



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 26 786 T2 2007.11.08**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 311 670 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 26 786.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR01/02666**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 965 350.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/016606**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.08.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **28.02.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.05.2003**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **21.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.11.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/10 (2006.01)**  
**C12N 15/11 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:  
**0010962 25.08.2000 FR**

(73) Patentinhaber:  
**Biomethodes, Evry, FR**

(74) Vertreter:  
**BEETZ & PARTNER Patentanwälte, 80538  
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:  
**DELCOURT, Marc, F-94800 Villejuif, FR; BLESA,  
Stephane, F-77680 Roissy-en-Brie, FR**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ORTSPEZIFISCHEN MASSENMUTAGENESE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Molekularbiologie und vor allem das Gebiet der Mutagenese. Sie hat ein Verfahren zur gezielten bzw. gerichteten Mutagenese mit hoher Ausbeute zum Gegenstand, das heißt die Bildung zahlreicher gezielter Mutanten in einer verkürzten Zeit und mit einer verringerten Zahl von Schritten. Dieses Verfahren wird hier als "massive Mutagenese" bezeichnet.

**[0002]** Die Mutagenese ist eine Technik, die darauf abzielt, die Nucleotidsequenz eines DNA-Fragments künstlich zu verändern mit dem Ziel, die biologische Aktivität, die das Fragment hat, zu modifizieren. Die Mutagenese hat im letzten Jahrzehnt einen bedeutenden Platz in zahlreichen molekularbiologischen Arbeiten eingenommen.

**[0003]** Der Ausdruck Mutagenese kann mit drei verschiedenen Veränderungen eines DNA-Fragments in Verbindung gebracht werden:

- der Deletion, die darin besteht, Nucleotide aus dem interessierenden DNA-Fragment zu entfernen,
- der Insertion, die darin besteht, Nucleotide hinzuzufügen, und
- der Substitution, die darin besteht,

eine oder mehrere Basen durch die gleiche Zahl von Basen von anderer Beschaffenheit zu ersetzen.

**[0004]** Die Techniken der Mutagenese können in zwei große Gruppen unterteilt werden: einerseits die zufällige Mutagenese und andererseits die gezielte Mutagenese (auch als gerichtete Mutagenese bezeichnet).

**[0005]** Die zufällige Mutagenese zielt darauf ab, Substitutionen von zufälliger Art und an zufälliger Position in ein DNA-Fragment einzuführen.

**[0006]** Historisch wurde die zufällige Mutagenese mit Hilfe chemischer Verfahren durchgeführt, die die Struktur der DNA verändern. Seit einiger Zeit hat die Vervielfältigung bzw. Amplifikation eines Moleküls unter Verwendung einer Polymerase unter speziellen Bedingungen häufig die chemischen Verfahren ersetzt. Diese speziellen Bedingungen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie die Fähigkeit des Enzyms, die DNA zuverlässig zu replizieren, beeinträchtigen. Die Polymerase führt im Verlauf der Zyklen Mutationen ein, d. h. Veränderungen, bezogen auf die ursprüngliche Sequenz. Am Ende der Reaktion wird eine große Zahl von Kopien des ursprünglichen Moleküls erhalten, wobei jedes dieser Moleküle andere Mutationen aufweist. Diese Moleküle liegen in Form einer Bank vor, d. h. eines Gemischs von Molekülen unterschiedlicher Beschaffenheit (die sich hinsichtlich der Art und der Position ihrer Mutationen unterscheiden).

**[0007]** Die gezielte Mutation zielt darauf ab, eine oder einige Mutationen (Substitutionen, aber auch Deletionen oder Insertionen) von bekannter Art und mit bekannter Position in ein DNA-Fragment einzuführen. Ein Oligonucleotid wird verwendet, um diese Mutation einzuführen. Dieses Oligonucleotid besteht herkömmlicherweise aus etwa zwanzig Basen. Die Sequenz dieses Oligonucleotids ist an jedem Punkt homolog zu der Zielsequenz auf dem DNA-Fragment mit Ausnahme einer oder einiger Positionen, die in seinem mittleren Teil liegen.

**[0008]** Dieses Oligonucleotid wird anschließend verwendet, um eine Replikationsreaktion (oder Amplifikationsreaktion, d. h. mehrfache Replikationen) zu starten, indem das DNA-Fragment als Matrix verwendet wird. Die neu synthetisierte Sequenz enthält die gewünschte Veränderung.

**[0009]** Die ersten Techniken der gezielten Mutagenese basierten auf der Amplifikation des einzigen interessierenden DNA-Fragments (in Form eines linearen DNA-Fragments), das anschließend in ein Plasmid eingeführt werden musste. Diese Techniken waren langwierig und mussten an jedes Untersuchungssystem angepasst werden.

**[0010]** Erst kürzlich wurde das die Mutation(en) einführende Oligonucleotid verwendet, um direkt das Plasmid, das das interessierende DNA-Fragment enthält, zu replizieren. Die Zahl der durchzuführenden Handgriffe wird so minimiert.

**[0011]** Die praktische Durchführung der gezielten Mutagenese ist jedoch weit davon entfernt, einfach zu sein. Es stellt sich vor allem das Problem der Trennung der Moleküle, in die die Mutation eingeführt wurde, von den Molekülen, in die sie nicht eingeführt wurde. Die alleinige Replikation eines ringförmigen DNA-Fragments (entsprechend dem herkömmlichen Fall eines Gens, das in ein Plasmid kloniert ist) mit einem die Mutation(en) einführenden Oligonucleotid ermöglicht es nicht, in Abwesenheit eines Selektionssystems, ein nachweisbares

Ausmaß der Mutagenese zu beobachten. Da die in vitro synthetisierte DNA von der in Bakterien synthetisierten DNA durch das Kriterium ihres Gehalts an methylierten Basen unterschieden werden kann, wurde ein Screening-System, das auf diesem Kriterium basiert, entwickelt und verallgemeinert. Es handelt sich um die Verwendung des Enzyms DpnI, das spezifisch ist für Stellen, die auf methylierter DNA, nicht jedoch auf nicht methylierter DNA vorhanden sind (Lacks et al., 1980 *Methods in Enzymology*, 65: 138). Die Moleküle, die keiner in vitro-Replikation unterzogen wurden, werden so eliminiert. Selbst bei Verwendung dieses Systems zum Screening von Mutanten bleibt die Effizienz der Mutagenesereaktion gering und bei nur etwa 5% mutierten Molekülen.

**[0012]** Dieser geringe Gehalt an Mutanten wird insbesondere durch die Tatsache verursacht, dass am Ende der gezielten Mutagenesereaktion die ringförmigen Moleküle in Bakterien eingeführt werden, die ein System zur DNA-Reparatur enthalten, das einen großen Teil der Mutationen beseitigt, wenn diese nur von einem der Stränge der DNA getragen werden.

**[0013]** Es sind zahlreiche Systeme vorgeschlagen worden, um zu versuchen, die Effizienz dieser Mutagenese-Techniken zu verbessern. Diese Techniken erfordern in den meisten Fällen ein zweites Oligonucleotid, das es ermöglicht, die Häufigkeit der mutierten Moleküle vor dem Screening zu verbessern (Patent EP 96942905; Patent WO 9935281). Andere Systeme verwenden ebenfalls ein zweites Oligonucleotid, das ein spezielles und manchmal effizienteres Screening-System ermöglicht (Patent EP 0938552; Katalog Clontech 2000, Seite 45). Schließlich verwenden andere Systeme besondere Bakterienstämme, wobei diese Systeme darauf abzielen, den Ausbeuteverlust durch die reparierende Aktivität der Bakterien zu minimieren (US-Patent 4,873,192; Patent EP 0 938552).

**[0014]** Schließlich ermöglicht die Mehrzahl der existierenden Techniken die gleichzeitige Integration mehrerer Oligonucleotide in eine DNA-Sequenz. Nach allgemeiner Regel konnten bis zu drei Oligonucleotide gleichzeitig an verschiedenen Stellen des zu mutierenden Fragments eingeführt werden (Patent WO 9935281; Patent EP 0938552). Ein Artikel erwähnt sogar den Erhalt von Molekülen, in die gleichzeitig bis zu sieben Oligonucleotide in einem einzigen Schritt eingefügt wurden (Perlak et al., 1990, *Nucleic Acid Research*, 18: 7457).

**[0015]** Der Begriff der "Bank" ist im Stand der Technik nicht dafür vorgesehen, die Produkte zu charakterisieren, die am Ende einer gezielten Mutagenesereaktion erhalten werden. Vielmehr wird in der großen Mehrzahl der Fälle am Ende der Reaktion ein einziges Produkt erhalten, das eine einzige Mutation enthält. In dem US-Patent 5,798,208 wird ein Mutageneseverfahren beschrieben, bei dem eine vorab ausgewählte Aminosäure in alle möglichen Positionen einer ausgewählten Region eines Proteins eingeführt wird, um eine Bank von Mutanten dieses Proteins zu erzeugen, wobei das Ziel darin bestand, die Bedeutung einer speziellen Aminosäure für die Struktur oder die Funktion eines gegebenen Proteins zu ermitteln. In dem Fall, in dem mehrere Mutationen gleichzeitig mit Hilfe mehrerer Oligonucleotide eingeführt werden (Patent WO 9935281; Perlak et al., 1990 *Nucleic Acid Research*, 18: 7457) sind die einzigen angestrebten Produkte die Produkte, in die die Gesamtheit der Mutationen eingebracht worden ist, und die Technik soll mit dem Ziel optimiert werden, die Häufigkeit dieser Produkte zu maximieren. Die Produkte, in die nur ein kleiner Teil der Mutationen eingeführt wird, werden zurückgedrängt, und sie werden in diesen Mengenanteilen als Nebenprodukte betrachtet.

**[0016]** Das Ziel der Mutagenese kann in der Erhöhung oder der Senkung einer Aktivität bestehen.

**[0017]** Die Erhöhung einer Aktivität, oder häufiger seine einfache Verbesserung, ist auf den Gebieten der Enzymologie oder der Ligand/Rezeptor-Kombination besonders interessant. So kann die Verfügbarkeit eines Enzyms mit einer verbesserten Aktivität die Kosten industrieller Verfahren, die diese Enzyme verwenden, senken. Ebenso kann die Affinität der Bindung zwischen einem Liganden und seinem Rezeptor mit Hilfe einiger Mutationen, die im Bereich der Erkennungsstelle zwischen Ligand und Rezeptor lokalisiert sind, verbessert werden.

**[0018]** Die Suche nach diesen Verbesserungen der Aktivität wird häufig unter dem Oberbegriff der "molekularen Evolution" zusammengefasst. Es handelt sich darum, in in vitro-Reaktionen die Evolution zu simulieren, indem Mutationen in ein DNA-Fragment eingeführt werden und diejenigen Mutanten selektiert werden, die verbesserte Aktivitäten haben. Mehrere Mutagenese/Selektions-Zyklen imitieren so die Evolution eines Moleküls in Gegenwart eines Selektionsdrucks.

**[0019]** Der in diesem Zusammenhang am häufigsten verwendete Mutagenesetyp ist die zufällige Mutagenese. Da es im Allgemeinen kein Element ermöglicht, a priori die Art und die Position von Veränderungen zu definieren, die imstande sind, eine Verbesserung der untersuchten Aktivität herbeizuführen, ist es in diesem Zusammenhang erforderlich, eine große Zahl von Molekülen zu erzeugen, die allesamt Mutationen in unter-

schiedlichen Positionen und von unterschiedlicher Art aufweisen, um die Chancen zu maximieren, dass sich unter diesen Molekülen ein Molekül befindet, das einer verbesserten Aktivität entspricht.

**[0020]** Die Einbuße an biologischer Aktivität, die mit einem DNA-Fragment verbunden ist, das einer Mutagenese unterzogen wurde, liefert besondere Informationen über die Aminosäuren, die seine Aktivität unterstützen. Wenn die Änderung einer Aminosäure zu einer Abnahme der biologischen Aktivität führt, ist es wahrscheinlich, dass diese Aminosäure am Aufbau der aktiven Stelle beteiligt ist, die diese biologische Aktivität trägt. Diese Ergebnisse müssen jedoch sehr sorgfältig ausgewertet werden: Es ist beispielsweise möglich, dass diese Aminosäure nicht unmittelbar an der biologischen Aktivität in der aktiven Stelle beteiligt ist, sondern dass sie an den damit zusammenhängenden Aktivitäten beteiligt ist, wie beispielsweise der intrazellulären Adressierung des Proteins. Andererseits ist es möglich, dass die eingeführte Veränderung das gesamte Protein destabilisiert, was bedeutet, dass in diesem Fall die Wirkung der eingeführten Substitution indirekt und nicht direkt ist. Aus diesen beiden Gründen ist es wichtig, auf einem Gen, das ein Protein codiert, die Einheiten erkennen zu können, die die Aktivitäten der Adressierung, der Lokalisierung auf der Membran, der Anbindung von Cofaktoren unterstützen. Andererseits ist es von wesentlicher Bedeutung, dass die eingeführten Veränderungen das Protein so wenig wie möglich destabilisieren. In den meisten Fällen sind es kleine hydrophobe Aminosäuren, Alanin oder Valin, die zur Substitution der ursprünglich vorhandenen Aminosäuren eingeführt werden. Diese kleinen Aminosäuren sind dafür bekannt, dass sie den Großteil der Sekundärstrukturen der Proteine ( $\alpha$ -Helix- oder  $\beta$ -Faltblattstruktur) bewahren und somit die gesamten Destabilisierungen der Proteine minimieren.

**[0021]** Die auf diesem Gebiet durchgeführten Arbeiten umfassen die Erzeugung einer großen Zahl von Punktmutanten, von denen jede eine andere Substitution einer Aminosäure des Proteins durch ein Alanin trägt. Diese Arbeiten machen eine sehr große Zahl von Arbeiten erforderlich, da jede Mutante unabhängig von den anderen erzeugt werden muss.

**[0022]** Es gibt Ausnahmen zu den oben dargestellten allgemeinen Fällen. Die gezielte Mutagenese wurde im Zusammenhang mit der Suche nach einem Aktivitätsgewinn verwendet. In dem Fall, in dem die Region der aktiven Stelle wohlbekannt ist, kann man tatsächlich darauf hoffen, dass es durch die gezielte Veränderung der Aminosäuren, die diese Stelle bilden, möglich ist, für eine Verbesserung der Aktivität zu sorgen. So wird in dem europäischen Patent Nr. 527 809 vorgeschlagen, nacheinander die Aminosäuren einer aktiven Region durch eine Aminosäure zu ersetzen, die häufig in aktiven Stellen vorkommt (zum Beispiel Serin), wofür eine Technik verwendet wird, die der dirigierten Mutagenese ähnelt. Diese Technik setzt jedoch voraus, dass man über genaue Informationen zu der aktiven Stelle des untersuchten Moleküls verfügt, und sie verwendet eine Technologie, die es nicht ermöglicht, eine große Zahl von Veränderungen in ein DNA-Fragment einzuführen.

**[0023]** Umgekehrt wurden zufällige Mutagenese-Experimente im Zusammenhang mit dem Ziel eines Aktivitätsverlusts durchgeführt (Loeb et al., 1989 Nature 340: 397). In diesem Fall müssen sehr viele Klone analysiert werden, um miteinander im Einklang stehende Ergebnisse zu erhalten und sich von den Beschränkungen zu befreien, die der zufällige Austausch mit sich bringt.

**[0024]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Technik, die zwischen der gezielten Mutagenese und der zufälligen Mutagenese liegt. Es ist nicht ihr Ziel, wie im Fall der einfachen gezielten Mutagenese, am Ende der Reaktion ein einziges Produkt zu erhalten, das eine oder mehrere gewünschte Mutationen enthält, sondern es ist das Ziel, ein Gemisch von Molekülen zu erhalten, von denen jedes eine oder mehrere gewünschte Mutationen aufweist. Der Zweck des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht auch nicht darin, im Bereich einer bestimmten Position eine beliebige Substitution einzuführen, wie dies bei der zufälligen Mutagenese der Fall ist, sondern ganz im Gegenteil hier einen speziellen und zuvor festgelegten Substitutionstyp einzuführen.

**[0025]** Dieses Verfahren kombiniert somit die Vorteile der gezielten Mutationen (Steuerung der Art bzw. Beschaffenheit der in einer bestimmten Position erhaltenen Veränderungen) und der zufälligen Mutagenese (Erhalt einer großen Zahl verschiedener Mutationen, die auf zahlreiche Positionen des zu mutierenden DNA-Fragments verteilt sind).

**[0026]** Diese Ziele werden erfindungsgemäß mit einem Verfahren zur Mutagenese eines Zielgens erreicht, das darin besteht, eine Reihe von N Oligonucleotiden mit im Wesentlichen komplementärer Sequenz zu mindestens einem Bereich des Zielgens herzustellen, anschließend die Reihe der Oligonucleotide mit dem Zielgen unter Bedingungen reagieren zu lassen, die die Erzeugung von Kopien des Zielgens ermöglichen, die mindestens eine Mutation aufweisen. Das Zielgen wird von einem doppelsträngigen ringförmigen Plasmid getragen. Jedes Oligonucleotid weist eine Sequenz, die komplementär zu einem anderen Bereich des Zielgens ist, und

mindestens eine Mutation auf, die im Zentrum der Sequenz des Oligonucleotids angeordnet ist. Die Gesamtheit N der Oligonucleotide der Reihe, mit N größer als 5, deckt die gesamte Sequenz oder einen Teil der Sequenz des Zielgens ab. Anschließend wird die Reihe der Oligonucleotide in Gegenwart einer Polymerase mit dem Zielgen umgesetzt, um eine Bank mutierter Gene zu erzeugen, worin jede Mutation, die von einem der verschiedenen Oligonucleotide stammt, im Mittel in weniger als 1/5 der Gene der Bank vorhanden ist.

**[0027]** Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch von großer Bedeutung, dass die Beschränkung, die mit der Position der Mutation zusammenhängt, und die Beschränkung, die mit seiner Art und Beschaffenheit zusammenhängt, voneinander getrennt sind; es ist beispielsweise möglich, Mutationen eines bestimmten Typs (beispielsweise ein beliebiges Codon gegen Alanin) auf einer gesamten codierenden Sequenz zu erzeugen. In diesem Beispiel enthält jede der am Ende der Reaktion erhaltene Mutante eine oder mehrere Mutationen bekannter Art (Alanin-Codon), jedoch mit nicht bekannter Position. Umgekehrt ermöglicht es das erfindungsgemäße Verfahren, an einigen besonderen Positionen Oligonucleotide einzufügen, die entartete Basen enthalten. In diesem Beispiel sind die Positionen relativ bekannt (die Zahl der Positionen ist begrenzt), und die Art der eingeführten Mutationen ist unbekannt.

**[0028]** Diese Eigenschaften kontrastieren gegenüber den Techniken der zufälligen Mutagenese, bei der weder die Art noch die Position der Mutationen bekannt ist, und gegenüber der herkömmlichen gezielten Mutagenese, bei der die Art und die Position der eingeführten Mutation bekannt sind.

**[0029]** Das erfindungsgemäße Verfahren ist außerdem dadurch bemerkenswert, dass am Ende der Mutagenesereaktion eine große Zahl verschiedener DNA-Moleküle zur Verfügung steht, die eine Bank bilden. Diese Moleküle entsprechen allen DNA-Molekülen, in die im Bereich der zuvor anvisierten Stellen mindestens eine Mutation eingefügt worden ist. Die Zahl der verschiedenen mutierten Moleküle ist sehr groß, weil alle Kombinationen von Mutationen möglich sind.

**[0030]** Das erfindungsgemäße Verfahren zur Mutagenese kann auch auf eine Bank mutierter Gene angewendet werden. Diese Bank wird dann anstelle des Zielgens als Matrix verwendet. Es wird eine Reihe von N Oligonucleotiden hergestellt mit einer Sequenz, die im Wesentlichen komplementär zu mindestens einem Bereich der mutierten Zielgene ist, anschließend lässt man die Reihe der Oligonucleotide unter Bedingungen mit den mutierten Zielgenen reagieren, die die Erzeugung von Kopien der mutierten Zielgene ermöglichen, die mindestens eine Mutation aufweisen. Die mutierten Zielgene werden von doppelsträngigen ringförmigen Plasmiden getragen, und jedes Oligonucleotid weist eine Sequenz, die komplementär zu einem anderen Bereich der mutierten Zielgene ist, und mindestens eine Mutation auf, die im Zentrum der Sequenz des Oligonucleotids angeordnet ist, wobei die Gesamtheit N der Oligonucleotide der Reihe, mit N größer als 5, die gesamte Sequenz oder einen Teil der Sequenz der mutierten Zielgene abdeckt. Anschließend wird die Reihe der Oligonucleotide in Gegenwart einer Polymerase mit den mutierten Zielgenen umgesetzt, um eine Bank mutierter Gene zu erzeugen, worin jede Mutation, die von einem der verschiedenen Oligonucleotide stammt, im Mittel in weniger als 1/5 der Gene der Bank vorhanden ist.

**[0031]** Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass die als Matrix verwendete Bank mutierter Zielgene zuvor durch das Verfahren der massiven Mutagenese erhalten wurde. Die mittlere Zahl der Mutationen pro Molekül nimmt mit der Zahl der durchgeführten Zyklen der massiven Mutagenese zu.

**[0032]** Nach einer vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt N im Bereich von etwa 5 bis  $10^6$  und vorzugsweise 50 bis 500, und jede Mutation, die von einem der verschiedenen Oligonucleotide stammt, ist im Mittel in 1/5 bis  $1/10^6$  und vorzugsweise 1/50 bis 1/500 der Gene der Bank vorhanden.

**[0033]** Das erfindungsgemäße Verfahren zieht vor allem den Fall in Betracht, in dem die Reihe der Oligonucleotide N verschiedene Oligonucleotide umfasst und in dem jede Mutation, die von einem der verschiedenen Oligonucleotide stammt, im Mittel in etwa  $1/N$  der Gene der Bank enthalten ist, wobei N den oben angegebenen Wert hat.

**[0034]** Dieses Merkmal unterscheidet das erfindungsgemäße Verfahren vom Stand der Technik, in dem die Beispiele der mehrfachen Mutagenese unter gleichzeitiger Verwendung mehrerer Oligonucleotide im Gegensatz dazu auf einem Anteil des Einbaus jedes Oligonucleotids von mehr als 75% basieren. Diese Vorgehensweisen haben nämlich zum Ziel, ausschließlich die Mutante zu isolieren, in die alle Oligonucleotide eingeführt worden sind, und der hohe Grad des Einbaus ermöglicht es problemlos, dieses Ziel zu erreichen. Im Gegensatz dazu ist im erfindungsgemäßen Verfahren die Häufigkeit der Mutation im Bereich jeder einzuführenden

Mutation so gesteuert, dass keine DNA-Moleküle erhalten werden, die eine zu große Anzahl an Mutationen enthalten. Das Ziel besteht darin, Mutanten zur Verfügung zu haben, von denen jede eine Mutation oder eine Kombination von einigen verschiedenen Mutationen enthält. Um dies zu erreichen, muss das Verhältnis zwischen der Menge jedes die Mutation(en) einführenden Oligonucleotids und der Menge der zu mutierenden Matrix kontrolliert werden. Dieses Verhältnis liegt fallabhängig im Bereich von 0,01 bis 100 und vorzugsweise 0,1 bis 10.

**[0035]** Die Umsetzung der Reihe von Oligonucleotiden mit dem Zielgen oder der Bank mutierter Zielgene kann mit verschiedenen Polymerase-Typen durchgeführt werden, die vorteilhaft hitzestabil sind. Eine erste Ausführungsform besteht darin, eine Polymerase zu verwenden, die eine Strangverschiebungsaktivität, wie die Taq-Polymerase, oder eine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität, wie die Pfu-Polymerase, hat. In dieser Ausführungsform kann die Umsetzung das Vorhandensein einer Ligase einschließen. Eine zweite Ausführungsform besteht darin, eine Polymerase zu verwenden, die keine Strangverschiebungsaktivität oder 3'→5'-Exonuclease-Aktivität hat, wie die T4-Polymerase, und in diesem Fall wird die Umsetzung in Abwesenheit von Ligase durchgeführt.

**[0036]** Die Oligonucleotide der Reihe haben eine Größe, die im Bereich von 10 bis 100 und vorzugsweise 15 bis 25 Nucleotiden liegt. Jedes der Oligonucleotide ist homolog zu einem Teil der zu mutierenden DNA-Sequenz mit der Ausnahme einer oder mehrerer Positionen, die in seinem inneren Bereich liegen, die die einzuführende(n) Mutation(en) bilden. Diese Oligonucleotide können überlappend sein, das heißt sie können Sequenzen aufweisen, die zwei benachbarten verschiedenen Regionen gemeinsam sind. Die Oligonucleotide weisen vorzugsweise alle die gleiche Orientierung auf, so dass nur ein einziger Strang des Zielgens repliziert wird, was es ermöglicht, einen geringen Mutagenesegrad zu erhalten.

**[0037]** Nach einer besonderen Ausführungsform werden die Oligonucleotide gemäß dem in dem US-Patent 5,858,731 beschriebenen Verfahren aus zwei Oligonucleotiden rekonstruiert.

**[0038]** Vorteilhaft weist jedes Oligonucleotid 1 oder mehrere Mutationen und vorzugsweise 1 bis 3 Mutationen auf, die im Zentrum seiner Sequenz angeordnet sind.

**[0039]** Die Mutationen jedes Oligonucleotids können unter den Deletionen und/oder den Insertionen eines oder mehrerer Nucleotide ausgewählt werden.

**[0040]** Eine besondere Form der Mutationen besteht darin, entartete Oligonucleotide zu verwenden. Das heißt, dass jedes Oligonucleotid der Reihe in mehreren Exemplaren vorhanden ist, wobei jedes Exemplar ein anderes Nucleotid im Bereich der Mutation(en) aufweist.

**[0041]** Eine weitere besondere Form der Mutation besteht darin, dass jede Mutation des Typs ist, der es ermöglicht, ein identisches Codon in jedes Oligonucleotid oder ein Codon, das der gleichen Aminosäure entspricht, einzuführen, unter Substitution des ursprünglichen Codons des Zielgens. Vorteilhaft entspricht das Codon einer Aminosäure, die unter Ala, Val, Gly, Leu, Ile ausgewählt wird.

**[0042]** Das erfindungsgemäße Verfahren kann genauer mit Hilfe der folgenden Schritte beschrieben werden:

- Man stellt die Matrix, vorzugsweise eines Plasmids, her, die das oder die zu mutierenden DNA-Fragmente enthält.
- Man synthetisiert die verschiedenen die Mutation(en) einführenden Oligonucleotide, vorzugsweise 5 bis  $10^6$  und noch bevorzugter 50 bis 500, anschließend vermischt man alle die Mutation(en) einführenden Oligonucleotide. Die Endkonzentration jedes Oligonucleotids in dem Gemisch wird so während dieses Schritts durch die Zahl der Oligonucleotide geteilt.
- Die Oligonucleotide werden zu der Matrix, d. h. dem Plasmid, gegeben, das das oder die zu mutierenden DNA-Fragmente enthält, in einer solchen Konzentration, dass das Verhältnis zwischen der Zahl der Matrixmoleküle und der Zahl der Moleküle jedes der die Mutation(en) einführenden Oligonucleotide im Bereich von 0,01 bis 100 und vorzugsweise 0,1 bis 10 liegt.
- Die Matrix wird durch Hitzeeinwirkung (etwa 95°C) denaturiert, um vorübergehend über einzelsträngige DNA zu verfügen. Bei der Rückkehr auf eine niedrigere Temperatur lagern sich einige oder alle Oligonucleotide, die in dem Gemisch enthalten sind, im Bereich ihrer Homologiestelle an die Matrix an.
- Alle Bestandteile, die für die Durchführung einer Replikation der Matrix mit den die Mutation(en) einführenden Oligonucleotiden erforderlich sind, werden zugegeben, insbesondere eine Polymerase, der Puffer, der ihre Aktivität ermöglicht, die Nucleotidtriphosphate in ausreichender Menge und die gegebenenfalls erforderlichen Cofaktoren. Die Replikationsreaktion findet anschließend unter den Temperaturbedingungen

statt, die der maximalen Aktivität der Polymerase entsprechen. Gegebenenfalls kann eine Polymerase im Replikationsschritt zu gegeben werden, damit sich die neu synthetisierten DNA-Stränge im Bereich des 5'-Endes eines anderen Oligonucleotids verknüpfen, das auf der Matrix beim 3'-Ende des ersteren verknüpft ist. In diesem Fall werden die Oligonucleotide vorab phosphoryliert.

– Die Schritte der Denaturierung und der Replikation werden gegebenenfalls mehrfach wiederholt. In diesem Fall ist es bevorzugt, dass die Polymerase hitzestabil ist, um die Notwendigkeit zu vermeiden, in jedem Zyklus das Enzym erneut zuzugeben. Am Ende dieser Reaktion sind die in dem Gemisch vorhandenen DNA-Moleküle Moleküle mehrerer Typen:

– einerseits ist ursprüngliche doppelsträngige Matrix enthalten, die nicht wirksam repliziert worden ist,

– andererseits ist ein Teil der Moleküle repliziert worden, d. h. sie enthalten einen ursprünglichen Strang und einen Strang, der aus einem oder mehreren Anfangsstücken neu synthetisiert wurde, welche die die Mutation(en) einführenden Oligonucleotide darstellen.

– Das erhaltene Gemisch wird einem Verdau mit dem Enzym DpnI oder einem anderen Restriktionsenzym unterzogen, das es ermöglicht, die auf den beiden Strängen methylierten DNA-Moleküle zu unterdrücken und diejenigen zu behalten, die nicht methyliert oder halbmethyliert sind.

– Kompetente Bakterien werden mit dem obigen Gemisch transformiert, wobei diese Bakterien anschließend auf einem Medium ausgestrichen werden, das ein selektives Mittel enthält, um die Bakterien zu selektieren, in die ein Plasmid eingebaut worden ist. Die DNA-Moleküle, die in dem vorherigen Schritt gespalten worden sind, werden entfernt, denn das Vorhandensein eines vollständigen ringförmigen Plasmids ist unabdingbar für das Überleben der Bakterie im selektiven Medium.

– Die erhaltenen bakteriellen Kulturen werden einzeln entnommen, und sie werden verwendet, um ein selektives Nährmedium zu beimpfen. Anschließend wird eine plasmidische DNA-Zubereitung dieser Kulturen erzeugt, um eine große Zahl potentiell mutierter plasmidischer DNA zu isolieren. Eine Untersuchung der verschiedenen plasmidischen DNA-Moleküle in diesem Stadium ermöglicht es, den mittleren Grad des Einbaus jedes Oligonucleotids zu berechnen und zu ermitteln, ob sich dieser in der Nähe des gewünschten Wertes befindet.

– Gegebenenfalls wird die biologische Aktivität geprüft, die die verschiedenen Chargen mutierter plasmidischer Zubereitungen aufweisen. Die gemessene Aktivität kann größer als, gleich groß wie oder kleiner als die Aktivität des nicht mutierten Fragments sein. In dem Fall, in dem die Aktivität verändert ist, wird das entsprechende Plasmid sequenziert, um die Position der eingeführten Mutation lokalisieren zu können. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die biologische Aktivität geprüft, die den mutierten Molekülen entspricht, und man vergleicht diese Messung mit der Messung der biologischen Aktivität, die dem nicht mutierten plasmidischen DNA-Molekül entspricht. Wenn die Auswertung dieser Messungen einen signifikanten Unterschied zeigt, werden die mutierten Moleküle sequenziert, um die Position der Mutation, die für diese Veränderung der Aktivität ursächlich ist, nachzuweisen. Die Reihenfolge dieser letzten beiden Schritte ist umgekehrt, verglichen mit den herkömmlichen Techniken der gezielten Mutagenese, die im Allgemeinen den Erhalt und die Untersuchung des mutierten Moleküls vor der Prüfung seiner biologischen Aktivität umfasst.

**[0043]** Demnach umfasst eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Mutagenese die folgenden Schritte:

a) Herstellen einer Matrix, die aus einem Plasmid besteht, das das Zielgen oder die Bank mutierter Zielgene und ein Resistenzgen enthält,

b) Herstellen einer äquimolekularen Reihe von Oligonucleotiden, die eine komplementäre Sequenz voneinander verschiedener Bereiche des Zielgens oder der Bank mutierter Zielgene und mindestens eine Mutation aufweisen, die im Zentrum der Sequenz des Oligonucleotids angeordnet ist, wobei die Gesamtheit der Oligonucleotide der Reihe die gesamte Sequenz oder einen Teil der Sequenz des Zielgens oder der Bank mutierter Zielgene abdeckt,

c) Vermischen der Reihe der Oligonucleotide, die in Schritt (b) hergestellt wurde, mit dem Plasmid aus Schritt (a) in einem molaren Verhältnis jedes Oligonucleotids, bezogen auf das Plasmid, das im Bereich von 0,01 bis 100 und vorzugsweise 0,1 bis 10 liegt,

d) Denaturieren des Gemischs aus Schritt (c) durch die Temperatur, um eine einzelsträngige Matrix zu erhalten,

e) Einwirken lassen einer Temperatur auf das Gemisch aus Schritt (d), die die Hybridisierung der Oligonucleotide auf die Matrix ermöglicht,

f) Zugabe mindestens einer Polymerase, ihres Puffers und ihrer Cofaktoren, und einer ausreichenden Menge jedes der Nucleotidtriphosphate zum Gemisch, um die Replikation der Stränge der Matrix ausgehend von beliebigen Oligonucleotiden zu ermöglichen,

g) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte (d), (e) und (f),

h) Selektieren mit jedem geeigneten Mittel der Produkte aus Schritt (f) oder (g), die der Replikation unter-

zogen wurden,

i) Transformieren der in Schritt (h) selektierten Produkte in kompetente Bakterien, und Selektieren der Produkte, die ein Plasmid tragen, auf einem selektiven Medium, das mit einem Resistenzgen korrespondiert, das von dem Plasmid aus Schritt (a) getragen wird.

**[0044]** Der obige Schritt (h) besteht vorteilhaft darin, die Produkte aus Schritt (f) der Einwirkung eines Restriktionsenzym, wie des Enzyms DpnI, zu unterziehen, das die Produkte selektiert, die der Replikation unterzogen wurden.

**[0045]** Die Oligonucleotide können an ihrem 5'-Ende phosphoryliert sein, wenn man im Schritt (f) eine Ligase, vorzugsweise eine hitzestabile Ligase, zugibt.

**[0046]** Das erfindungsgemäße Verfahren zur Mutagenese ist besonders nützlich für die Messung der biologischen Aktivität mutierter Proteine, die von den mutierten Zielgenen codiert werden. Demzufolge ist das Zielgen ein Nucleinsäuremolekül ist, das ein interessierendes Protein mit oder ohne seine eigenen Regulationssequenzen codiert. Wenn das Zielgen die Regulationssequenzen, wie einen Promotor, nicht enthält, sind diese im Bereich des Plasmids vorhanden.

**[0047]** Die Erfindung betrifft demnach auch ein Verfahren zur Mutagenese eines Zielproteins oder einer Bank mutierter Zielproteine, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es die Erzeugung einer Expressionsbank mutierter Gene aus einem Zielgen, das dieses Protein codiert, nach dem zuvor beschriebenen Verfahren zur Mutagenese, anschließend die Expression der mutierten Gene, um eine Bank mutierter Proteine zu erzeugen, und gegebenenfalls das Screening der mutierten Proteine hinsichtlich einer gewünschten Funktion, vorteilhaft bezogen auf ein Zielprotein, umfasst.

**[0048]** Die Erfindung ermöglicht demnach die Durchführung eines Verfahrens zur Selektion mutierter Proteine, die eine modifizierte Aktivität aufweisen, bezogen auf das gleiche nicht mutierte Protein, oder des mutierten Gens, das dem mutierten Protein entspricht, das ein obiges Verfahren zur Mutagenese, anschließend nach dem Screening der mutierten Proteine hinsichtlich einer gewünschten Funktion, vorteilhaft bezogen auf das Zielprotein, die Selektion des mutierten Protein, das die gewünschte Funktion aufweist, und gegebenenfalls die Sequenzierung des mutierten Gens, das dem mutierten Protein entspricht, umfasst.

**[0049]** Diese erfindungsgemäßen Verfahren zur Mutagenese eines Zielproteins oder einer Bank mutierter Zielproteine oder zur Selektion eines mutierten Proteins oder des entsprechenden Gens sind dadurch gekennzeichnet, dass sie die Erzeugung einer Expressionsbank mutierter Gene ausgehend von einem Zielgen, das dieses Protein codiert, und dann die folgenden Schritte umfassen:

j) Inkubieren des selektiven Mediums bei der adäquaten Temperatur über den Zeitraum, der für das Wachstum individueller bakterieller Kolonien ausreichend ist,

k) Beimpfen von individuellen Bakterienkulturen mit den Kolonien aus Schritt (j)

l) Erzeugen von Zubereitungen plasmidischer DNA aus den Kulturen aus Schritt (k),

m) Messen der biologischen Aktivität, die jede Zubereitung plasmidischer DNA aus Schritt (l) aufweist, und Vergleichen des erhaltenen Ergebnisses, bezogen auf das Ergebnis, das bei Verwendung der nicht mutierten plasmidischen DNA erhalten wird,

n) gegebenenfalls Sequenzieren der Zubereitungen plasmidischer DNA, bei denen die Beobachtung signifikanter Änderungen der biologischen Aktivität möglich war.

**[0050]** Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Reihe mutierte Oligonucleotide, bezogen auf ein Zielgen oder die Bank mutierter Zielgene, wie weiter oben definiert.

**[0051]** Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Bank mutierter Gene, die durch ein Verfahren erhalten werden kann, das zuvor beschrieben wurde, das dadurch gekennzeichnet ist, dass jede der verschiedenen Mutationen im Mittel in weniger als 1/5 der Gene der Bank und vorzugsweise im Mittel in etwa 1/N der Gene der Bank, mit N größer als 5, vorzugsweise mit N im Bereich von etwa 5 bis  $10^6$  und besonders bevorzugt mit N im Bereich von 50 bis 500, vorhanden ist.

**[0052]** Andere Vorteile und Merkmale der Erfindung ergeben sich aus den Beispielen, die folgen, und den Zeichnungen im Anhang, in denen:

**[0053]** **Fig. 1** eine Verteilung der die Mutation(en) einführenden Oligonucleotide auf der Sequenz des CD4-Moleküls darstellt. Jedes der Moleküle enthält maximal drei Mutationen, die hier durch die Knicke in der

Linie des Pfeils dargestellt werden, die in seinem Zentrum lokalisiert sind und dafür vorgesehen sind, das anvisierte Codon in Alanin zu ändern. Die Oligonucleotide überlappen einander und sind hier aus Gründen der Klarheit in drei verschiedenen Höhen darstellt. Im Beispiel der [Fig. 1](#) sind nur 24 die Mutation(en) einführende Oligonucleotide dargestellt. Im hier folgenden Beispiel 1 sind 95 Oligonucleotide gleichzeitig verwendet worden. In diesem Beispiel haben die Oligonucleotide, die die Mutationen tragen, alle die gleiche Orientierung.

**[0054]** [Fig. 2](#) eine schematische Zusammenfassung der Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Mutagenese ausgehend von den die Mutation(en) einführenden Oligonucleotiden der [Fig. 1](#) ist. Die Mutationen in den DNA-Molekülen werden durch einen senkrechten Balken wiedergegeben. Die Buchstaben bedeuten:

- (a) Polymerisation (Polymerase, dNTP, Puffer und Cofaktoren);
- (b) Verdau mit DpnI, um die anfänglichen Matrizes zu entfernen,
- (c) Transformation kompetenter Bakterien, anschließend Ausstreichen auf dem selektiven Medium;
- (d) Beimpfen von Bakterienkulturen mit isolierten Kolonien, anschließend Präparation der plasmidischen DNA.
- Test des Phänotyps, anschließend Selektion und Sequenzierung der Mutanten, die den gesuchten Phänotyp haben.

**[0055]** [Fig. 3](#) ein Beispiel für die Konstruktion von die Mutation(en) einführenden Oligonucleotiden aus Halb-Oligonucleotiden zeigt, die eine Verknüpfung mit T4-Ligase umfasst.

**[0056]** [Fig. 4](#) Beispiele für die schematische Darstellung von Oligonucleotiden gibt, die entartete Basen im Bereich der Mutationspunkte enthalten. Der Buchstabe N bedeutet, dass eine beliebige der 4 Basen an diesem Ort vorhanden sein kann. Das betreffende Oligonucleotid besteht somit in der Realität aus einem Gemisch von 4<sup>N</sup> Molekülsorten.

#### Beispiel 1: Alanin-Scanning

**[0057]** Ein Gen, das das CD4-Molekül codiert, wurde in den Vektor SK+ eingeführt. Die ersten 95 Codons dieses Gens waren das Ziel einer Reaktion zur massiven Mutagenese gemäß der erfindungsgemäßen Technik.

**[0058]** Um dies durchzuführen, wurde eine Reihe von 95 Oligonucleotiden aus 21 Basen synthetisiert. Jedes dieser Oligonucleotide war komplementär zu einer Sequenz des CD4-Gens, zentriert auf einem Codon. So war das erste Oligonucleotid homolog zu einer Sequenz die auf dem Codon 1 zentriert ist. Es war perfekt homolog zu 9 Basen auf beiden Seiten des Codons und enthielt 3 Mutationen, die dafür vorgesehen waren, das erste Codon in ein Alanin-Codon zu transformieren ([Fig. 1](#)).

**[0059]** Gleichermaßen war das zweite Oligonucleotid auf dem zweiten Codon zentriert und enthielt drei benachbarte Mutationen in seiner Mitte.

**[0060]** Die 95 Oligonucleotide, einander überlappend und alle mit der gleichen Orientierung, wurden anschließend in äquimolarer Weise vermischt und unter Verwendung der T4-Kinase unter Standardanwendungsbedingungen phosphoryliert.

**[0061]** Anschließend wurde die folgende Reaktion durchgeführt:

Matrix SK-CD4 (250 µg/µl)	1 µl
MIX der 95 Oligonucleotide 5'P (0,5 µM jedes)	2 µl
dNTP Triphosphate (2,5 mM)	10 µl
Puffer 10X für Pfu-Polymerase	2,5 µl
ATP 10 mM	0,5 µl
Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl
Pfu-Ligase (4 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	7 µl
Insgesamt	25 µl

**[0062]** Das Gemisch wurde einer Reaktion aus 12 Temperaturzyklen [(94°C, 1'); (35°C, 1'); (68°C, 20')] unterzogen.

**[0063]** Das Reaktionsgemisch wurde anschließend einem Verdau durch 5 Einheiten des Enzyms DpnI unter

angepassten Pufferbedingungen über 30' bei 37°C unterzogen.

**[0064]** Kompetente Bakterien wurden mit diesem Gemisch unter Verwendung eines Temperaturschockprotokolls transformiert und auf einer Petrischale, die das selektive Mittel enthielt, ausgestrichen.

**[0065]** Am nächsten Tag wurde eine sehr große Menge von Bakterien erhalten.

**[0066]** Ein Schema, das die Etappen der Technik zusammenfasst, wird in [Fig. 2](#) vorgeschlagen.

**[0067]** In diesem Stadium wurde eine statistische Prüfung einiger DNA-Moleküle der Bank durchgeführt, um das Ausmaß des Einbaus von Mutationen zu messen, d. h. den Ersatz eines der 95 Codons durch ein Alanin-Codon. Diese Untersuchung ergab, dass die Häufigkeit des Einbaus jedes Oligonucleotids etwa 1% betrug, was in diesem Fall dem gewünschten Wert entsprach ( $1/N$  mit  $N = 95$ ).

**[0068]** Die mutierten Moleküle wurden anschließend durch bakterielle Kultivierung und Zubereitung der plasmidischen DNA amplifiziert. Jede der Chargen plasmidischer DNA, die einem einzigen Typ eines mutierten Moleküls entsprach, wurde für die Transfektion eukaryotischer Zellen verwendet, und diese wurden auf den Erhalt oder den Verlust von Epitopen untersucht, die von dem CD4-Molekül getragen wurden, wobei diese Aktivität durch die Bindung eines anti-CD4-Antikörpers gemessen wurde.

Beispiel 2: Valin-Scanning unter Verwendung der Rekonstruktion der Oligonucleotide, die aus Halb-Oligonucleotiden rekonstruiert wurden.

**[0069]** Eine Reihe von 11 Oligonucleotiden wurde aus je zwei doppelsträngigen Halb-Oligonucleotiden rekonstruiert. Die Ligation der beiden Halb-Oligonucleotide erfolgte durch eine Umsetzung unter Verwendung der T4-Ligase. Da nur eines der beiden Halb-Oligonucleotide im Bereich eines seiner 5'-Enden phosphoryliert war, hatte diese Umsetzung zur Folge, den Erhalt eines einzigen kompletten Oligonucleotids zu ermöglichen, das aus 18 Basen zusammengesetzt war (8 auf jeder Seite, perfekt homolog, und zwei in seiner Mitte, die invariabel aus den Nucleotiden GT bestanden ([Fig. 3](#))).

**[0070]** Diese Mutationen, die dafür vorgesehen sind, die beiden ersten Nucleotide eines beliebigen Codons zu ersetzen, ermöglichen den Austausch dieses Codons durch ein Valin-Codon. Da der genetische Code entartet ist, können die Valin-Codons in der Form GTN geschrieben werden, worin N eine beliebige der vier Basen darstellt.

**[0071]** Sobald diese 11 rekonstruierten Oligonucleotide erhalten wurden, die homolog zu 11 verschiedenen Bereichen des CD4-Moleküls sind, die jedoch die gleiche Mutation tragen (Wechsel zu Valin) und die im Übrigen in der gleichen Richtung orientiert sind, war das Protokoll identisch mit dem Protokoll, das in Beispiel 1 dargestellt wird.

**[0072]** In diesem Beispiel wurde eine mittlere Häufigkeit des Einbaus der die Mutation(en) einführenden Oligonucleotide von etwa 9% (1/11) angestrebt.

Beispiel 3 Verbesserung einer aktiven Stelle durch massive Mutagenese mit Sättigung

**[0073]** Sobald die Aminosäuren bekannt sind, die unmittelbar an der aktiven Stelle eines Proteins beteiligt sind, beispielsweise durch die Daten einer massiven Mutagenese, wie sie in den vorhergehenden Beispielen dargestellt wird, können diese Aminosäuren einer massiven Mutagenese mit Sättigung unterzogen werden, d. h. einer Mutagenese, bei der das Einführen einer großen Zahl verschiedener Codons unter Ersatz eines bestimmten Codons angestrebt wird. Es wurden 6 Codons des Gens, das das Protein agaB codiert, ein Enzym, das an der Synthese von Zuckern beteiligt ist, als Codons identifiziert, die unmittelbar an der Enzymaktivität beteiligt sind.

**[0074]** Sechs Oligonucleotide, die auf diesen Codons zentriert sind, wurden synthetisiert. Auf jeder Seite waren sie vollständig homolog mit 9 Basen der Sequenz. Im Bereich der ersten beiden Nucleotide der zu mutierenden Codons war die Wildtypsequenz durch die Sequenz NN ersetzt ([Fig. 4](#)). Auf diese Weise konnte jedes der 6 Codons durch andere Codons, die für andere Aminosäuren spezifisch sind, ersetzt werden.

**[0075]** Sobald diese Oligonucleotide vorhanden waren, war die Reaktion der massiven Mutagenese identisch mit der Reaktion, die in Beispiel 1 beschrieben wird.

[0076] In diesem Beispiel wurde eine mittlere Häufigkeit des Einbaus der die Mutation(en) einführenden Oligonucleotide von etwa 17% (1/6) angestrebt.

[0077] Diese plasmidischen DNA-Moleküle waren dafür vorgesehen, einem Screening unterzogen zu werden, bei dem eine Zunahme der Enzymaktivität gemessen wird.

[0078] Dieses Beispiel, obwohl nur eine begrenzte Zahl von Mutation(en) einführenden Oligonucleotiden verwendet wurde, die entartete Basen enthalten, zeigt die Durchführbarkeit der Anpassung der erfindungsgemäßen Technik an die Mutagenese mit zufälliger Art bzw. Beschaffenheit (Austausch eines Codons durch eine große Zahl anderer Codons) aber mit festgelegten Positionen.

#### Beispiel 4: Optimierung der Codons eines Gens

[0079] Gene enthalten im Allgemeinen Codons, die ungünstig für die Expression von Proteinen sind, die sie codieren. Diese ungünstigen Codons können als ein Mechanismus zur Regulierung der Expression eines Gens betrachtet werden. Diese ungünstigen Codons sind relativ gut identifiziert, und es kann erforderlich sein, sie durch ein für die Expression des Proteins vorteilhafteres Codon zu ersetzen, das jedoch keine Änderung der Aminosäure hervorruft.

[0080] Nach allgemeiner Regel sind etwa 5% der Codons eines Gens ungünstig und begrenzen das Niveau der Expression des entsprechenden Proteins. Die Änderung dieser Codons kann es ermöglichen, bessere Expressionsniveaus des Gens bei der in vitro-Erzeugung des entsprechenden Proteins zu erhalten.

[0081] Die gleichzeitige Änderung aller Codons ermöglicht es jedoch nicht, diese Verbesserung des Expressionsniveaus zu erhalten, wahrscheinlich wegen der allgemeinen Destabilisierung der Sequenz durch eine zu große Zahl von Veränderungen.

[0082] Die besten Expressionsniveaus werden meistens dann erhalten, wenn nur ein Teil der ungünstigen Codons modifiziert wird.

[0083] In diesem Fall kann eine Bank von Mutationen, die diese ungünstigen Codons betrifft, unter Anwendung der erfindungsgemäßen Technik erzeugt werden, und die mutierten Moleküle, die die besten Expressionsniveaus zeigen, werden dann selektiert. Um dies zu erreichen, muss für jedes ungünstige Codon ein die Mutation(en) einführendes Oligonucleotid synthetisiert werden, wobei die Mutationen, die diese Oligonucleotide tragen, dadurch definiert sind, dass durch sie ein für die Expression ungünstiges Codon gegen ein für die Expression günstiges Codon ausgetauscht wird, ohne dadurch die Primärsequenz des entsprechenden Proteins zu ändern.

[0084] In diesem Zusammenhang kann die mittlere Häufigkeit des Einbaus der die Mutation(en) einführenden Oligonucleotide in einer relativ großen Spanne erwünscht sein, beispielsweise im Bereich von 1 bis 20%. Tatsächlich ist die Zahl der gleichzeitigen Mutationen, die es ermöglicht, das beste Expressionsniveau zu erhalten, nicht bekannt. In diesem Zusammenhang können mehrere Banken, die verschiedenen Einbauhäufigkeiten entsprechen, erzeugt werden. Für die Herstellung dieser Banken, die einen unterschiedlichen Mutationsgrad aufweisen, ist es möglich, entweder das beschriebene Verfahren unter Verwendung variabler Konzentrationen der Oligonucleotide oder mehrfach hintereinander das Verfahren zur massiven Mutagenese durchzuführen, d. h. die Bank der Mutanten zu verwenden, die im Laufe eines ersten Schritts der massiven Mutagenese als Matrix für einen zweiten Schritt der massiven Mutagenese hergestellt wird.

[0085] Das Verfahren ähnelt dem in Beispiel 1 dargestellten Verfahren. Die mutierten Moleküle werden anschließend einem Screening unterzogen, dessen Kriterium ihr Expressionsniveau ist: Die Moleküle, die die besten Expressionsniveaus aufweisen, werden selektiert.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Mutagenese eines Zielgens, das darin besteht, eine Reihe von N Oligonucleotiden herzustellen, wobei jedes Oligonucleotid eine Sequenz, die komplementär zu einem anderen Bereich des Zielgens ist, und ein bis drei Mutationen aufweist, die im Zentrum der Sequenz des Oligonucleotids angeordnet sind, anschließend die Reihe der Oligonucleotide mit dem Zielgen unter Bedingungen reagieren zu lassen, die die Erzeugung von Kopien des Zielgens ermöglichen, die mindestens eine Mutation aufweisen, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Zielgen von einem doppelsträngigen ringförmigen Plasmid getragen wird, wobei die Ge-

samtheit N der Oligonucleotide der Reihe, mit N größer als 5, die gesamte Sequenz oder einen Teil der Sequenz des Zielgens abdeckt, und dass die Reihe der Oligonucleotide in Gegenwart einer Polymerase mit dem Zielgen umgesetzt wird, um nach Selektion mit einem Restriktionsenzym, das es ermöglicht, die DNA-Moleküle auszuschließen, die auf den beiden Strängen methyliert sind, und diejenigen zu behalten, die nicht methyliert oder halbmethyliert sind, eine Bank mutierter Gene zu erzeugen, worin jede Mutation, die von einem der verschiedenen Oligonucleotide stammt, im Mittel in weniger als 1/5 der Gene der Bank vorhanden ist.

2. Verfahren zur Mutagenese einer Bank mutierter Zielgene, das darin besteht, eine Reihe von N Oligonucleotiden herzustellen, wobei jedes Oligonucleotid eine Sequenz, die komplementär zu einem anderen Bereich der mutierten Zielgene ist, und ein bis drei Mutationen aufweist, die im Zentrum der Sequenz des Oligonucleotids angeordnet sind, anschließend die Reihe der Oligonucleotide unter Bedingungen mit den mutierten Zielgenen reagieren zu lassen, die die Erzeugung von Kopien der mutierten Zielgene ermöglichen, die mindestens eine Mutation aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass die mutierten Zielgene von doppelsträngigen ringförmigen Plasmiden getragen werden, wobei die Gesamtheit N der Oligonucleotide der Reihe, mit N größer als 5, die gesamte Sequenz oder einen Teil der Sequenz der mutierten Zielgene abdeckt, und dass die Reihe der Oligonucleotide in Gegenwart einer Polymerase mit den mutierten Zielgenen umgesetzt wird, um nach Selektion mit einem Restriktionsenzym, das es ermöglicht, die DNA-Moleküle auszuschließen, die auf den beiden Strängen methyliert sind, und diejenigen zu behalten, die nicht methyliert oder halbmethyliert sind, eine Bank mutierter Gene zu erzeugen, worin jede Mutation, die von einem der verschiedenen Oligonucleotide stammt, im Mittel in weniger als 1/5 der Gene der Bank vorhanden ist.

3. Verfahren zur Mutagenese nach Anspruch 2, wobei die Bank der mutierten Zielgene nach dem Verfahren von Anspruch 1 erhalten wurde.

4. Verfahren zur Mutagenese nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass N im Bereich von 5 bis  $10^6$  liegt und dass jede Mutation, die von einem der verschiedenen Oligonucleotide stammt, im Mittel in etwa 1/5 bis 1/10<sup>6</sup> vorhanden ist.

5. Verfahren zur Mutagenese nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Reihe der Oligonucleotide N verschiedene Oligonucleotide umfasst und dass jede Mutation, die von einem der verschiedenen Oligonucleotide stammt, im Mittel in etwa 1/N der Gene der Bank vorhanden ist.

6. Verfahren zur Mutagenese nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Reihe der Oligonucleotide mit dem Zielgen oder der Bank mutierter Zielgene in einem molaren Verhältnis jedes Oligonucleotides, bezogen auf das Zielgen oder die Bank mutierter Zielgene, umgesetzt wird, das im Bereich von 0,01 bis 100 liegt.

7. Verfahren zur Mutagenese nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reihe der Oligonucleotide mit dem Zielgen oder der Bank mutierter Zielgene in Gegenwart einer Polymerase umgesetzt wird, die eine Strangverschiebungsaktivität, wie die Taq-Polymerase, oder die eine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität, wie die Pfu-Polymerase, hat.

8. Verfahren zur Mutagenese nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Reihe der Oligonucleotide mit dem Zielgen oder der Bank mutierter Zielgene in Gegenwart einer Polymerase, die eine Strangverschiebungsaktivität oder eine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität hat, und einer Ligase umgesetzt wird.

9. Verfahren zur Mutagenese nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reihe der Oligonucleotide mit dem Zielgen oder der Bank mutierter Zielgene in Gegenwart einer Polymerase, die keine Strangverschiebungsaktivität oder 3'→5'-Exonuclease-Aktivität hat, wie die T4-Polymerase, und in Abwesenheit von Ligase umgesetzt wird.

10. Verfahren zur Mutagenese nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonucleotide der Reihe überlappend oder nicht überlappend sind und eine Größe aufweisen, die im Bereich von 10 bis 100 liegt.

11. Verfahren zur Mutagenese nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass jedes Oligonucleotid 1 Mutation bis 3 Mutationen aufweist, die im Zentrum seiner Sequenz angeordnet ist/sind.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Mutationen

jedes Oligonucleotids unter den Deletionen und/oder den Insertionen eines oder mehrerer Nucleotide ausgewählt werden.

13. Verfahren zur Mutagenese nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass jedes Oligonucleotid der Reihe in mehreren Exemplaren vorhanden ist, wobei jedes Exemplar ein anderes Nucleotid im Bereich der Mutation(en) aufweist.

14. Verfahren zur Mutagenese nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass jede Mutation des Typs ist, der es ermöglicht, ein identisches Codon in jedes Oligonucleotid oder ein Codon, das der gleichen Aminosäure entspricht, einzuführen, unter Substitution des ursprünglichen Codons des Zielgens.

15. Verfahren zur Mutagenese nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Codon einer Aminosäure entspricht, die unter Ala, Val, Gly, Leu, Ile ausgewählt wird.

16. Verfahren zur Mutagenese nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

- a) Herstellen einer Matrix, die aus einem Plasmid besteht, das das Zielgen oder die Bank mutierter Zielgene und ein Resistenzgen enthält,
- b) Herstellen einer äquimolekularen Reihe von Oligonucleotiden, die die komplementäre Sequenz voneinander verschiedener Bereiche des Zielgens oder der Bank mutierter Zielgene und mindestens eine Mutation aufweisen, die im Zentrum der Sequenz des Oligonucleotids angeordnet ist, wobei die Gesamtheit der Oligonucleotide der Reihe die gesamte Sequenz oder einen Teil der Sequenz des Zielgens oder der Bank der mutierten Zielgene abdeckt,
- c) Vermischen der Reihe der Oligonucleotide, die in Schritt (b) hergestellt wurde, mit dem Plasmid aus Schritt (a) in einem molaren Verhältnis jedes Oligonucleotids, bezogen auf das Plasmid, das im Bereich von 0,01 bis 100 liegt,
- d) Denaturieren des Gemischs aus Schritt (c) durch die Temperatur, um eine einzelsträngige Matrix zu erhalten,
- e) Einwirken lassen einer Temperatur auf das Gemisch aus Schritt (d), die die Hybridisierung der Oligonucleotide auf die Matrix ermöglicht,
- f) Zugabe einer Polymerase, ihres Puffers und ihrer Cofaktoren, und einer ausreichenden Menge jedes der Nucleotidtriphosphate zum Gemisch, um die Replikation der Stränge der Matrix mit beliebigen Oligonucleotiden zu ermöglichen,
- g) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte (d), (e) und (f),
- h) Selektieren mit jedem geeigneten Mittel der Produkte aus Schritt (f) oder (g), die der Replikation unterzogen wurden,
- i) Transformieren der in Schritt (h) ausgewählten Produkte in kompetente Bakterien, und Selektieren der Produkte, die ein mutiertes Gen tragen, auf einem selektiven Medium, das mit einem Resistenzgen korrespondiert, das von dem Plasmid aus Schritt (a) getragen wird.

17. Verfahren zur Mutagenese nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt (h) darin besteht, die Produkte aus Schritt (f) der Einwirkung eines Restriktionsenzym zu unterziehen, das die Produkte selektiert, die der Replikation unterzogen wurden.

18. Verfahren zur Mutagenese nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Restriktionsenzym, das die Produkte selektiert, die der Replikation unterzogen wurden, das Enzym DpnI ist.

19. Verfahren zur Mutagenese nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonucleotide an ihrem 5'-Ende phosphoryliert sind und dass im Schritt (f) eine Ligase zugegeben wird.

20. Verfahren zur Mutagenese nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Zielgen ein Nucleinsäuremolekül ist, das ein interessierendes Protein mit oder ohne seine eigenen Regulationssequenzen codiert.

21. Verfahren zur Mutagenese eines Zielproteins oder einer Bank mutierter Zielproteine, dadurch gekennzeichnet, dass es die Erzeugung einer Expressionsbank mutierter Gene aus einem Zielgen, das dieses Protein codiert, nach einem der Ansprüche 1 bis 20 umfasst, dass anschließend die mutierten Gene exprimiert werden, um eine Bank mutierter Proteine zu erzeugen, und dass die mutierten Proteine gegebenenfalls hinsichtlich einer gewünschten Funktion einem Screening unterzogen werden.

22. Verfahren zur Selektion mutierter Proteine, die eine modifizierte Aktivität aufweisen, bezogen auf das gleiche nicht mutierte Protein, oder des mutierten Gens, das dem mutierten Protein entspricht, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Verfahren zur Mutagenese nach Anspruch 21 umfasst, dass nach dem Screening der mutierten Proteine hinsichtlich einer gewünschten Funktion das mutierte Protein ausgewählt wird, das die gewünschte Funktion aufweist.

23. Verfahren zur Mutagenese eines Zielproteins oder einer Bank mutierter Zielproteine nach Anspruch 21 oder zur Selektion eines mutierten Proteins oder des entsprechenden Gens nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass es die Erzeugung einer Expressionsbank mutierter Gene ausgehend von einem Zielgen, das dieses Protein codiert, nach einem der Ansprüche 16 bis 20 umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass es nach dem Schritt (i) die folgenden Schritte umfasst:

j) Inkubieren des selektiven Mediums bei der adäquaten Temperatur über den Zeitraum, der für das Wachstum individueller bakterieller Kolonien ausreichend ist,

k) Beimpfen individueller Bakterienkulturen mit den Kolonien aus Schritt (j)

l) Erzeugen von Zubereitungen plasmidischer DNA aus den Kulturen aus Schritt (k),

m) Messen der biologischen Aktivität, die jede Zubereitung plasmidischer DNA aus Schritt (l) aufweist, und Vergleichen des erhaltenen Ergebnisses, bezogen auf das Ergebnis, das bei Verwendung der nicht mutierten plasmidischen DNA erhalten wird,

n) gegebenenfalls Sequenzieren der Zubereitungen plasmidischer DNA, bei denen die Beobachtung signifikanter Änderungen der biologischen Aktivität möglich war.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

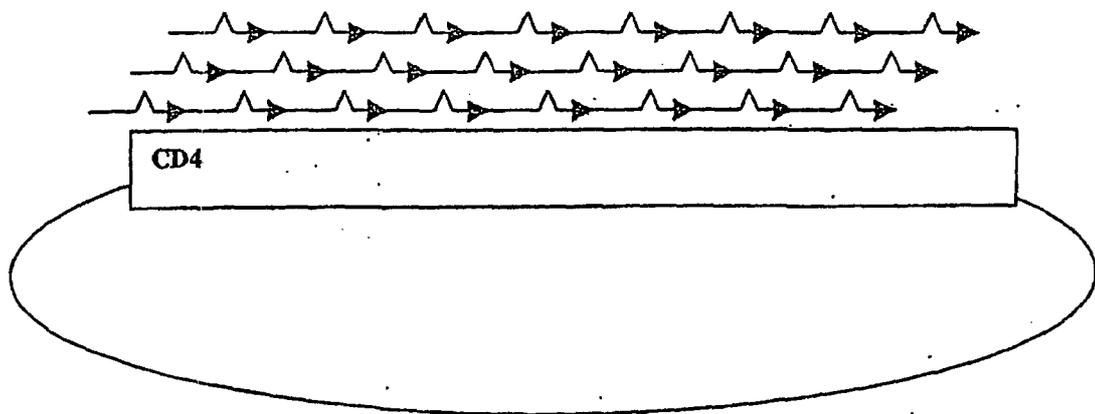


Fig. 2

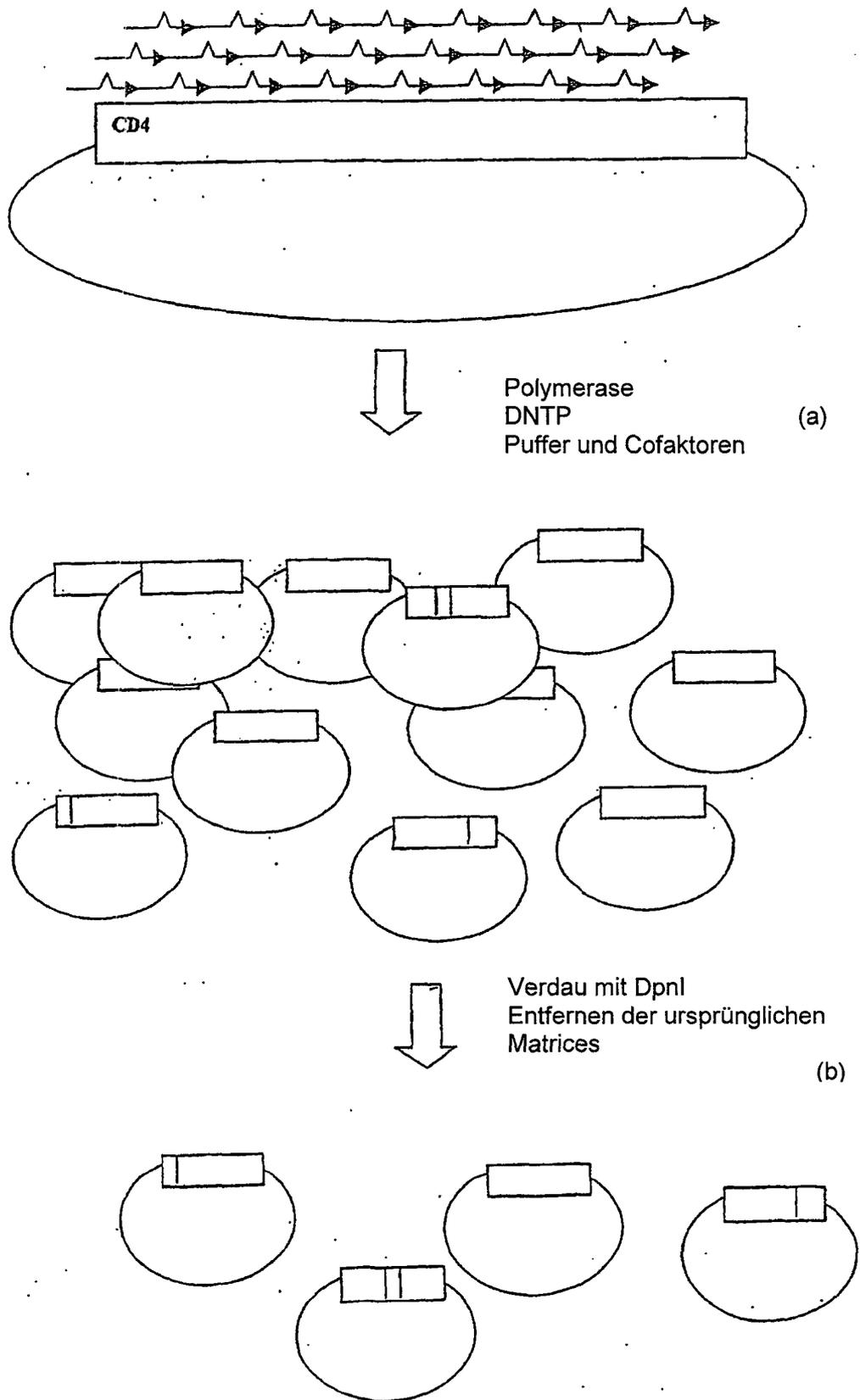
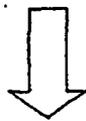


Fig. 2

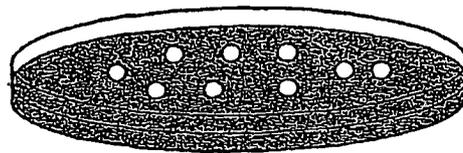
(Fortsetzung)

Transformation kompetenter Bakterien



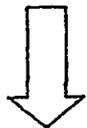
(c)

Ausstreichen auf einem selektiven Medium

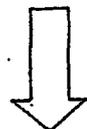
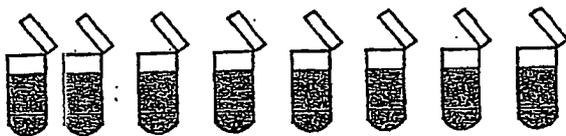


Beimpfen bakterieller Kulturen mit isolierten Kolonien

(d)



Aufbereiten der plasmidischen DNA



(e)

Prüfen des Phänotyps, Selektion und Sequenzierung der Mutanten mit dem gewünschten Phänotyp

Fig. 3

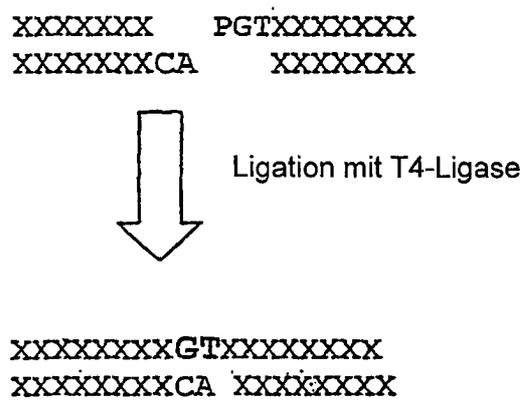


Fig. 4

CCGTGTGATNACGTGCAGA

4 Molekülsorten

ATCGATAGGNNAGAGTCTTA

16 Molekülsorten

ATGGGATGANNNAGTTCGATG

64 Molekülsorten