 就有可能选择到具有增强的 ADCC 功能的特异恒定区变体。为了简化这种策略的实施, 构建一个具有赋予目的特异性的确定免疫球蛋白可变区序列的文库。

15.1. pVHE-X 和 pVKE-X 或 pVLE-X 的构建。如下构建质粒 pVHE-X (具有确定可变区的人 VH 表达载体, 文中称为 X)。图 11 阐述了构建过程。通过常规方法分离, 或者利用痘病毒载体通过文中描述的方法在真核细胞内制备并选择具有特定特异性 X 的抗体。如果有必要, 将抗体的 VH 基因亚克隆到如实施例 1.1 所述制备的 pVHE 中的 BssHa/BstEII 位点之间, 产生质粒 pVHE-X。同样如果需要, 可以将抗体的 VK 或 VL 基因分别亚克隆到如实施例 1.3 所述制备的 pVKE 的 ApaLI/XhoI 位点, 产生 pVKE-X, 或者亚克隆到如实施例 1.3 所述制备的 pVLE 的 ApaLI/HindIII 位点, 产生 pVLE-X。

15.2 人 C γ 1 盒子的分离。使用以下引物, 用 SMART™ RACE cDNA 扩增试剂盒从骨髓 RNA 中分离编码人 C γ 1 重链的 cDNA:

huC γ 1-5B: 5' ATTAGGATCC GGTCACCGTC TCCTCAGCC3' (SEQ ID NO:121)

huC γ 1-3S: 5' ATTAGTCGACTCATTACCC GGAGACAGGG AGAG3' (SEQ ID NO:122).

PCR 产物包含以下元件: BamHI-BstEII- (编码 VH 的氨基酸 111-113 的核苷酸)-(编码 C γ 1 的氨基酸 114-478 的核苷酸)-TGA-SalI。将这个产物亚克隆到 pBluescriptII/KS 的 BamHI 和 SalI 位点, 通过定点突变去掉对应着 C γ 1 的 CH1 结构域中氨基酸 191 和 192 的第二个 BstEII 位点, 不改变氨基酸序列。

15.3 Fc γ 1 文库的构建。通过以下方法经重叠 PCR 制备 C γ 1 变体。将如 15.2 部分所述制备的 BstEII-突变的 C γ 1 盒子作为第一轮 PCR 的模板, 扩增用 C γ 1-有义/C γ 1-内部-R 和 C γ 1-内部-S/C γ 1-反向引物组在两个单独的反应中进行。

C γ 1-有义: 5' AATATGGTCACCGTCTCCTCAGCC3' (SEQ ID NO:123)

C γ 1-内部-R: 5' (MNN)₆TTCAGGTGCTGGGCACGG3' (SEQ ID NO:124)

C γ 1-内部-S: 5' (NNK)₆GTCTTCCTCTTCCCCCA3' (SEQ ID NO:125)

C γ 1-反向: 5' AATATGTCGACTCATTTACCCGG3' (SEQ ID NO:126)

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

C γ 1-内部-R 和 C γ 1-内部-S 引物具有编码 6 氨基酸的变体的简并序列尾部, 所述 6 氨基酸包含下铰链的残基 247-252。在第二轮 PCR 中, 用 C γ 1 有义和 C γ 1 反向引物经重叠 PCR 将第一轮的纯化产物融合在一起。

得到的产物体积约为 1000bp, 在氨基酸 247-252 的每个位置随机编码所有的 20 种氨基酸。用 BstEII 和 SalI 消化 PCR 产物, 并克隆到 BstEII/SalI 消化好的 pVHE-X (如 15.1 部分所述制备) 中, 产生 pVHE-X- γ 1 变体文库。然后如实施例 5 的描述利用三分子重组将这些变体导入痘苗病毒。联合携带轻链的重组体痘苗病毒, 该 Fc γ 1 文库将可用于选择那些赋予 VHE-X- γ 1 表达抗体以增强的 ADCC 活性的 Fc 变体。

15.4 其他应用。除了产生氨基酸 247-252 的变体, 其他残基比如 IgG1 的氨基酸 278-282 和氨基酸 346-351 也参与和 Fc γ RIII 的结合。鉴定到显示出增强的 ADCC 活性的发生在氨基酸 247-252 的 Fc γ 1 变体后, 可以采用同样的策略来鉴定其他两个区域内的那些显示出

协同增强 ADCC 功能的其他突变。

同样的原理/技术可以用于鉴定这样一些变体，它们赋予结合不同 Fc 受体的其他免疫球蛋白重链恒定区同种型以增强的效应子功能。优选实施方案中，目标受体包括 Fc γ RI (CD64)，Fc γ R II-A (CD32)，Fc γ R II-B1，Fc γ R II-B2，Fc γ R III (CD16)，和 Fc ϵ RI。在其他优选实施方案中，可以选择能增强补体成分与 Fc 区域的结合或者 Fc 介导的与胎盘膜的结合以便经胎盘转运的变体。

实施例 16

构建重链融合蛋白来协助选择感染了特异免疫球蛋白基因重组体痘苗病毒的细胞

16.1 CH1-Fas 的构建。通过以下方法构建编码融合蛋白的表达载体，该融合蛋白包含 C μ 的人重链 CH1 结构域，以及与之融合的 Fas 的跨膜和死亡结构域，文中命名为 CH1-Fas。图 13 (a) 图示了该融合蛋白。

用 BstEII 和 SalI 消化如实施例 1.1 所述制备的质粒 pVHE，凝胶纯化大约 1.4kb 的小 DNA 片段。然后将这个小片段作为 PCR 反应的模板，所用引物为正向引物 CH1 (F)-5' ACACGGTCAC CGTCTCCTCAGGGAGTGC 3' (SEQ ID NO : 127) 和反向引物 CH1 (R) 5' AGTTAGATCTGGATCCTGGA AGAGGCACGT T 3' (SEQ ID NO : 128)。对得到的大约 320 碱基对的 PCR 产物进行凝胶纯化。

用正向引物 FAS (F) 5' AACGTGCCTC TTCCAGGATC CAGATCTAAC 3' (SEQ ID NO: 129) 和反向引物 FAS (R) 5' ACGCGTCGAC CTAGACCAAGCTTTGGATTT CAT 3' (SEQ ID NO : 130) 从质粒 pBS-AP014.2 扩增包含 Fas 的跨膜和死亡结构域的 DNA 片段。得到的大约 504 碱基对的 PCR 产物经凝胶纯化。

然后将得到的 320 和 504 碱基对的片段合并在一个 PCR 反应中，利用正向引物 CH1 (F) 和反向引物 FAS (R) 制备大约 824 个碱基对的融合片段。用 BstEII 和 SalI 消化该片段，得到的 810 个碱基对的片段经凝胶纯化。质粒 pVHE 也用 BstEII 和 SalI 消化，得到的大约

5.7kb 的大片段经凝胶纯化。然后将这两个 BstEII/SalI 片段连接产生 CH1-Fas。

16.2 CH4-Fas 的构建。通过以下方法构建编码融合蛋白的表达载体，该融合蛋白包含 C μ 的人重链 CH1-CH4 结构域，以及与之融合的 Fas 的跨膜和死亡结构域，文中命名为 CH4-Fas。图 13 (b) 图示了该融合蛋白。

用 BstEII 和 SalI 消化如实施例 1.1 所述制备的质粒 pVHE，凝胶纯化大约 1.4kb 的小 DNA 片段。然后将这个小片段作为 PCR 反应的模板，所用引物为正向引物 CH4 (F) 5' CTCTCCCGCG GACGTCTTCG T 3' (SEQ ID NO : 131) 和反向引物 CH4 (R) 5' AGTTAGATCT GGATCCCTCA AAGCCCTCCT C 3' (SEQ ID NO : 132)。得到的大约 268 碱基对的 PCR 产物经凝胶纯化。

用正向引物 FAS (F2) 5' GAGGAGGGCT TTGAGGGATC CAGATCTAAC 3' (SEQ ID NO: 133) 和 16.1 部分中的反向引物 FAS(R)，从质粒 pBS-AP014.2 扩增包含 Fas 的跨膜和死亡结构域的 DNA 片段。得到的大约 504 碱基对的 PCR 产物经凝胶纯化。

然后将得到的 268 和 504 碱基对的片段合并在一个 PCR 反应中，利用正向引物 CH4 (F) 和反向引物 FAS (R) 制备大约 765 个碱基对的融合片段。用 SacII 和 SalI 消化该片段，得到的 750 个碱基对的片段经凝胶纯化。质粒 pVHE 也用 SacII 和 SalI 消化，得到的大约 6.8kb 的大片段经凝胶纯化。然后将这两个 SacII/SalI 片段连接产生 CH4-Fas。

16.3 CH4(TM)-Fas 的构建。通过以下方法构建编码融合蛋白的表达载体，该融合蛋白包含 C μ 的人重链 CH1-CH4 结构域和跨膜结构域，以及与之融合的 Fas 的死亡结构域，文中命名为 CH4 (TM) -Fas。图 13 (c) 图示了该融合蛋白。

用 BstEII 和 SalI 消化如实施例 1.1 所述制备的质粒 pVHE，凝胶纯化大约 1.4kb 的小 DNA 片段。然后将这个小片段作为 PCR 反应的模板，所用引物为 16.2 部分的正向引物 CH4 (F) 和反向引物 CH4 (R2)

5' AATAGTGGTG ATATATTTCA CCTTGAACAA 3' (SEQ ID NO : 134)。得到的大约 356 碱基对的 PCR 产物经凝胶纯化。

用正向引物 FAS (F3) 5' TTGTTCAAGG TGAAAGTGAA GAGAAAGGAA 3' (SEQ ID NO: 135)和 16.1 部分中的反向引物 FAS(R)从质粒 pBS-AP014.2 扩增包含 Fas 的死亡结构域的 DNA 片段。得到的大约 440 碱基对的 PCR 产物经凝胶纯化。

然后将得到的 356 和 440 碱基对的片段合并在一个 PCR 反应中, 利用正向引物 CH4 (F) 和反向引物 FAS (R) 制备大约 795 个碱基对的融合片段。用 SacII 和 SalI 消化该片段, 得到的 780 个碱基对的片段经凝胶纯化。质粒 pVHE 也用 SacII 和 SalI 消化, 得到的大约 6.8kb 的大片段经凝胶纯化。然后将这两个 SacII/SalI 片段连接, 产生 CH4 (TM) -Fas。

16.4 将各种 VH 基因克隆和插入 Ig-Fas 融合蛋白。将利用表 1 和 2 所列的引物, 如实施例 1.4(a)所述制备的重链可变区 (VH) PCR 产物 (氨基酸 (-4) 到 (110)) 克隆到 CH1-Fas, CH4-Fas 和 CH4 (TM)-Fas 的 BssHII 和 BstEII 位点。因为 CH1 结构域序列和所选限制酶位点存在重叠, 这将构建成缺少功能性信号肽但处于正确翻译读框的连续重链片段。

实施例 17

表达 Ig α 和 Ig β 的 HeLaS3 和 COS7 细胞系的制备

为了在细胞表面表达特异性人单克隆抗体, 重链和轻链免疫球蛋白必须与 B 细胞受体复合体的其他蛋白物理连接。因此, 为使宿主细胞能表达人抗体文库, 它们必须能表达将抗体有效地合成和装配成膜结合受体所需要的分子和结构。小鼠淋巴瘤细胞能表达在细胞表面表达特异性人抗体所需要的分子和结构。但是将淋巴瘤细胞用于人抗体文库表达的一个缺点是, 内源表达的免疫球蛋白重链和/或轻链能够与转基因免疫球蛋白链共装配, 导致形成非特异性的异源分子, 它将稀释抗原特异性受体。用小鼠淋巴瘤细胞来表达人抗体文库的另一个缺点是痘苗病毒在淋巴细胞系中复制很弱。因此, 优选用于表达特异

性人抗体的细胞类型是那些允许产生高滴度痘苗病毒和那些不是衍生自 B 细胞系的细胞。优选的细胞类型包括 HeLa 细胞, COS7 细胞和 BSC-1 细胞。

B 细胞受体的免疫球蛋白重链和轻链与 Ig α 和 Ig β 跨膜蛋白的异二聚体物理连接在一起 (Reth, M. 1992. Annu. Rev. Immunol. 10: 97)。这种物理连接是膜结合免疫球蛋白有效地转运到细胞表面和经过 B 细胞受体进行信号传导所必需的 (Venkitaraman, A. R 等, 1991. Nature 352: 777)。但是还不清楚 Ig α /Ig β 异二聚体对于在异源细胞系内表达膜结合型免疫球蛋白是否是必要而充分的。因此, 用人 Ig α 和 Ig β cDNA 转染 HeLaS3 和 COS7 细胞后, 对人抗体在这些细胞表面上的表达进行了评估。

17.1 通过 PCR 克隆人 Ig α 和 Ig β cDNA。将从经 EBV 转化的人 B 细胞制备的 cDNA 作为 PCR 反应的模板来扩增人 Ig α 和 Ig β cDNA。用以下引物扩增人 Ig α cDNA:

ig α 5'-5'ATTAGAATTCATGCCTGGGGGTCCAGGA3' (SEQ ID NO:136); 和
ig α 3'-5'ATTAGGATCCTCACGGCTTCTCCAGCTG3' (SEQ ID NO:137)。

用以下引物扩增人 Ig β cDNA:

ig β 5'-5'ATTAGGATCCATGGCCAGGCTGGCGTTG3' (SEQ ID NO:138);
ig β 3'-5'ATTACCAGCACACTGGTCACTCCTGGCCTGGGTG3' (SEQ ID NO:139)。

将 Ig α PCR 产物克隆到 pIRESneo 表达载体 (Clontech) 的 EcoRI 和 BamHI 位点, 而将来自 Ig β PCR 反应的产物克隆到 pIREShyg 载体 (Clontech) 的 BamHI 和 BstXI 位点。通过 DNA 测序证实克隆到的 Ig α 和 Ig β 。

17.2 建立表达 Ig α 和 Ig β 的 HeLaS3 和 COS7 稳定转染子。利用 LIPOFECTAMINE PLUS Reagent (Life technologies), 将 0.5 到 1 μ g 的纯化 pIRESneo-Ig α 和 pIREShygIg β 质粒 DNA 转染 HeLaS3 和 COS7 细胞 (6 孔板中 1×10^6 /孔)。开始 2 天后, 用 G418 (于 0.4 mg/ml) 和潮霉素 B (于 0.2 mg/ml) 选择大约 2 周。直接分离抗药性 HeLaS3

菌落，通过有限稀释克隆 COS7 转染子。然后通过 RT-PCR 分析这些克隆的 Ig α 和 Ig β 表达情况，代表性克隆的结果示于图 14。

实施例 18

构建高亲和力人抗体的多样化文库

本发明是现有的唯一可用于在疫苗或其他痘病毒中构建免疫球蛋白基因多样化文库的方法。可以设计疫苗载体使它高水平表达膜受体，从而能有效地结合到包被抗原的基质上。或者，可以将重组体免疫球蛋白重链基因工程化，以便在受体被抗原交联时诱导细胞凋亡。因为疫苗病毒可以很容易地从即使是发生程序化死亡的细胞内高效回收，该系统的独特特点使它能快速地选择特异人抗体基因。

顺序选择最佳免疫球蛋白重链和轻链，通过筛选所有可供利用的重链和轻链组合而使多样性最大化。顺序筛选策略首先在含 10^4 个不同轻链的小文库存在的情况下，从含 10^5 个 H 链重组体的小文库中选择最佳重链。然后用这个优化的 H 链从一个较大的含 10^6 到 10^7 个重组体 L 链的文库中选择其最佳搭档。一旦选择到最佳 L 链，就可以从较大的含 10^6 到 10^7 个重组体 H 链文库中选择更佳的 H 链。这种反复是一种鞋带策略，它能从多达 10^{14} 种 H_2L_2 组合中选择到特异性的高亲和力抗体。相反，在噬菌体文库中选择单链 Fv 或者选择在单个质粒上编码的由单独的 VH-CH1 和 VL-CL 基因构成的 Fab 是一步过程，它受到单噬菌体文库实际大小（也许是 10^{11} 个噬菌体颗粒）的限制。

因为筛选 10^7 种 H 链和 10^7 种 L 链的 10^{14} 种组合是不可行的，故为选择最佳 H 链，开始时在有非感染性载体中的 10^4 种 L 链存在的情况下，从 10^5 H 链疫苗重组体的文库中进行选择。这些组合很可能产生许多表位的低亲和力抗体，导致选择到例如 1 到 100 个不同 H 链。如果对于一个基本抗体选择到 100 个 H 链，然后将它们用于在 10^6 或 10^7 疫苗重组体 L 链的更大文库中进行第二轮选择，挑取 100 个最佳 L 链搭档。然后搁置原来的 H 链，用这 100 个 L 链从 10^6 或 10^7 H 链的更大文库中选择新的更高亲和力的 H 链。这个策略象一种体外亲和力增大化。正如在正常免疫应答中一样，首先选择出低亲和力抗体

然后在反复的免疫循环中作为选择更高亲和力后代的基础。高亲和力克隆可能来源于体内的体细胞突变，而这种体外策略通过免疫球蛋白链的重新结合可以达到同样的目的。这两种情况中，改良的免疫球蛋白链的搭档和开始的低亲和力抗体的搭档是一样的。

该策略的基础是控制起始时对低亲和力抗体的选择。选择到低亲和力抗体很关键。用于顺序选择 H 和 L 链的基于痘苗的方法可适当地优化，以确保开始的低亲和力选择是成功的，因为它具备表达二价抗体带来的亲和力优势。此外，通过在痘苗系统中采用不同启动子可以调控抗体表达的水平。例如，适应痘苗的 T7 聚合酶系统比天然的痘苗启动子产生更高水平的表达。开始几轮选择可基于高水平 T7 表达系统来保证选择到低亲和力的“基本抗体”，后面几轮选择可基于低水平表达来引导选择高亲和力的衍生物。

以下是本发明用于在痘苗中构建免疫球蛋白基因多样化文库的方法的概括：

1. 根据文中描述的方法，在痘苗病毒载体中构建来自人淋巴细胞的免疫球蛋白膜相关性重链 cDNA 文库。用稀释的病毒文库（平均每个细胞被一个病毒免疫球蛋白重链重组体感染）感染特别工程化的细胞，例如 CH33 细胞，小鼠骨髓瘤细胞和人 EBV 转化细胞系，或者优选 HeLa 细胞和其他不产生竞争性免疫球蛋白链并能有效支持痘苗复制的非淋巴细胞。

2. 用补骨脂素灭活的来自构建在相同痘苗病毒载体中的免疫球蛋白轻链文库中的免疫球蛋白轻链重组体痘苗病毒感染同样这些细胞。或者，可以用质粒表达载体中的免疫球蛋白轻链重组体转染这些细胞。在整个细胞群中，每个重链可以与任何轻链相关联。

3. 将细胞培养合适的时间，以便在细胞表面得到完全装配好的抗体的最优表达。宿主细胞不是淋巴性来源时，采用已经稳定转染了表达 Ig α 和 Ig β 蛋白的基因或 cDNA 的宿主细胞，例如 HeLa 或 Cos 7 细胞，可以提高膜抗体表达的效率。

- 4a. 将目的抗原结合到惰性珠子上，然后将后者与抗体表达细胞

文库混合。回收结合到包被抗原的珠子上的细胞，提取相关的免疫球蛋白重链重组体病毒。

4b. 或者，给目的抗原直接或间接地连接上荧光标签。通过荧光激活细胞分选来回收与抗原结合的抗体表达细胞。

4c. 或者，可以采用那些抗体受体与抗原的交联将诱导细胞死亡的宿主细胞。这可能是宿主细胞 B 细胞种系的不成熟细胞时自然发生，或者是在免疫球蛋白重链恒定区的羧基端引入 Fas 编码的死亡结构域的结果。将裂解细胞与活细胞分开，提取携带相应免疫球蛋白重链的重组体病毒。

5. 将以上步骤 1-4 的循环重复几次，每次分离重组体病毒并进一步富集有利于最佳抗原结合的重链。

6. 一旦选择到特异抗体重链，对构建在专有性痘苗病毒中的免疫球蛋白轻链 cDNA 文库重复整个过程，以便选择有利于最佳抗原结合的特异免疫球蛋白轻链。通过筛选所有可供利用的重链和轻链组合来顺序选择重链和轻链，可以达到最大限度的多样化。通过选择完全装配的二价抗体而非单链 Fv 或单体 Fab 来优化最后的 Mab 产物。

7. 经标准实验技术确定 Mab 的序列并验证其特异结合。

通过选择完全装配的二价抗体而非单链 Fv 来优化最后的 Mab 产物。这就是说，选择是基于二价 (H_2L_2) 抗体而非 scFv 或 Fab 片段。在哺乳动物细胞内合成和装配完全人的完整抗体，可使得免疫球蛋白链能进行正常的翻译后修饰和装配。完整抗体的合成和装配可能在细菌细胞内效率非常低，并且会丢失许多特异性，因为许多抗体在细菌细胞的异常生理环境中不能正确折叠。

可以选择到比较宽范围的抗体表位特异性，包括根据功能活性选择特异性。具体地说，可以根据对靶细胞的特定生理效应来选择抗体（例如筛选对活化单核细胞的 TNF 分泌的抑制；诱导细胞凋亡等）。

如下是基于功能检测筛选特异 Mab 的方法概括：

1. 在根据文中描述的方法制备的痘苗病毒载体中构建未免疫人淋巴细胞的免疫球蛋白重链 cDNA 文库。将例如大约 100 到大约 1000

个重组体病毒的多个池分别扩增，用来感染生产者细胞，其稀释度使得平均每个细胞被一个免疫球蛋白重链重组体病毒感染。用补骨脂素灭活的来自构建在相同痘苗病毒载体中的免疫球蛋白轻链文库中的免疫球蛋白轻链重组体痘苗病毒感染同样这些细胞。或者，可以用质粒表达载体中的免疫球蛋白轻链重组体转染被感染细胞。在整个细胞群中，每个重链可以与任何轻链相关联。

2. 将被感染细胞培养足够的时间，使得完全装配的抗体进行分泌。

3. 建立检测孔，其中在有分泌抗体试样存在的情况下温育目的功能指示细胞。所述细胞可能例如包括分泌 $TNF\alpha$ 的活化单核细胞。然后可以采用简单的 $TNF\alpha$ ELISA 检测来筛选包含可抑制细胞因子分泌的活性的抗体池。

4. 进一步分析所选池的单个成员来鉴定相关免疫球蛋白重链。

5. 一旦选择到特异抗体重链，对构建在专有性痘苗病毒载体中的免疫球蛋白轻链 cDNA 文库重复整个过程，以便选择有利于最佳抗原结合的特异免疫球蛋白轻链。

6. 通过标准实验技术来鉴定 Mab 序列并验证其特异结合。因为功能性选择不需要对目标膜受体先有了解，故选择到的 Mab 既是潜在的药物也是鉴定相关膜受体的发现工具。

免疫球蛋白重链和轻链随机结合后，在人细胞培养物中进行选择。正如上面提到的，这避免了细菌内合成方面的限制导致的抗体组的局限。它还能避免在小鼠中对同源基因产物的耐受性造成的对抗体组的限制。重要人蛋白质的小鼠同系物通常与人序列有 80%到 85%相同。因此，预计对人蛋白质的小鼠抗体反应主要集中在人和小鼠中不同的 15%到 20%表位。本发明使得能有效选择具有宽范围表位特异性的高亲和力、完全人的抗体。这项技术可以用于多种项目和目的，包括对具有特定生理意义的未鉴定膜受体的抗体进行功能性选择。

本发明的范围不受所述具体实施方案的限制，这些实施方案用于作为发明的个别方面的一个例证，所有功能等同的构建体，病毒和酶

都在本发明的范围内。确实，除了文中显示和描述的，根据前面的说明书和附图，本发明的各种改变对本领域普通技术人员是显而易见的。这些改变都落在所附权利要求的范围内。

说明书中提到的所有出版物和专利申请均单独并具体地全文引入作为参考。1997年9月22日提交的美国专利申请 08/935377 和 2000年3月28日提交的美国专利申请 60/192586 引入此处作为参考。

<110> University of Rochester

<120> 在真核细胞中产生和鉴定免疫球蛋白分子的体外方法

<130> 1821.007PC05

<150> 60/271,424

<151> 2001-02-27

<150> 60/262,067

<151> 2001-01-18

<150> 60/298,087

<151> 2001-06-15

<150> 60/249,268

<151> 2000-11-17

<160> 147

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p7.5/tk 启动子

<400> 1

ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgcatggg cccggcc

57

<210> 2

<211> 145

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p 7.5/ATG0/tk 启动子

<400> 2

```
ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgccgtgga tcccccgggc      60
tgagggaatt cgatatcaag cttatcgata ccgtcgacct cgaggggggg cctaactaac      120
taattttggt tttgtgggcc cgccc                                145
```

<210> 3

<211> 148

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p 7.5/ATG1/tk 启动子

<400> 3

```
ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgccatggt ggatcccccg      60
ggctgcagga attcgatata aagcttatcg ataccgtcga cctcgagggg gggcctaact      120
aactaatttt gtttttgtgg gcccgccc                                148
```

<210> 4

<211> 149

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p7.5/ATG2/tk 载体

<400> 4

```
ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgccatgag tggatcccc      60
gggctgcagg aattcgatat caagcttatc gataccgtcg acctogaggg ggggcctaac      120
taactaattt tgtttttgtg ggcccggcc                                149
```

<210> 5

<211> 150

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p7.5/ATG3/tk 载体

<400> 5

ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgagg cggccatgac gtggatcccc 60

cgggctgcag gaattcgata tcaagcttat cgataccgtc gacctcgagg gggggcctaa 120

ctaactaatt ttgtttttgt gggcccggcc 150

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头肽

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头肽

<400> 7

Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>接头肽

<400> 8

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr
1 5 10

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>接头肽

<400> 9

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln
1 5 10 15

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>接头肽

<400> 10

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>接头肽

<400> 11

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>接头肽

<400> 12

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>接头肽

<400> 13

Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp
1 5 10 15

<210> 14

<211> 1555

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pVHE 转移质粒

<400> 14

```

ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgcaaacca tgggatggag      60
ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc tacaggcgcg catatggtca cgtctctctc      120
agggagtgca tccgccccaa cccttttccc cctcgtctcc tgtgagaatt ccccgtegga      180
tacgagcagc gtggccgttg gctgcctcgc acaggacttc cttcccgact ccatcacttt      240
ctoctggaaa tacaagaaca actctgacat cagcagcacc cggggcttcc catcagtcct      300
gagagggggc aagtacgcag ccacctcaca ggtgctgctg ccttccaagg acgtcatgca      360
gggcacagac gaacacgtgg tgtgcaaagt ccagcaccac aacggcaaca aagaaaagaa      420
cgtgcctctt ccagtgattg ctgagctgac tcccaaagtg agcgtcttcg tcccaccccg      480
cgacggcttc ttcggaacc cccgcagcaa gtccaagctc atctgccagg ccacgggttt      540
cagtccccgg cagattcagg tgtcctggct gcgcgagggg aagcaggtgg ggtctggcgt      600
caccacggac caggtgcagg ctgaggccaa agagtctggg cccacgacct acaaggtgac      660
tagcacactg accatcaaag agagcgactg gctcagccag agcatgttca cctgccgcgt      720
ggatcacagg ggcctgacct tccagcagaa tgcgtcctcc atgtgtgtcc ccgatcaaga      780
cacagccatc cgggtcttcg ccattcccc atcctttgcc agcatcttcc tcaccaagtc      840
caccaagttg acctgcctgg tcacagacct gaccacctat gacagcgtga ccatctcctg      900
gacccgccag aatggcgaag ctgtgaaaac ccacaccaac atctccgaga gccaccccaa      960
tgccactttc agcgcctggt gtgaggccag catctgcgag gatgactgga attccgggga     1020
gaggttcacg tgcaccgtga cccacacaga cctgccctcg cactgaagc agaccatctc     1080
ccggccccaa ggggtggccc tgcacaggcc cgatgtctac ttgctgccac cagccccgga     1140
gcagctgaac ctgcgggagt cggccacat cacgtgcctg gtgacgggct tctctcccgc     1200
ggacgtcttc gtgcagtgga tgcagagggg gcagcccttg tccccggaga agtatgtgac     1260
cagcgcceca atgcctgagc cccaggcccc aggccggtac ttgcccaca gcatcctgac     1320
cgtgtccgaa gaggaatgga acacggggga gacctacacc tgcgtggtgg ccatgagggc     1380
cctgcccac agggtcactg agaggaccgt ggacaagtcc accgaggggg aggtgagcgc     1440

```

cgacgaggag ggctttgaga acctgtgggc caccgcctcc accttcacg tcctcttcct 1500
 cctgagcctc ttctacagta ccaccgtcac cttgttcaag gtgaaatgag tcgac 1555

<210> 15

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pVHE 中的独特 BssHII 位点

<400> 15
 gcgcgc

6

<210> 16

<211> 7

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pVHE 中的独特 BstEII 位点

<400> 16
 ggtcacc

7

<210> 17

<211> 446

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pVKE 转移质粒

<400> 17
 ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgcccatgg gatggagctg 60

tatcatcctc ttcttgtag caacagctac aggcgtgcac ttgactcgag atcaaacgaa 120

ctgtggctgc accatctgtc ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 180

ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga 240
 aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca 300
 aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac 360
 acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct 420
 tcaacagggg agagtgttag gtcgac 446

<210> 18

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pVKE 质粒中的独特 ApaLI 位点

<400> 18
gtgcac

6

<210> 19

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pVKE 质粒中的独特 XhoI 位点

<400> 19
ctcgag

6

<210> 20

<211> 455

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pVLE 转移质粒

<400> 20

```

ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgogg cggcccatgg gatggagctg      60
tatcatcctc ttcttggtag caacagctac aggcgtgcac ttgactcgag aagcttaccg     120
tcctacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga     180
aatctggaac tgcctctggt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag     240
tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc     300
aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact     360
acgagaaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca     420
caaagagctt caacagggga gagtgttagg tcgac                                  455

```

<210> 21

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pVLE 质粒中的独特 ApaLI 位点

<400> 21
gtgcac

6

<210> 22

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pVLE 中的独特 HindIII 位点

<400> 22
aagctt

6

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H-2Kd 限制肽 (restricted peptide)

<400> 23

Gly Tyr Lys Ala Gly Met Ile His Ile
1 5

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 24

attaggatcc ggtcaccgtc tcctcaggg

29

<210> 25

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 25

attagtcgac tcatttcacc ttgaacaagg tgac

34

<210> 26

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于制备 p7.5/tk2 的序列盒

<400> 26

gcgccgcaa accatggaaa gcgcgcatat ggtcaccaaa agtcgac

47

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 27

attagatcc ggtcaccgtc tcctcaggg

29

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 28

attagtcgac tcagtagcag gtgccagctg t

31

<210> 29

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于制备 p7.5/tk3 的序列盒

<400> 29

gcggccgccc atggatcgt gcacttgact cgagaagctt agtagtcgac

50

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 30
caggactcga gatcaaacga actgtggctg 30

<210> 31

<211> 39

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 31
aatatgtcga cctaactc tcccctgttg aagctcttt 39

<210> 32

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 32
aatatgtcga cctaactc tcccctgttg aagctctt 38

<210> 33

<211> 40

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 33
atttaagctt accgtcctac gaactgtggc tgcaccatct 40

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 34

ttttgcgcgc actcccaggt gcagctggtg cagtctgg

38

<210> 35

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 35

ttttgcgcgc actccgaggt gcagctggtg gagtctgg

38

<210> 36

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 36

ttttgcgcgc actcccaggt gcagctgcag gagtoggg

38

<210> 37

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 37

gacggtgacc agggtgccct ggcccca

27

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 38

gacggtgacc agggtgccac ggcccca

27

<210> 39

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 39

gacggtgacc attgtccctt ggcccca

27

<210> 40

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 40

gacggtgacc agggttcctt ggcccca

27

<210> 41

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 41

gacggtgacc gtggtccctt ggcccca

27

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 42

tttgtgcaact ccgacatcca gatgaccag tctcc

35

<210> 43

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 43

tttgtgcaact ccgatgttgt gatgactcag tctcc

35

<210> 44

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 44

tttgtgcact ccgaaattgt gttgacgcag tctcc

35

<210> 45

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 45

tttgtgcact ccgacatcgt gatgaccccag tctcc

35

<210> 46

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 46

tttgtgcact ccgaaaacgac actcacgcag tctcc

35

<210> 47

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 47

tttgtgcact ccgaaattgt gctgactcag tctcc

35

<210> 48

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 48

gatctcgagc ttggtccctt ggccgaa

27

<210> 49

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 49

gatctcgagc ttggtccctt ggccaaa

27

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 50

gatctcgagt ttggtcccag ggccgaa

27

<210> 51

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 51
gatctcgagc ttggtccctc cgccgaa

27

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 52
aatctcgagt cgtgtccctt ggccgaa

27

<210> 53

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 53
tttgtgcaact cccagtctgt gttgacgcag ccgcc

35

<210> 54

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 54
tttgtgcaact cccagtctgc cctgactcag cctgc

35

<210> 55

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 55

tttgtgcact cctcctatgt gctgactcag ccacc

35

<210> 56

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 56

tttgtgcact cctcttctga gctgactcag gaccc

35

<210> 57

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 57

tttgtgcact cccacgttat actgactcaa ccgcc

35

<210> 58

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 58

tttgtgcact cccaggctgt gctcactcag ccgtc

35

<210> 59

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 59

tttgtgcact ccaattttat gctgactcag cccca

35

<210> 60

<211> 35

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 60

tttgtgcact cccaggctgt ggtgactcag gagcc

35

<210> 61

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 61

ggtaagcttg gtcccagttc cgaagac

27

<210> 62

<211> 25

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 62

ggtaagcttg gtccctccgc cgaat

25

<210> 63

<211> 39

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 63

aatatgcgcg cactcccagg tgcagctggt gcagtctgg

39

<210> 64

<211> 39

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 64

aatatgcgcg cactcccagg tcaccttgaa ggagtctgg

39

<210> 65

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 65

aatatgcgcg cactccgagg tgcagctggt ggagtctgg

39

<210> 66

<211> 39

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 66

aatatgcgcg cactcccagg tgcagctgca ggagtcggg

39

<210> 67

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 67

aatatgcgcg cactccgagg tgcagctggt gcagtctg

38

<210> 68

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 68

gagacggtga ccagggtgcc ctggcccca

29

<210> 69

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 69

gagacggtga ccagggtgcc acggcccca

29

<210> 70

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 70

gagacggtga ccattgtccc ttggcccca

29

<210> 71

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 71

gagacggtga ccagggttcc ctggcccca

29

<210> 72

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 72

gagacggtga ccgtggtccc ttggcccca

29

<210> 73

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 73

caggagtgca ctccgacatc cagatgaccc agtctcc

37

<210> 74

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 74

caggagtgca ctccgatggt gtgatgactc agtctcc

37

<210> 75

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 75

caggagtgca ctccgaaatt gtggtgacgc agtctcc

37

<210> 76

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 76

caggagtgca ctccgacatc gtgatgaccc agtctcc

37

<210> 77

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 77

caggagtgca ctccgaaacg aactcaccg agtctcc

37

<210> 78

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 78

caggagtgca ctccgaaatt gtgctgactc agtctcc

37

<210> 79

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 79

ttgatctcga gcttggtccc ttggccgaa

29

<210> 80

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 80

ttgatctcga gcttggtccc ctggcctaaa

29

<210> 81

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 81

ttgatctcga gtttggtccc agggccgaa

29

<210> 82

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 82

ttgatctcga gcttggtccc tccgccgaa

29

<210> 83

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 83

ttaatctcga gtcgtgtccc ttggccgaa

29

<210> 84

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 84

cagatgtgca ctcccagtct gtggtgacgc agccgcc

37

<210> 85

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 85

cagatgtgca ctcccagtct gccctgactc agcctgc

37

<210> 86

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 86

cagatgtgca ctctcctat gtgctgactc agccacc

37

<210> 87

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 87

cagatgtgca ctctcttct gagctgactc aggacc

37

<210> 88

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 88

cagatgtgca ctcccaggt atactgactc aaccgcc

37

<210> 89

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 89

cagatgtgca ctcccaggct gtgctcactc agccgtc

37

<210> 90

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 90

cagatgtgca ctccaatttt atgctgactc agcccca

37

<210> 91

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 91

cagatgtgca ctcccaggct gtggtgactc aggagcc

37

<210> 92

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 92

acggtaagct tgggccagct tccgaagac

29

<210> 93

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 93

acggtaagct tggccctcc gccgaatac

29

<210> 94

<211> 21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 94

atggttacgtc ctgtagaac c

21

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 95

tcattgtttg cctccctgct g

21

<210> 96

<211> 28

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 96

aaagcggccg ccccggatg ttacgtcc

28

<210> 97

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 97

aaagggcccg gcgcgcctca ttgtttgcc

29

<210> 98

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 98

aaaggatcca taatgaattc agtgactgta tcacacg

37

<210> 99

<211> 34

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 99

cttgcgcccg cttaataaat aaacccttga gccc

34

<210> 100

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 100
attgagctct taatactttt gtcgggtaac agag

34

<210> 101

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 101
ttactcgaga gtgtcgcaat ttggatttt

29

<210> 102

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 102
aaagaattcc ttattgtca tcggccaaa

29

<210> 103

<211> 30

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 103
aatctgcagt cattgtttgc ctcctgctg

30

<210> 104

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 104

aaagaattca taatgaattc agtgactgta tcacacg

37

<210> 105

<211> 32

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 105

cttggatcct taataaataa acccttgagc cc

32

<210> 106

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 106

aataagcttt actccagata atatgga

27

<210> 107

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 107
aatctgcagc ccagttccat ttt

23

<210> 108

<211> 23

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 108
aatggatcct catccagcgg cta

23

<210> 109

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 109
aatgagctct agtacctaca acccgaa

27

<210> 110

<211> 28

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 110
aaagtcgacg gccaaaaatt gaaatfff

28

<210> 111

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 111

aatggatcct cattgtttgc ctccc

25

<210> 112

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 将质粒 p7.5/tk3 转化为 p7.5/tk3.1 的序列盒

<400> 112

gcggccgccc atggatagcg tgcacttgac tcgagaagct tagtagtcga c

51

<210> 113

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 将质粒 p7.5/tk3.1 转化为 p7.5/tk3.2 时被取代的区域

<400> 113

ctcgagaagc ttagtagtcg ac

22

<210> 114

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于将质粒 p7.5/tk3.1 转化为 p7.5/tk3.2 的序列盒

<400> 114

ctcgagatca aagagggtaa atcttccgga tctggttccg aaggcgcgca tgcggtcacc 60

gtctcctcat gagtcgac 78

<210> 115

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p7.5/tk3.2 接头

<400> 115

gagggtaaat cttccggatc tggttccgaa ggcgcgcact cc 42

<210> 116

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p7.5/tk3.2 接头

<400> 116

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Gly Ala His Ser
1 5 10

<210> 117

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒 p7.5/tk3.1 转化为 p7.5/tk3.3 时被取代的区域

<400> 117
aagcttagta gtcgac

16

<210> 118

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于将质粒 p7.5/tk3.1 转化为 p7.5/tk3.3 的序列盒

<400> 118
aagcttaccg tcctagaggg taaatcttcc ggatctgggtt ccgaaggcgc gcatgcggtc

60

accgtctcct catgagtcga c

81

<210> 119

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p7.5/tk3.3 接头

<400> 119
gagggtaaat cttccgatc tggttccgaa ggcgcgcact cc

42

<210> 120

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p7.5/tk3.3 接头

<400> 120

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Gly Ala His Ser
1 5 10

<210> 121

<211> 29

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 121

attaggatcc ggtcaccgtc tcctcagcc

29

<210> 122

<211> 34

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 122

attagtcgac tcatttaccc ggagacaggg agag

34

<210> 123

<211> 24

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 123

aatatggtca ccgtctcctc agcc

24

<210> 124

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> **引物**

<220>

<221> 其他特性

<222> (2) .. (3)

<223> 可以是任何核苷酸

<220>

<221> 其他特性

<222> (5) .. (6)

<223> 可以是任何核苷酸

<220>

<221> 其他特性

<222> (8) .. (9)

<223> 可以是任何核苷酸

<220>

<221> 其他特性

<222> (11) .. (12)

<223> 可以是任何核苷酸

<220>

<221> 其他特性

<222> (14) .. (15)

<223> 可以是任何核苷酸

<220>

<221> 其他特性

<222> (17) .. (18)

<223> 可以是任何核苷酸

<400> 124
mnnmnmnmnm nmmnmnntt caggtgctgg gcacgg

36

<210> 125

<211> 36

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<220>

<221> 其他特性

<222> (1)..(2)

<223> 可以是任何核苷酸

<220>

<221> 其他特性

<222> (4)..(5)

<223> 可以是任何核苷酸

<220>

<221> 其他特性

<222> (7)..(8)

<223> 可以是任何核苷酸

<220>

<221> 其他特性

<222> (10)..(11)

<223> 可以是任何核苷酸

<220>

<221> 其他特性

<222> (13)..(14)

<223> 可以是任何核苷酸

<220>

<221> 其他特性

<222> (16)..(17)

<223> 可以是任何核苷酸

<400> 125
nnknnknnkn nknnknnkgt cttcctcttc ccccca

36

<210> 126

<211> 23

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 126
aatatgtcga ctcatattacc cgg

23

<210> 127

<211> 28

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 127
acacggtcac cgtctcctca gggagtgc

28

<210> 128

<211> 31

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 128

agttagatct ggatcctgga agaggcacgt t

31

<210> 129

<211> 30

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 129

aacgtgctc ttccaggatc cagatctaac

30

<210> 130

<211> 33

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 130

acgcgtcgac ctagaccaag ctttgattt cat

33

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 131

ctctcccgcg gacgtcttcg t

21

<210> 132

<211> 31

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 132

agttagatct ggatccctca aagccctcct c

31

<210> 133

<211> 30

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 133

gaggaggct ttgagggatc cagatctaac

30

<210> 134

<211> 30

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 134

aatagtggtg atatatttca cottgaacaa

30

<210> 135	
<211> 30	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>引物	
<400> 135	
ttggttcaagg tgaaagtgaa gagaaaggaa	30
<210> 136	
<211> 28	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>引物	
<400> 136	
attagaattc atgcctgggg gtccagga	28
<210> 137	
<211> 28	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>引物	
<400> 137	
attaggatcc tcacggcttc tccagctg	28
<210> 138	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 引物

<400> 138

attaggatcc atggccaggc tggcgttg

28

<210> 139

<211> 34

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 139

attaccagca cactgggtcac tcctggcctg ggtg

34

<210> 140

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p7.5/tk 启动子

<220>

<221> CDS

<222> (46)..(69)

<223>

<400> 140

ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccgcc atg ggc ccg gcc
Met Gly Pro Ala
1

57

gcc aac ggc gga
Ala Asn Gly Gly
5

69

<210> 141

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p7.5/tk 的 tk 序列

<400> 141

Met Gly Pro Ala Ala Asn Gly Gly
1 5

<210> 142

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pE/Ltk 启动子

<220>

<221> CDS

<222> (52)..(75)

<223>

<400> 142

ggccaaaaat tgaaatttta tttttttttt ttggaatata aagcggccgc c atg ggc 57
Met Gly
1

ccg gcc gcc aac ggc gga 75
Pro Ala Ala Asn Gly Gly
5

<210> 143

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pE/Ltk 的 tk 序列

<400> 143

Met Gly Pro Ala Ala Asn Gly Gly
1 5

<210> 144

<211> 39

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 144
aatatgcgcg cactcccagg tcaccttgaa ggagtctgg

39

<210> 145

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>引物

<400> 145
aatatgcgcg cactccgagg tgcagctggt gcagtctg

38

<210> 146

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 信号序列

<400> 146
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 147

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 信号序列

<400> 147

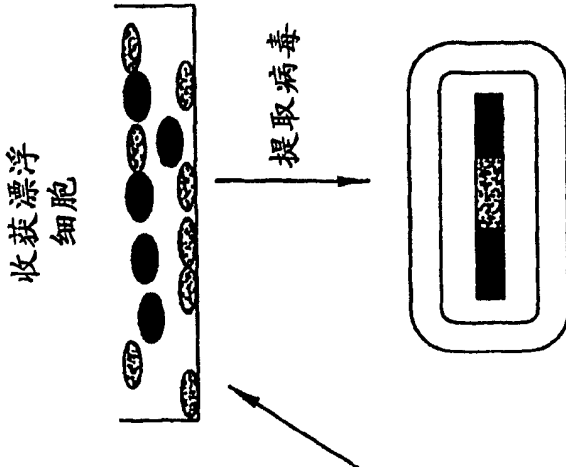
Asn Leu Trp Thr Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val Leu Phe Leu Leu Ser
1 5 10 15

Leu Phe Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe
 20 25

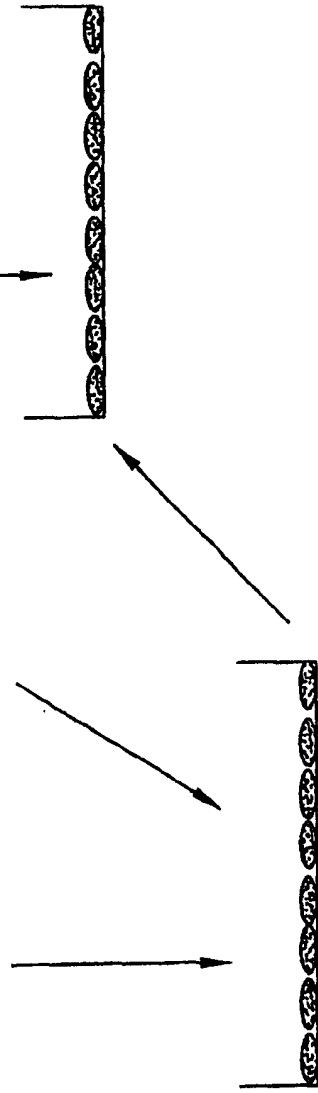
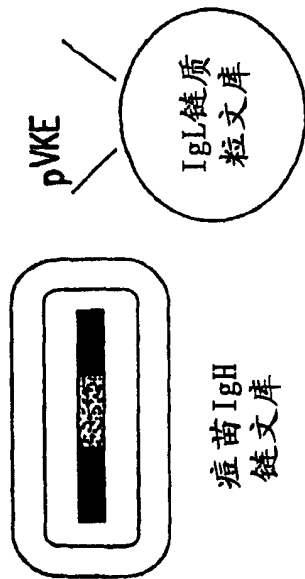
图1

通过抗原诱导的凋亡
选择特异性抗体

用抗原偶联的小珠或
抗原阳性转染体
使特异性受体交联



重复选择抗原特异性IgH
痘苗重组体，随后
选择IgL痘苗重组体



结合抗CD19的早期B
细胞淋巴瘤

图2A

制备目标细胞系

用选择构建体转染早期B细胞前体

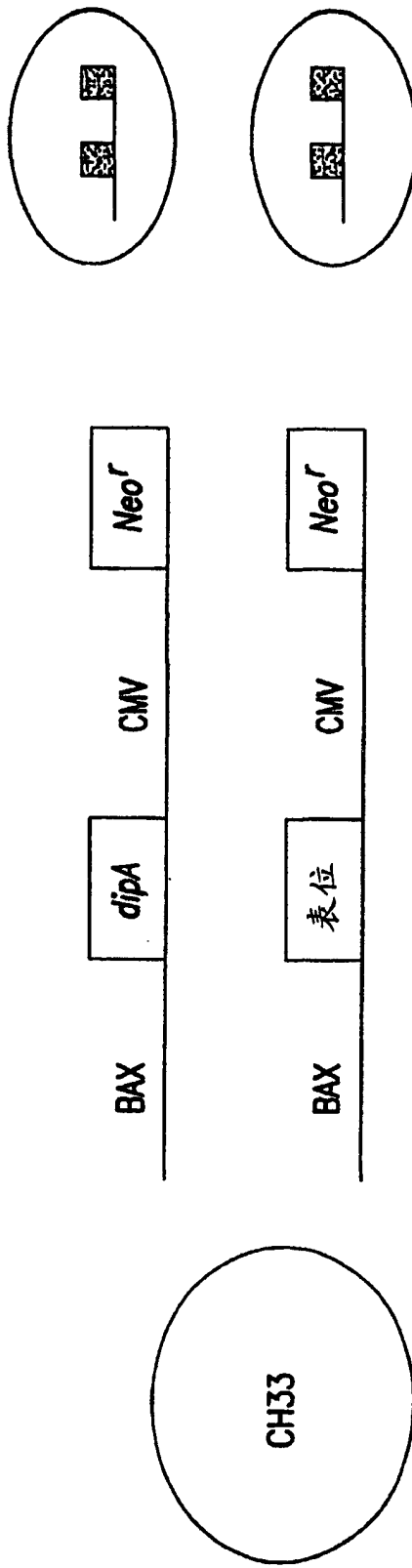


图 2B

证实被修饰的CH33目标细胞系

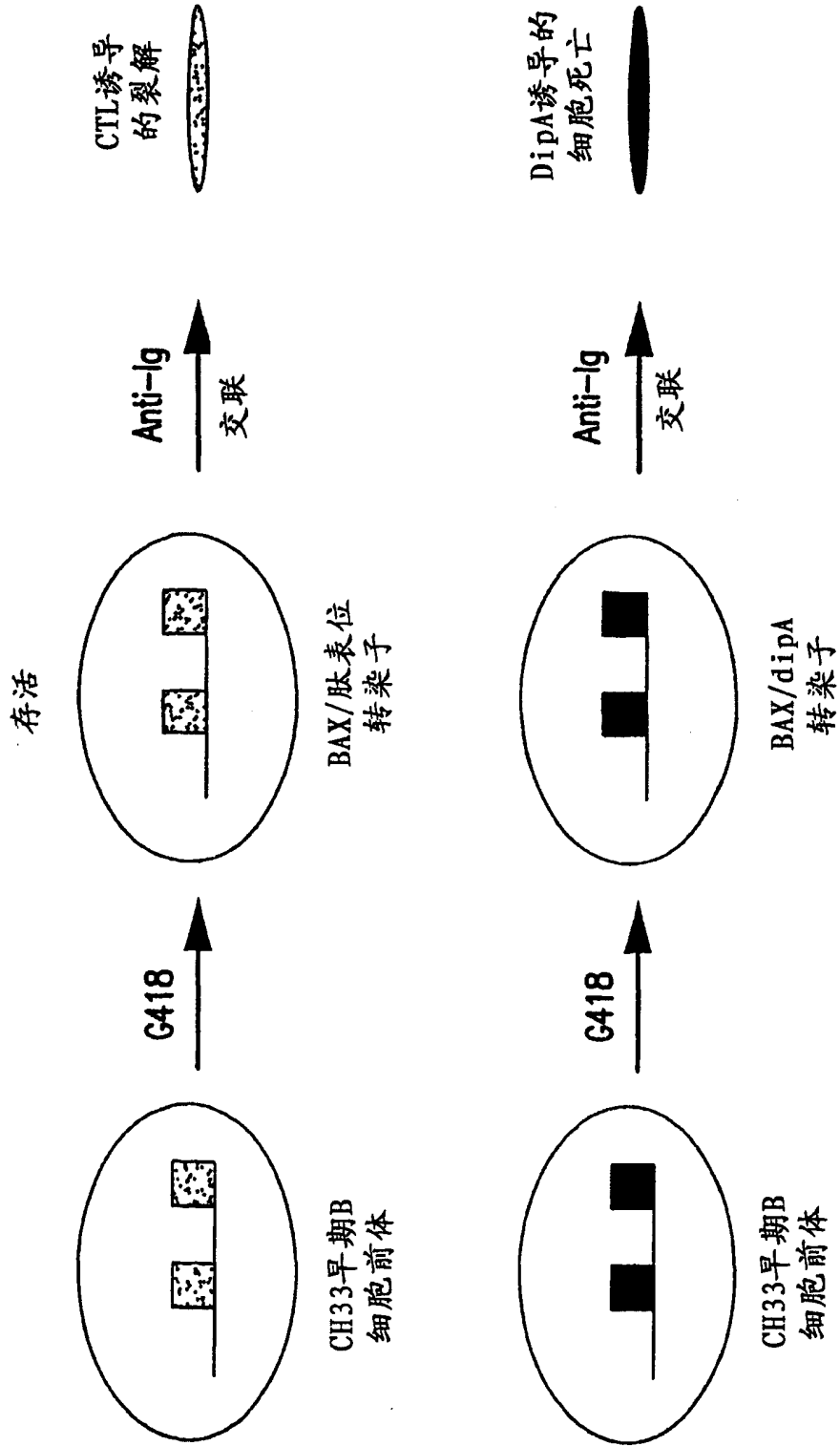


图 3

构建 pVLE

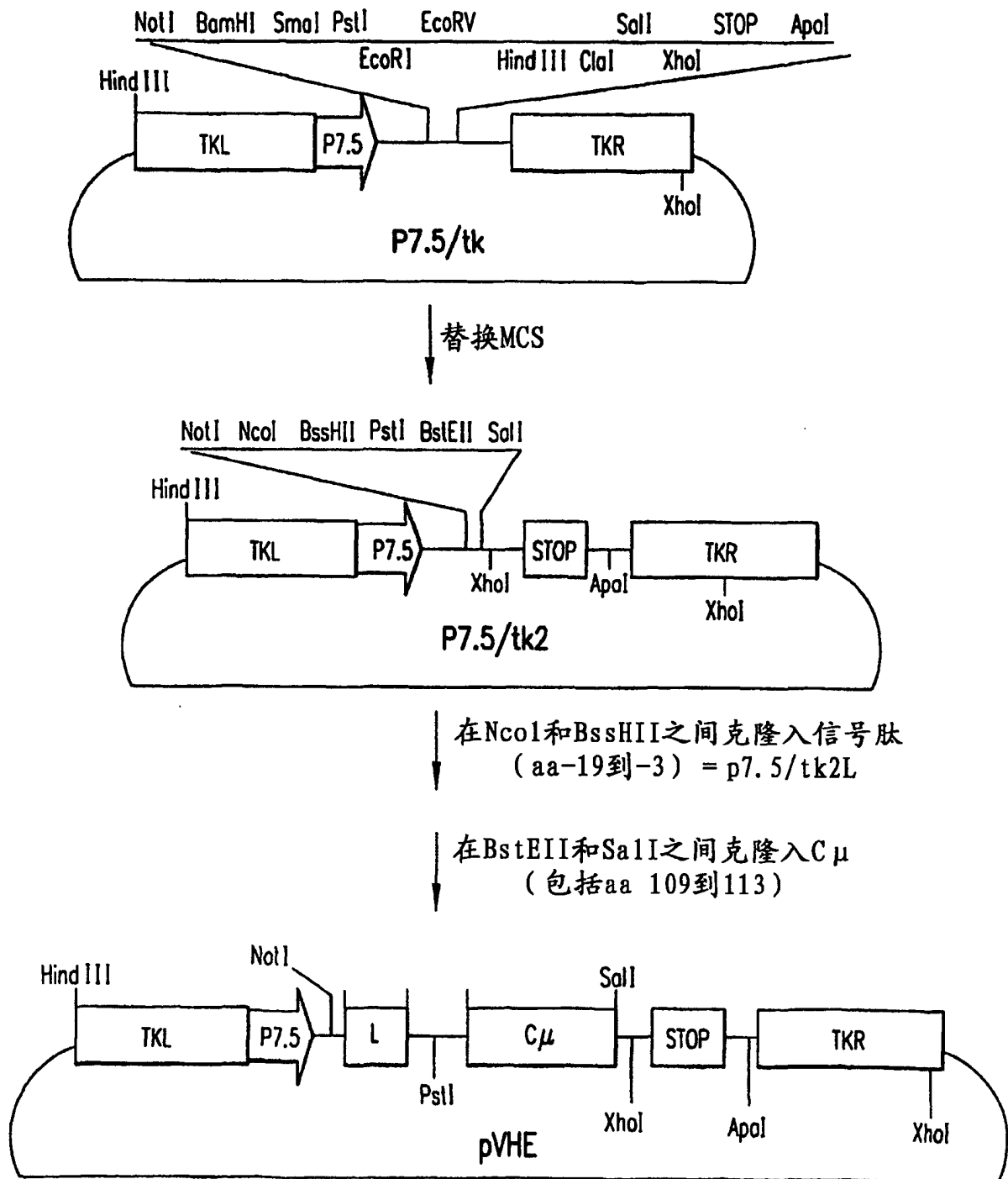


图4

构建pVKE和pVLE

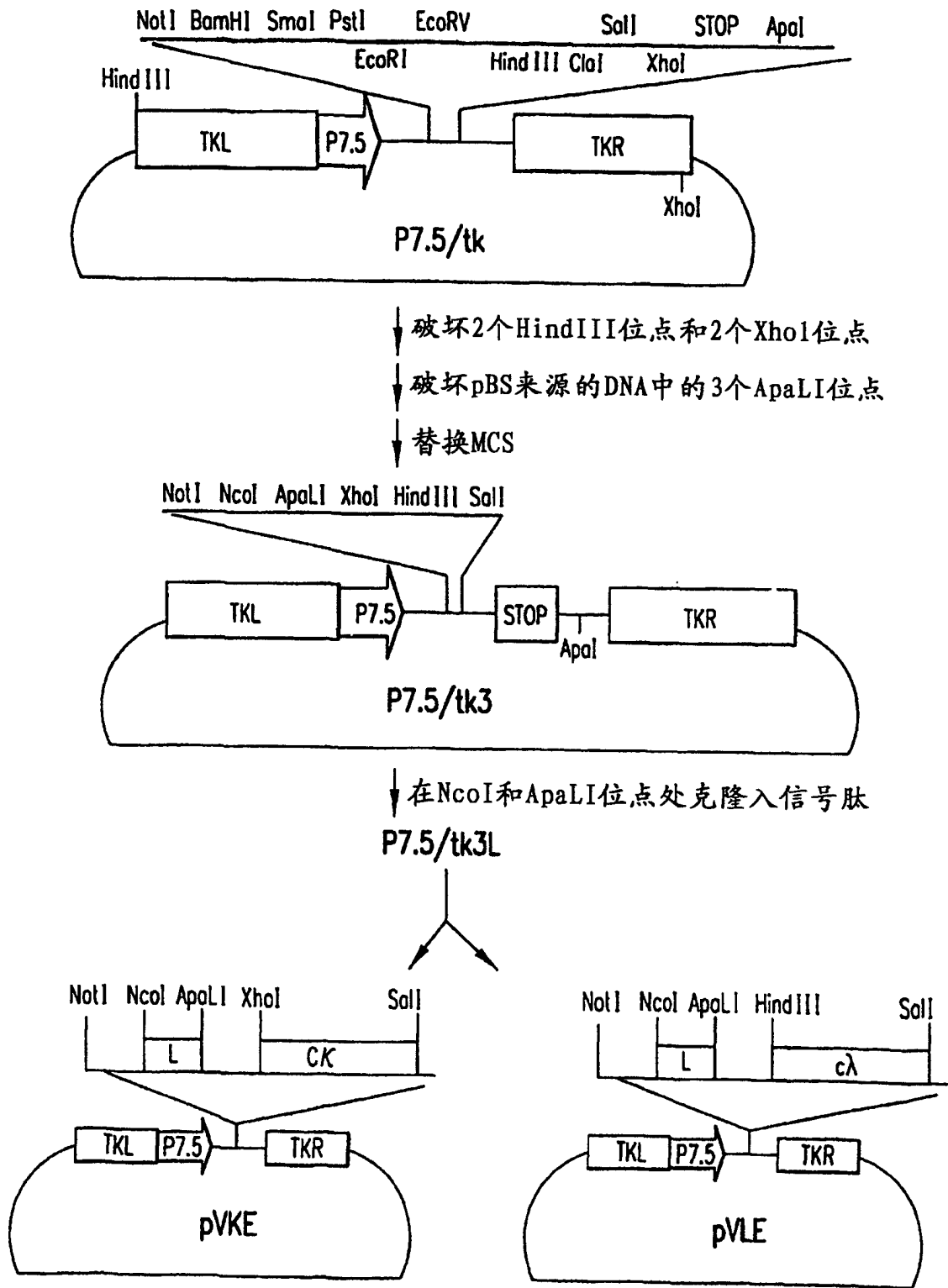


图5

通过抗原依赖性贴壁
选择特异性抗体

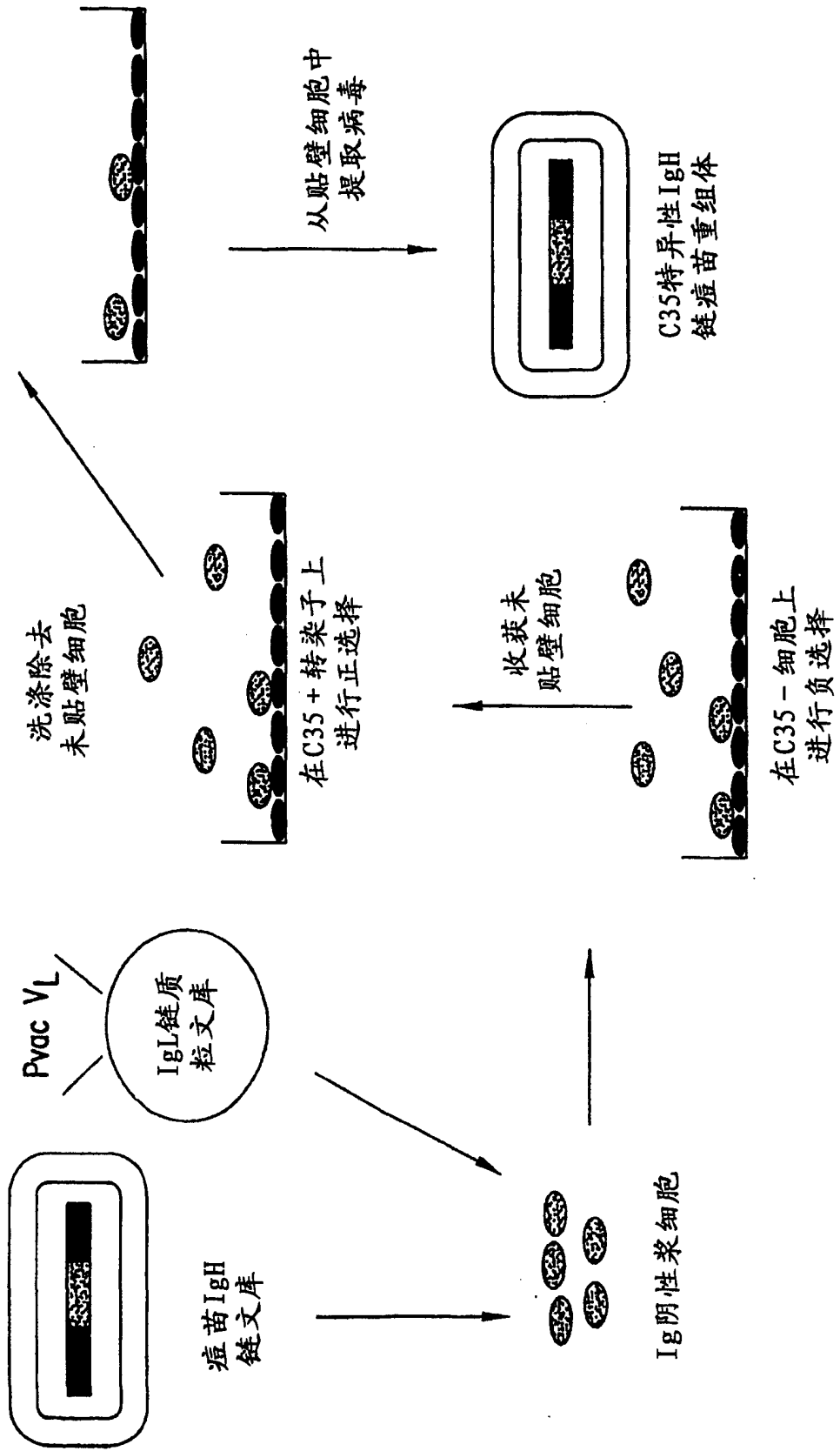


图6

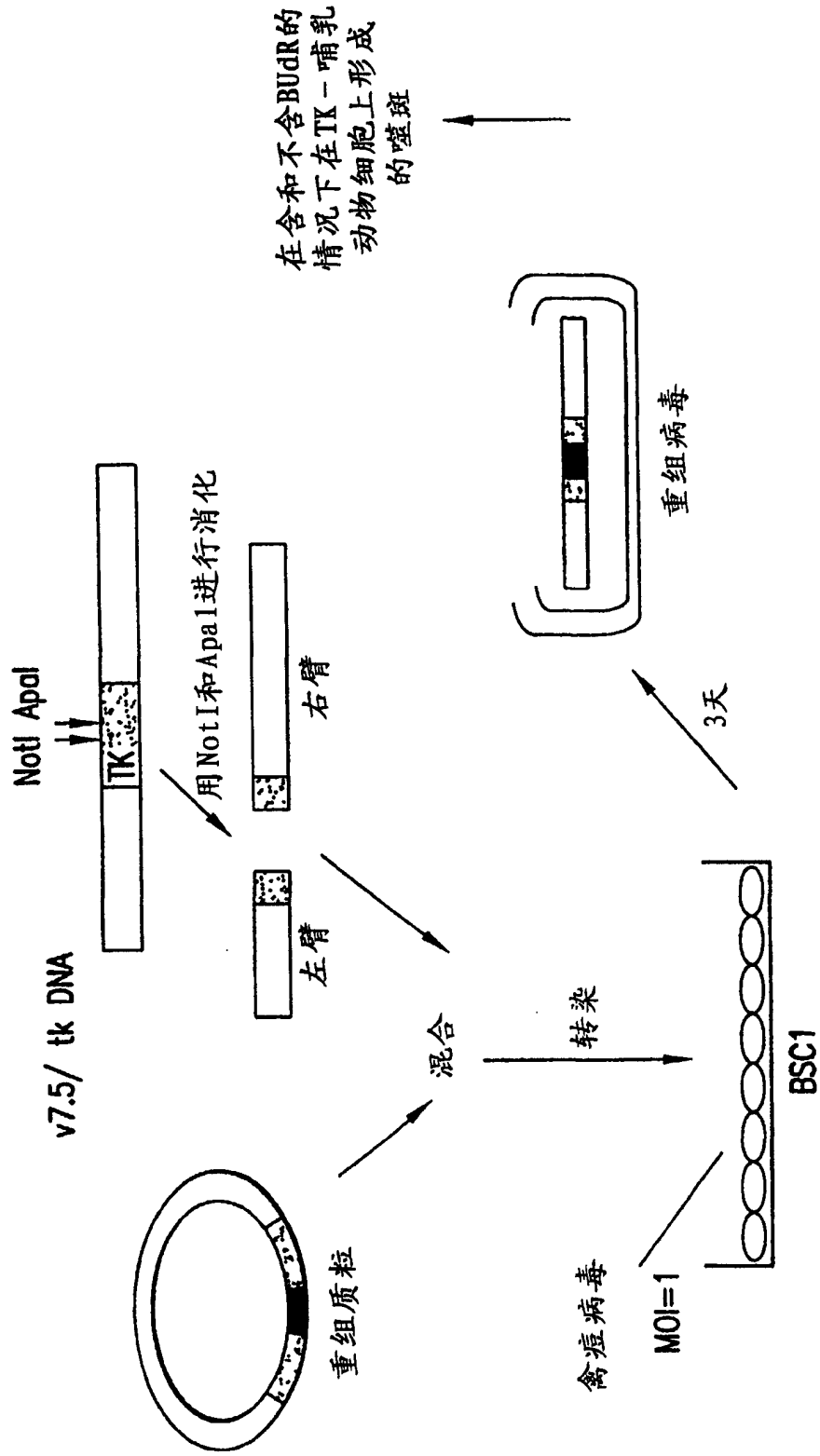


图7

p7.5tk

7.5 k 启动子

Not I Apa I

GGCCAAAATTGAAAAC TAGATCTATTTATTGCAAGCGGCCGCGCATG GGC CCG GCC GCC AAC GGC GGA
 Met Gly Pro Ala Ala Asn Gly Gly

tk编码序列



pE/Ltk

合成E/L启动子

Not I Apa I

GGCCAAAATTGAAAATTTTATTTTTTTTTTTGGAAATATAAAGCGGCCGCGCATG GGC CCG GCC GCC AAC GGC GGA
 Met Gly Pro Ala Ala Asn Gly Gly

tk编码序列



图 8

构建pVLE

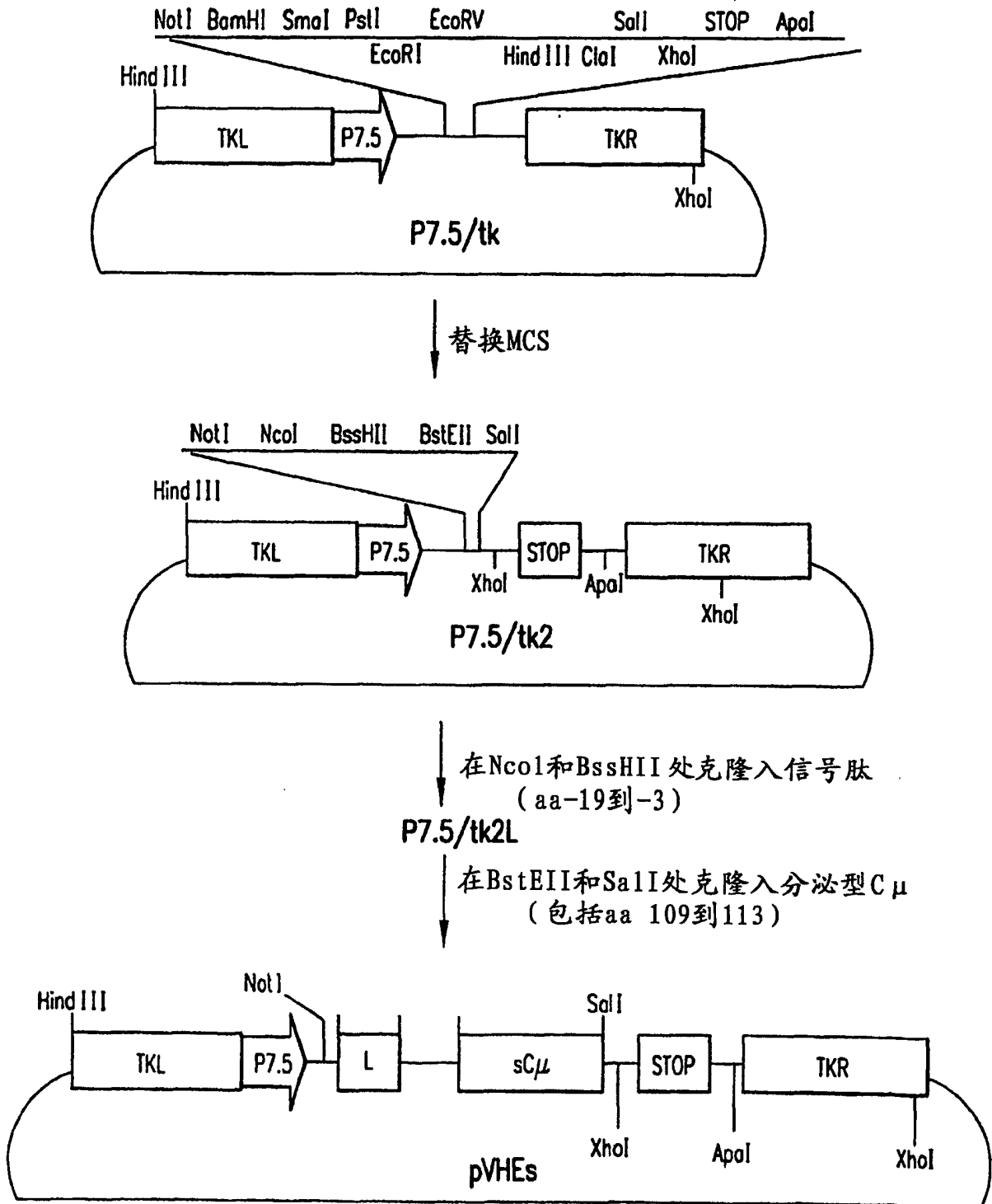


图9

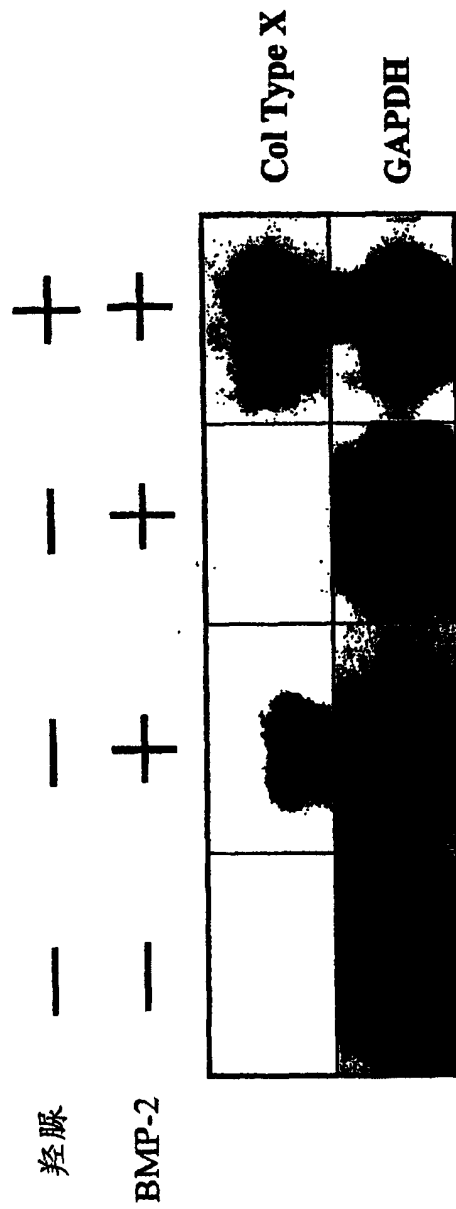


图10

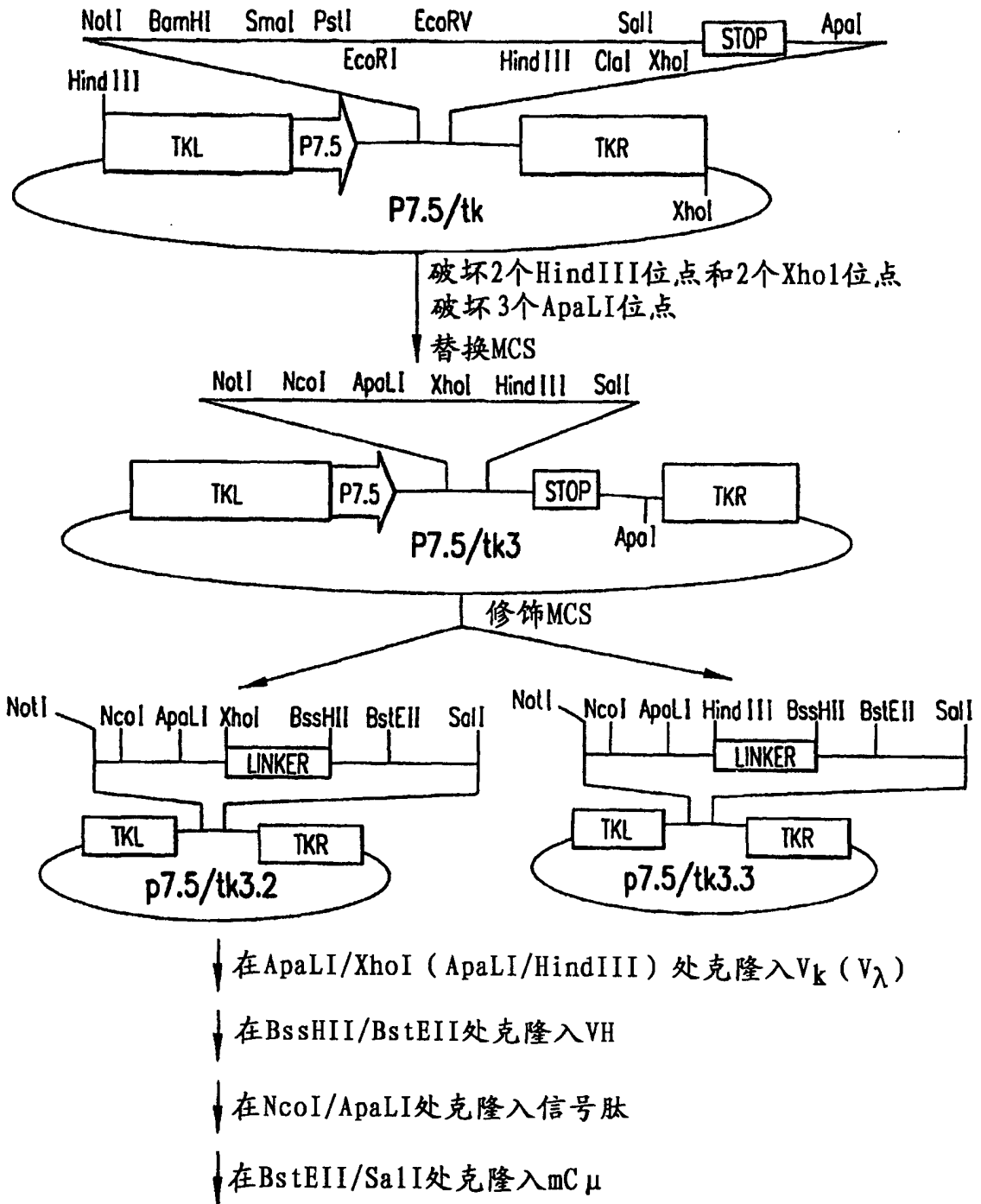
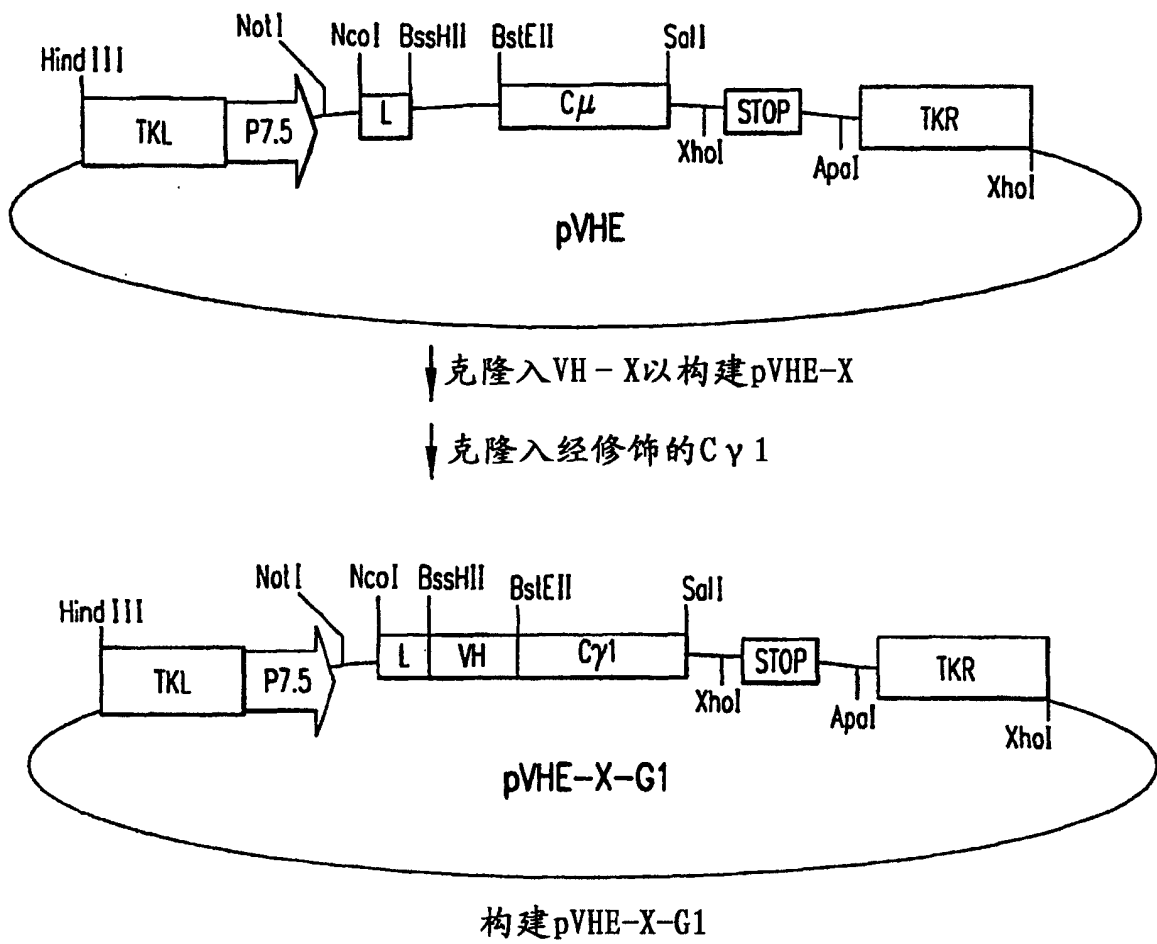


图 11



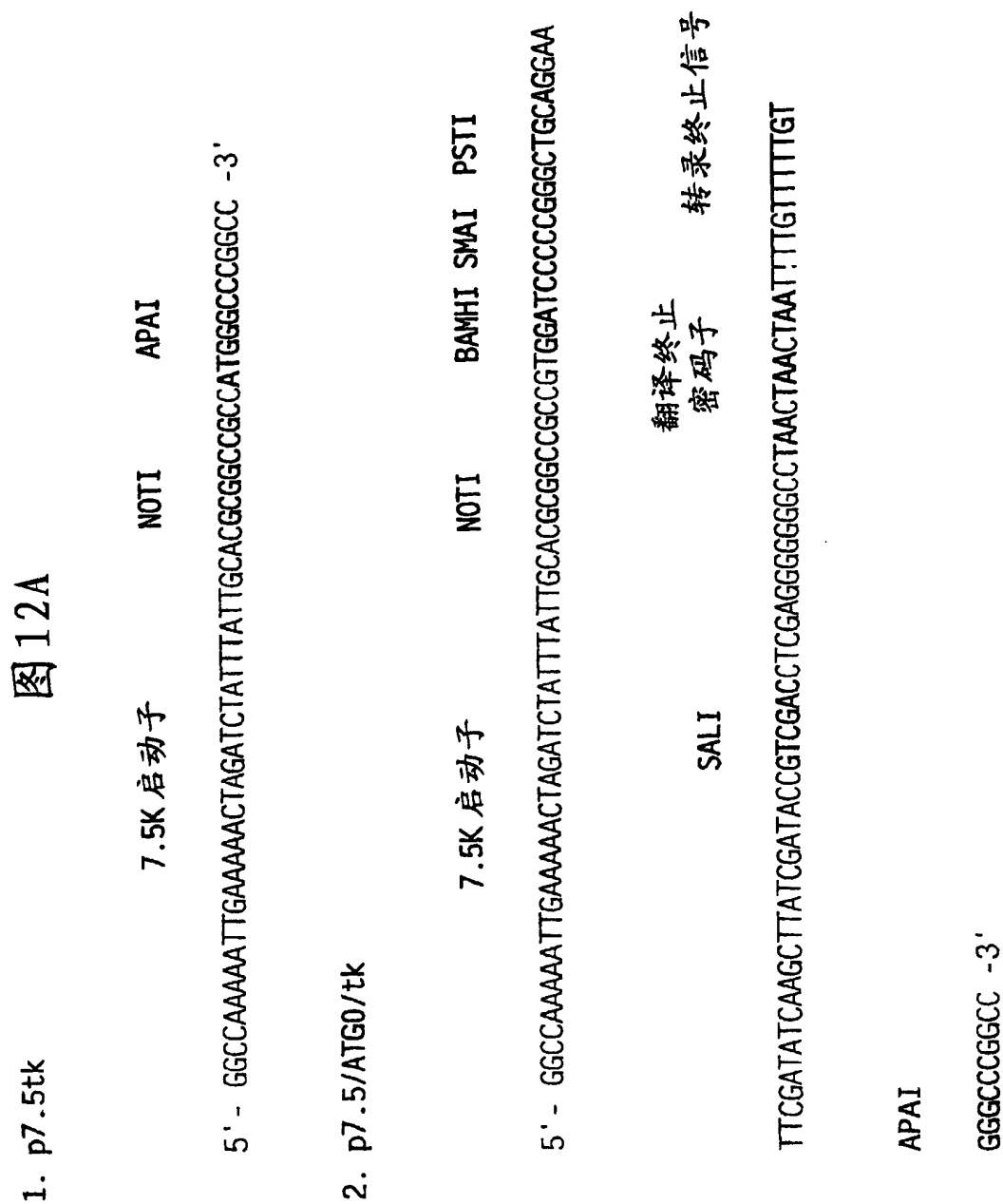


图12C

4. p7.5/ATG2/tk

7.5K 启动子
NOTI 起始 密码子 BAMHI SMAI PSTI

5' - GGCCAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGGCGGCCCATGAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAA

SALI 翻译终止 密码子 转录终止信号

TTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGCCTAACCTAATTTGTTTTTGT

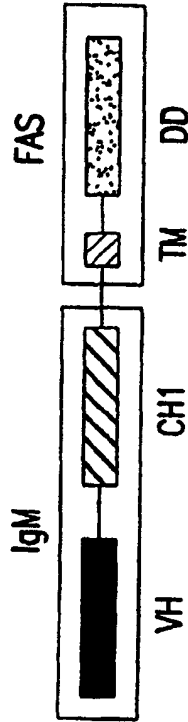
APAI
GGGCCCGGCC --3'

图13

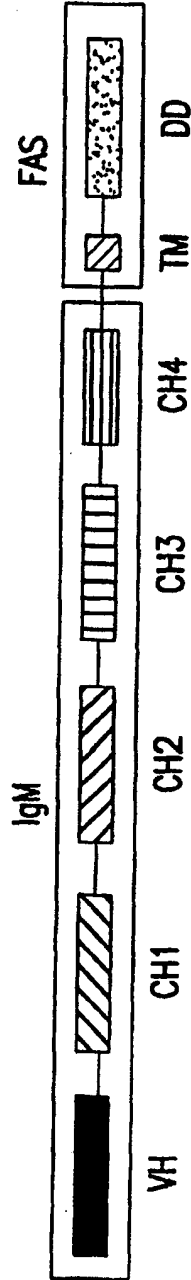
构建体:

构建 IgM - Fas 融合产物

(a) VH-CH1-TM-DD



(b) VH-CH1-CH2-CH3-CH4-TM-DD



(c) VH-CH1-CH2-CH3-CH4(TM)-DD

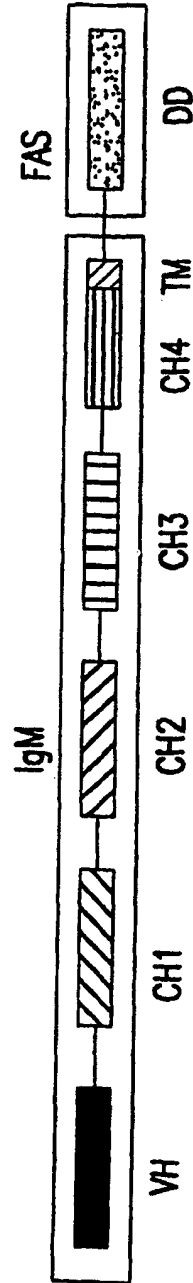
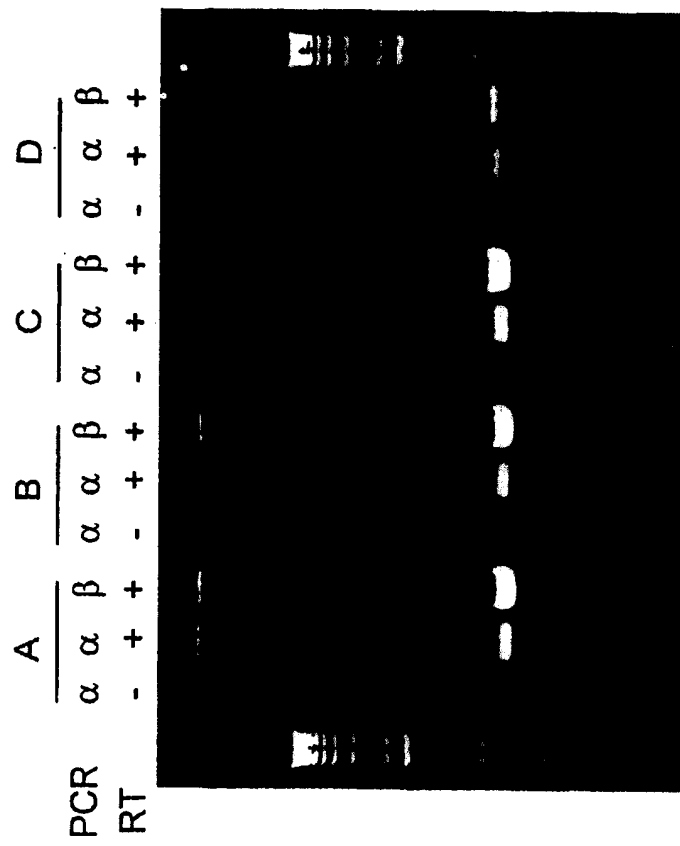


图14



被转染的COS7和HeLaS3细胞系中Ig α 和Ig β 的表达