



(12)

Patentschrift

- (21) Anmeldenummer: A 1146/2006 (51) Int. Cl.⁸: **C12N 15/12** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
(22) Anmeldetag: 2006-07-05
(43) Veröffentlicht am: 2008-06-15

(56) Entgegenhaltungen:
US 2004266993A1 WO 1993/023537A1
DIGIUSTO, DL, PALMER, E, MOL.
IMMUNOL. 1994, JUN;
31(9): 693-9

(73) Patentanmelder:
F-STAR BIOTECHNOLOGISCHE
FORSCHUNGS- UND
ENTWICKLUNGSGES.M.B.H.
A-1230 WIEN (AT)

(72) Erfinder:
HIMMLER GOTTFRIED DIPL.ING. DR.
GROSS-ENZERSDORF (AT)
RÜKER FLORIAN DIPL.ING. DR.
WIEN (AT)

(54) VERFAHREN ZUR MANIPULATION VON T-ZELL-REZEPTOREN

- (57) Die vorliegende Erfindung stellt ein neues Verfahren zur Manipulation von T-Zellrezeptordomänenpolypeptiden zur Verfügung, das mindestens eine Veränderung in einer Strukturschleifenregion des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids umfasst, und Bestimmung der Bindung des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids an ein Epitop eines Antigens, wobei das unveränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid im wesentlichen nicht an das Epitop bindet, welches die Schritte Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptid kodiert, welches mindestens eine Strukturschleifenregionen umfasst, Veränderung mindestens eines Nukleotidrests von mindestens einer der Strukturschleifenregionen, Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem, Expression des veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids, Kontaktierung des exprimierten veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids mit dem Epitop und Bestimmung, ob das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid an das Epitop bindet.
- Die vorliegende Erfindung umfasst auch veränderte Polypeptide der T-Zellrezeptordomänen erhältlich durch dieses Verfahren und deren Verwendung und Bibliotheken enthaltend die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide.

Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Manipulation und Herstellung von modifizierten T-Zellrezeptoren und Domänen von T-Zellrezeptorpolypeptiden mit dem Ziel, sie mit spezifischen Bindungseigenschaften auszustatten. Weiters werden modifizierte Domänen von T-Zellrezeptorpolypeptiden beschrieben, die durch dieses Verfahren erhalten werden, sowie deren Verwendung für die Herstellung von Bibliotheken und die Entwicklung von Detektions- und Screeningverfahren von möglichen Bindungsstrukturen.

Hintergrund:

T-Zell-Rezeptoren (TCRs) sind wichtige Moleküle des Immunsystems. Ihre extrazelluläre Domänen sind homolog und strukturell ähnlich zu einem Fab Fragment eines Antikörpers.

T-Zell-Rezeptoren werden in der Natur an den Oberflächen der T-Zellen exprimiert, üblicherweise als alpha/beta und gamma/delta heterodimäre, integrale Membranproteine, wobei jede Untereinheit ein kurzes intrazelluläres Segment, eine einzelne transmembrane Alpha-Helix und zwei globuläre extrazelluläre Domänen der Ig-Superfamilie umfasst. Das TCR-Heterodimär wird durch eine extrazelluläre, nahe der Membran gelegene, zwischenkettige Disulfid Bindung stabilisiert. (Immunobiology. 5th ed. Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark; Shlomchik, Mark. New York and London: Garland Publishing; 2001).

TCRs haben daher vier extrazelluläre Domänen, die zwei zur Membran benachbarten Domänen (C-terminal), die konstant sind, und die zwei N-terminalen Domänen, die variabel sind.

Gensegmenten (und Diversitätsgensegmenten in Falle der β -Ketten), um so die TCR-Vielfältigkeit herzustellen, die im ausgereiften Immunsystem beobachtet wird.

Beide variablen Domänen sowie die konstanten Domänen der T-Zell-Rezeptoren sind strukturell ähnlich zu Antikörper-Domänen und zeigen die typische „Immunglobulin-Faltung“:

Jede Domäne hat eine ähnliche Struktur von zwei Beta-Faltblättern die sehr eng aneinander in einem komprimierten antiparallelen Beta-Zylinder gepresst vorliegen.

Die Immunglobulinfaltung der konstanten Domänen des TCR (C-Domänen) enthält ein 3-strängiges Faltblatt das eng gepackt an ein 4-strängiges Faltblatt vorliegt. Die Faltung ist durch Wasserstoff-Bindung zwischen den Beta-Strängen jedes einzelnen Faltblatts stabilisiert, sowie durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Resten der gegenüberliegenden Faltblätter im Inneren, und durch eine Disulfidbindung zwischen den Faltblättern. Die 3-strängigen Faltblatt-Stränge werden als C, F und G bezeichnet, das 4-strängige Faltblatt umfasst die Stränge A, B, D, und E. Die Buchstaben A bis G bezeichnen die sequentiellen Positionen der Beta Stränge entlang der Aminosäure-Sequenz der Immunglobulin-Faltung.

Die Faltung der variablen Domänen (V-Domänen) hat 9 Beta-Stränge die in 2 Schichten von 4 und 5 Strängen angeordnet sind. Das 5-strängige Faltblatt ist strukturell homolog zum 3-strängigen Faltblatt der konstanten Domänen, enthält aber die zusätzlichen Stränge C' und C". Die übrigen Stränge (A, B, C, D, E, F, G) haben dieselbe Anordnung und eine ähnliche Struktur wie ihre Gegenspieler in den konstanten Domänen der Immunglobulinfaltungen.

Eine Disulfid-Bindung verbindet die Stränge B und F in den gegenüberliegenden Faltblättern, wie in den konstanten Domänen.

Die gesamte Nummerierung der Aminosäuresequenzen und Zuordnung der Proteinschleifen und Faltblätter der TCRs entsprechen dem IMGT Nummerierungsschema (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system@imgt.cines.fr; <http://imgt.cines.fr>; Lefranc et al.,

(2003) Dev Comp Immunol 27:55-77.; Lefranc et al. (2005) Dev Comp Immunol 29:185-203).

Die variablen Domänen der beiden TCR Ketten enthalten drei hypervariable Schleifen, oder komplementdeterminierende Regionen (CDRs). Die drei CDRs einer V Domäne (CDR1, CDR2, CDR3) gruppieren sich an einem Ende des Beta-Fasses. Die CDRs sind Schleifen, welche die Beta-Stränge B-C, C'-C" sowie F-G der Immunoglobulinfaltung miteinander verbinden. Die Reste in den CDRs variieren von einem TCR-Molekül zum nächsten, wodurch jedem TCR eine Antigen-spezifität verliehen wird.

Die V-Domänen an den Spitzen der TCR-Moleküle sind dicht gepackt, sodass die 6 CDRs (3 auf jeder variablen Domäne) zur Bildung einer Oberfläche (oder eines Hohlraums) zur antigenspezifischen Bindung zusammenwirken. Die natürliche Antigenbindungsstelle eines TCR setzt sich somit aus den Schleifen, welche die Stränge B-C, C'-C" und F-G der variablen Domäne der leichten Kette und die Stränge B-C, C'-C" und F-G der variablen Domäne der schweren Kette verbinden, zusammen. Das Ausmaß des spezifischen Beitrags zur Antigenbindung durch die sechs CDR Schlaufen kann zwischen den verschiedenen TCRs variieren.

Es wurde gezeigt, das T-Zellrezeptoren therapeutisches und diagnostisches Potenzial haben und ähnlich den Antikörpermolekülen manipuliert werden können (z.B. Molloy et al. Curr Opin Pharmacol. (2005) 5:438-443; Boulter & Jakobsen (2005) Clin Exp Immunol. 142:454-460).

Die Klonierung und Expression von löslichen und Zellverankerten T-Zellrezeptoren in verschiedenen Ausführungsformen wurde bereits gezeigt (z.B. Moysey et al. (2004) Anal Biochem. 326:284-286; Wulfing & Plueckthun (1994) J Mol Biol. 242:655-669; Boulter et al. (2003) Protein Eng. 16:707-711; Schodin et al. (1996) Mol Immunol 33:819-829; Chung et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:12654-12658; Plaksin et al. (1997) J Immunol 158:2218-2227; Willcox et al. (1999) Protein Sci 8:2418-2423; Weber et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA. 102:19033-19038; WO04050705A2; WO9618105A1; WO04033685A1; WO02066636A2). WO02059263C2 beschreibt transgene Tiere mit einem humanisiertes Immunsystem zur Entwicklung von humanen TCR Molekülen.

Die Herstellung von hochaffiner Bindung wurde gezeigt und ähnlich den Technologien zur Affinitätsreifung von Antikörpern betrieben (z.B. Boulter et al. Nat Biotechnol. (2005) 23:349-354; Chlewicki et al. (2005) J Mol Biol. 346:223-239; Shusta et al. (2000) 18:754-759; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:5387-92). WO04044004A2, WO05116646A1 und WO9839482A1 beschreiben Ribosomen- und Phagenpräsentation von TCR Ketten und Verfahren zur Selektion von TCR Molekülen gegen spezifischen Antigene. WO0148145A2 beschreibt hoch affine TCRs. Die Manipulation von extrazellulären variablen Domänen der T-Zellrezeptoren wurde zum Zweck der Manipulation der Spezifitäten mittels Modifikation der CDR-Regionen beschrieben. (WO05114215A2; WO0155366C2).

Die CDR-Schleifen der variablen Domäne der TCR definieren die Antigen-spezifität. Der Rest der Domäne wird als Gerüst (framework, FR) bezeichnet. Diese Gerüstregionen sind aus Beta-Strängen und Schleifenstrukturen zusammengesetzt.

Die Schleifen, die in einer nativen Domäne eines TCR nicht CDR-Domänen sind, weisen keine antigenbindende oder epitopbindende Spezifität auf, sondern tragen zur korrekten Gesamtfaltung der TCR Domäne und somit auch zur korrekten Positionierung der CDRs und zur Wechselwirkung zwischen den Domänen bei. Zum Zwecke dieser Erfindung werden diese Schleifen Strukturschleifen genannt.

Die Gerüstregionen der TCR Domänen wurden modifiziert, z.B. zur Stabilisierung der Dimere. WO06037960A2 und WO06056733A1 beschreiben den Einbau einer nicht-nativen Disulfid Zwischenkettenbindung. WO0157211A1 beschreibt die Heterodimerisation von TCR Ketten durch die Fusion an Leuzin-Zipper Peptide.

EP0640130B1 beschreibt chimäre Proteinanaloga (chi-Proteine) der Immunoglobulin-Superfamilie, welche mehr als eine biologische Bindungsstelle aufweisen (einzelne V Domänen oder Fvs). Die Bindungsstellen auf diesen Proteinen umfassen hypervariable Regionen, die sich von Molekülen ableiten, welche in Bezug mit der Immunoglobulin-Superfamilie von Molekülen stehen, einschließlich Immunoglobuline, Zelloberflächenantigene (wie etwa T-Zell-Antigene) und Zellrezeptoren (wie etwa Fc-Rezeptor). Die hypervariablen Regionen werden "CDR-ähnliche Regionen" genannt und bezeichnen die Ligandenbindungsstellen. Zusätzlich weist das chi-Protein mindestens ein weiteres Ligandenbindungsstellensegment auf, ebenfalls eine CDR-ähnliche Region, welche in die FR-ähnlichen Regionen der Beta-Fassdomäne gespeist ist.

Jede Ligandenbindungsstelle des chi-Proteins umfasst somit eine CDR-ähnliche Region, die sich von Molekülen der Immunoglobulinsuperfamilie herleitet. Beispielsweise umfasst die Ligandenbindungsstelle die CDRs, die sich von einem Immunoglobulinmolekül herleiten, dessen Ligand ein Antigen ist. EP0640130B1 lehrt somit, wie CDR-ähnliche Regionen mit einer gegebenen Spezifität aus einem Molekül der Immunoglobulin-Superfamilie in die Strukturschleifen einer variablen Domäne gespeist werden. Es wird von den Erfindern der chi-Proteine beansprucht, dass funktionsfähige bispezifische Antikörper durch diese Technik hergestellt werden können. Diese Technik erfordert allerdings, dass die relativen Orientierungen der CDR-ähnlichen Schleifen (CDR-Schleifen-Symmetrie) für eine variable Domäne in vernünftiger Annäherung an die relative Orientierung der Strukturschleifen nachgebildet werden soll. EP0640130B1 beansprucht, dass eine solche Annäherung an die CDR-Schleifen-Symmetrie für die Strukturschleifen existiert. Es ist jedoch zweifelhaft, dass sich die relative Orientierung der CDR-Schleifen und der Strukturschleifen in genügend Detail und Auflösung ähnelt; es wurde folgerichtig bis heute noch nicht beschrieben, dass es mit dieser Technik tatsächlich möglich ist, bispezifische Moleküle zu entwickeln.

EP0640130B1 veranschaulicht, dass R19.9 (ein monoklonaler Mausantikörper spezifisch für p-Azobenzolarsonat) und 26-10 (ein monoklonaler Mausantikörper spezifisch für Ouabain) als Gerüst für die Bereitstellung der respektiven primären CDR-Schleifen verwendet wurden, und die CDR-Schleifen des Maus-Anti-Lysozym Antikörpers D1.3 wurden auf die Strukturschleifenregionen gepfropft. Es wurde jedoch keine funktionelle Spezifität nach dem Pfropfen beschrieben.

Ein weiteres Beispiel beschreibt, dass der für Ouabain spezifische einzelkettige Antikörper 26-10 nach dem Pfropfen zweier CDRs des Lysozym-spezifischen Antikörpers in die strukturellen Schleifen des Ouabain-spezifischen einzelkettigen Fv Antikörperfragments seine Spezifität für Ouabain beibehalten konnte. Es wurde jedoch nicht beschrieben, dass das Antikörperfragment, welches nach diesem Verfahren hergestellt wurde, auch Lysozym-bindende Spezifität aufwies.

Um zusätzliche Funktionen auf TCR Molekülen zur Verfügung zu stellen, wurden verschiedene Fusionsmoleküle hergestellt: Mosquera et al. (2005) J Immunol 174:4381-4388 beschreibt ein neues Antikörper-ähnliches einzelkettiges TCR Fusionsprotein mit humanem IgG; Epel et al. (2002) Cancer Immunol Immunother 51:565-573 beschreibt ein funktionelles einzelkettiges T-Zellrezeptorfragment das an Exotoxin A Protein fusioniert wurde, welches selektiv Antigen präsentierende Zellen anpeilen kann. Es wurde berichtet, dass die Fusion von einzelkettigen TCRs an IL-2 die Lungenmetastasen in transgenen Tumormodellen der Maus reduzieren kann. (Card et al. (2004) Cancer Immunol Immunother 53:345-357). WO06054096A2 beschreibt ein lösliches bifunktionelles Protein das eine Verbindung zwischen einem T-Zellrezeptor (TCR) und einem Superantigen umfasst.

US 2004/266993 A1 beschreibt das Design und Engineering von Polypeptid- Bindungsmoleklen, im Speziellen Nicht-Immunoglobuline mit immunoglobulin-artigen Domänen.

WO 1993/023537 A1 zeigt ein chimäres Protein aus einer Immunoglobulin-Superfamilie, mit mehr als einer Bindungsstelle.

DiGiusto et al (Mol Immunol 1994 Jun; 31(9):693-9) beschreibt eine Analyse von Sequenzvariationen in den Beta-Faltblatt-Strukturen und CDR-Regionen eines T-Zell-Rezeptors.

Es ist von großem Wert für therapeutische, diagnostische und analytische Anwendungen, zusätzliche Funktionen in die TCR Moleküle einzubringen. Die Herstellung von Fusionsproteinen ist ein Ansatz um dieses Ziel zu erreichen. Allerdings ist es häufig schwierig, Fusionsproteine herzustellen und kann zu erhöhter Immunogenität führen, wenn das Molekül therapeutisch eingesetzt wird. Es wurde bisher nicht gezeigt, dass das Pfropfen (grafting) von CDR-Schleifen in strukturelle Schlaufenregionen der variablen Domänen zur Manipulation von bispezifischen Molekülen führte.

Die vorliegende Erfindung stellt eine Lösung für die Einbringung von neuen Funktionen in TCR Moleküle zur Verfügung.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung stellt vorteilhafterweise ein Verfahren zur Manipulation von T-Zellrezeptordomänenpolypeptiden zur Verfügung, das mindestens eine Veränderung in einer Strukturschleifenregion des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids umfasst, und die Bestimmung der Bindung des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids an ein Epitop eines Antigens, wobei das unveränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid im wesentlichen nicht an das Epitop bindet, welches die Schritte umfasst:

- Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptid kodiert, welches mindestens eine Strukturschleifenregionen umfasst,
- Veränderung mindestens eines Nukleotidrests von mindestens einer der Strukturschleifenregionen
- Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
- Expression des veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids mit diesem Epitop,
- Kontaktierung des exprimierten veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids mit dem Epitop und
- Bestimmung, ob das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid an das Epitop bindet.

Gemäß der Erfindung können die so erhaltenen T-Zellrezeptordomänenpolypeptide spezifisch an ein einzelnes Epitop, aber auch an zwei oder mehrere Epitope binden. Die T-Zellrezeptordomänenpolypeptide gemäß der Erfindung können humanen oder tierischen Ursprungs sein, bevorzugt humanen oder murinen Ursprungs. Die erfindungsgemäßen T-Zellrezeptordomänen können aus den variablen oder konstanten Domänen ausgewählt sein, bevorzugt aus V-alpha, V-beta, V-gamma, V-delta, C-alpha, C-beta, C-gamma, C-delta Domänen.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung können die veränderten Schleifenregionen der variablen Domänen mindestens eine Veränderung innerhalb der Aminosäuren 11 bis 19, Aminosäuren 43 bis 51, Aminosäuren 67 bis 80 oder Aminosäuren 90 bis 99 umfassen. Die modifizierten Schleifenregionen der konstanten Domänen können mindestens eine Veränderung innerhalb der Aminosäuren 9 bis 20, Aminosäuren 27 bis 36, Aminosäuren 41 bis 78, Aminosäuren 82 bis 85, Aminosäuren 90 bis 102 oder Aminosäuren 107 bis 116 umfassen. Die Numerierung der Aminosäurepositionen der Domänen ist gemäß IMGT.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt beispielsweise eine Veränderung von mindestens einem Nukleotid einer Nukleinsäure zur Verfügung, welches zu einer Substitution, Deletion und/oder Insertion von einer oder mehreren Aminosäuren des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids führt, das durch die Nukleinsäure kodiert wird.

Alternativ wird mindestens eine Aminosäure von mindestens einer Strukturschleifenregion durch ortsgerechte Zufallsmutation verändert, wobei das zufällig veränderte Nukleinsäuremolekül

mindestens eine Nukleotid wiederholende Einheit umfassen kann, mit der Kodierungssequenz NNS, NNN, NNK, TMT, WMT, RMC, RMG, MRT, SRC, KMT, RST, YMT, MKC, RSA, RRC, wobei der Code entsprechend IUPAC ist.

- 5 Die Erfindung stellt weiters Polypeptide von T-Zellrezeptordomänen zur Verfügung, die durch dieses Verfahren erhalten werden können und deren Verwendung für die Herstellung einer Proteinbibliothek von Varianten von Polypeptiden der T-Zellrezeptordomänen.

- 10 Das erfindungsgemäße Verfahren stellt insbesondere Bibiotheken zur Verfügung, die mindestens 10 Polypeptide von T-Zellrezeptordomänen oder T-Zellrezeptoren mit einer Veränderung in mindestens einer Strukturschleifenregion, alternativ mit Mutationen von mindestens 3 Aminosäurepositionen in mindestens einer Strukturschleifenregion umfassen. Die Polypeptide der T-Zellrezeptordomänen können V-alpha, V-beta, V-gamma, V-delta, C-alpha, C-beta, C-gamma oder C-delta sein.

- 15 Erfindungsgemäß wird auch ein Verfahren zur spezifischen Bindung und/oder zum Nachweis eines Moleküls zur Verfügung gestellt, das die Schritte (a) Kontaktieren der Bibliothek mit veränderten T-Zellrezeptoren oder veränderte Polypeptiden von T-Zellrezeptordomänen erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, mit einer Testprobe die das Molekül enthält, und
20 wahlweise (b) Detektion der möglichen Bildung eines spezifischen T-Zellrezeptor/Molekül-Komplexes umfasst.

- Weiters ermöglicht die Erfindung ein Verfahren zur spezifischen Isolierung einer veränderten T-Zellrezeptorbindung an ein Molekül, umfassend die Schritte (a) Kontaktieren einer Bibliothek mit veränderten T-Zellrezeptoren oder veränderter T-Zellrezeptordomänenpolypeptide erhältlich
25 nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, mit einer Testprobe die das Molekül enthält, (b) Abtrennen des gebildeten spezifischen T-Zellrezeptor/Molekül Komplexes, und (c) wahlweise Isolieren des veränderten T-Zellrezeptors von dem Komplex.

- 30 Ein Bausatz (kit) aus Bindungspartnern wird ebenso zur Verfügung gestellt, der (a) eine Bibliothek aus veränderten T-Zellrezeptoren oder veränderten Polypeptiden von T-Zellrezeptordomänen enthält, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten wurden, und (b) ein Bindungsmolekül, das ein Epitop eines Antigens enthält.

- 35 Das Bindungsmolekül des Bausatzes kann für die Auswahl eines veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids aus einer erfindungsgemäßen Bibliothek verwendet werden.

- Die Erfindung stellt auch ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptid zur Verfügung, das mindestens eine Strukturschleifenregion umfasst, wobei mindestens eine Schleifenregion mindestens eine
40 Veränderung umfasst, wodurch eine Bindung mindestens einer veränderten Schleifenregion an ein Epitop eines Antigens ermöglicht wird, wobei das nicht-veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid nicht an das Epitop bindet.

- Diese T-Zellrezeptordomänenpolypeptide kann bevorzugt an ein Epitop eines Antigens binden, beispielsweise Serumproteine, Fc-Rezeptoren, Komplementmoleküle und Serumalbumine. Die Bindung an diese Antigene kann vorteilhaft sein, da native TCRs keinerlei Effektorfunktionen haben. Durch die Entwicklung von veränderten Polypeptiden der T-Zellrezeptordomänen die an Fc Rezeptoren wie Fc gamma I, II oder III oder neonatale Fc Rezeptoren oder Komplementproteine binden, können TCRs erhalten werden, die Fähigkeiten zu Effektorfunktionen haben.
45

- 50 Alternativ können durch die Bindung an neonatale Fc Rezeptoren auch die Serumhalbwertszeiten der so veränderten TCRs gesteigert werden. Die kann sehr vorteilhaft für therapeutische Zwecke sein.

- 55 Die erfindungsgemäß veränderten Polypeptide der T-Zellrezeptordomänen können auch min-

destens zwei veränderte Strukturschleifenregionen enthalten.

Zusätzlich kann der T-Zellrezeptor, der mindestens eine wie oben beschriebene veränderte T-Zellrezeptordomäne umfasst, V-alpha, V-beta, V-gamma, V-delta, C-alpha, C-beta, C-gamma, C-delta oder einen Teil davon sein und die mindestens eine veränderte Strukturschleifenregion kann mindestens 3 Aminosäurenveränderungen enthalten.

Die Erfindung stellt auch ein Molekül oder eine Zusammensetzung zur Verfügung, die mindestens eine erfindungsgemäße veränderte T-Zellrezeptordomäne aufweist und mindestens ein anderes Bindungsmolekül, wobei das andere Bindungsmolekül ausgewählt ist aus der Gruppe von erfindungsgemäßen veränderten T-Zellrezeptordomänen, Immunglobulinen, löslichen Rezeptoren, Liganden, Nukleinsäuren und Kohlehydraten. Das Molekül oder die Zusammensetzung kann weiters dadurch gekennzeichnet sein, dass die veränderten Schleifenregionen des V-alpha, V-beta, V-gamma, V-delta mindestens eine Veränderung in den Aminosäuren 11 bis 19, Aminosäuren 43 bis 51, Aminosäuren 67 bis 80 oder Aminosäuren 90 bis 99 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäureposition der Domänen die des IMGT ist.

Alternativ kann das Molekül oder die Zusammensetzung dadurch gekennzeichnet sein, dass die Schleifenregionen eines C-alpha, C-beta, C-gamma, C-delta mindestens eine Modifikation innerhalb der Aminosäuren 9 bis 20, Aminosäuren 27 bis 36, Aminosäuren 41 bis 78, Aminosäuren 82 bis 85, Aminosäuren 90 bis 102 oder Aminosäuren 107 bis 116 aufweisen, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen die des IMGT ist.

Selbstverständlich stellt die vorliegende Erfindung weiters eine Nukleinsäure zur Verfügung die die T-Zellrezeptordomäne oder einen Teil davon kodiert.

Genaue Beschreibung der Erfindung

Eine erfindungsgemäße "Strukturschleife" oder "nicht CDR-Schleife" muss auf folgende Weise verstanden werden: T-Zellrezeptoren werden von Domänen mit einer sogenannten Immunglobulinfaltung gebildet. Im wesentlichen werden antiparallele Beta-Faltblätter durch Schleifen verbunden, um ein komprimiertes antiparalleles Beta-Fass zu bilden. In der variablen Region tragen einige der Schleifen der Domänen wesentlich zur Spezifität des Antikörpers bei, d.h. der Bindung an ein Antigen. Diese Schleifen werden CDR-Schleifen genannt. Alle weiteren Schleifen von variablen Domänen von Antikörpern tragen eher zur Struktur des Moleküls und/oder der Wechselwirkung mit anderen Domänen bei. Diese Schleifen werden hierin als Strukturschleifen oder nicht-CDR-Schleifen definiert.

T-Zellrezeptoren sind Moleküle auf T-Zellen. Für den Zweck der Erfindung beinhaltet das auch Moleküle die von T-Zellrezeptoren abstammen, inklusive, aber nicht beschränkt auf Fusionsproteine, Chimäre von T-Zellrezeptorsequenzen mit anderen Sequenzen von Immunglobulindomänen, Chimäre von T-Zellrezeptorsequenzen einer Spezies mit Sequenzen von verschiedenen Spezies, lösliche T-Zellrezeptoren, einzelkettige T-Zellrezeptoren, Zipper-dimerisierte T-Zellrezeptoren.

Ein Polypeptid der TCR-Domäne ist eine Abfolge von Aminosäuren die von einer variablen oder konstanten Domäne eines TCR, die mindestens eine Strukturschleife enthält, abstammen.

Der Begriff Immunglobulin wird hier für Antikörper, deren Fragmente, variable Regionen, konstante Regionen und deren Fusionsmoleküle verwendet.

Im besonderen bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Manipulation eines T-Zellrezeptordomänenpolypeptids das spezifisch mit seinen veränderten Strukturschleifen an ein Epitop eines Antigens, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Allergenen, Tumorassoziierten Antigenen, Selbstantigenen, Enzymen, Fc-Rezeptoren, Proteinen des Komple-

mentsystems, Serummolekülen, bakteriellen Antigenen, pilzlichen Antigenen, einzelligen Antigenen und viralen Antigenen bindet.

In einer bevorzugten Ausführungsform bindet das T-Zellrezeptordomänenpolypeptid mit seinen veränderten Strukturschleifen an mindestens zwei sich voneinander unterscheidenden Epitopen entweder vom selben Antigen oder von verschiedenen Antigenen.

Es wird verstanden, dass der Begriff "T-Zellrezeptordomänenpolypeptid", "veränderte T-Zellrezeptordomäne" oder „T-Zellrezeptordomäne gemäß der Erfindung" ein Derivat eines T-Zellrezeptors ebenfalls beinhaltet. Ein Derivat ist jede Kombination einer oder mehrerer erfindungsgemäßer T-Zellrezeptordomänen und/oder ein Fusionsprotein in dem jede erfindungsgemäße T-Zellrezeptordomäne an jeder Position mit einem oder mehreren Proteinen verbunden werden kann, inklusive, aber nicht beschränkt auf andere T-Zellrezeptordomänen, Immunglobulin Domänen, Fc Anteile, Liganden, Gerüstproteine, Enzyme, Toxine, Serumproteine und ähnliche kann. Ein Derivat des T-Zellrezeptors der Erfindung kann auch durch Verbindung des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids der Erfindung mit anderen Substanzen durch verschiedene chemische Techniken wie etwa kovalente Koppelung, elektrostatische Wechselwirkung, Disulfidbindung etc. erhalten werden.

Die anderen an das T-Zellrezeptordomänenpolypeptid gebundenen Substanzen können Lipide, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, organische und anorganische Moleküle oder beliebige Kombinationen derer sein (z.B. PEG, Vorläufermedikamente oder Medikamente). Ein Derivat ist auch ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptid mit derselben Aminosäuresequenz, welches aber vollständig oder teilweise aus nicht natürlichen, künstlichen oder chemisch veränderten Aminosäuren hergestellt ist.

Die erfindungsgemäß manipulierten Moleküle sind als Einzelproteine wie auch als Fusionsproteine oder Derivate nützlich, die typischerweise auf solche Weise fusioniert, dass sie Teile von größeren T-Zellrezeptorstrukturen oder vollständigen T-Zellrezeptormolekülen oder Teilen davon sind wie bispezifische und multispezifische einzelkettige T-Zellrezeptoren oder kombinierte Formulierungen, worin die veränderten Polypeptide wie benötigt kombiniert sind. Es ist möglich die manipulierten Proteine zur Herstellung von Molekülen zu verwenden, die monospezifisch, bispezifisch, trispezifisch sind und die gleichzeitig sogar mehr Spezifitäten tragen können und es wird durch die Erfindung ermöglicht, gleichzeitig die Valenz der Bindung zu kontrollieren und vorauszuwählen, gemäß der Anforderungen der geplanten Verwendung dieser Moleküle.

Gemäß der vorliegenden Erfindung können die Bindungsregionen an Antigene oder Antigenbindungsstellen an alle Arten von Allergenen, Tumor assoziierten Antigenen, Selbstantigenen, Enzymen, Fc-Rezeptoren, Proteinen des Komplementsystems, Serummolekülen, bakterielle Antigenen, pilzlichen Antigenen, einzelligen Antigenen und viralen Antigenen in eine Strukturschleifenregion einer gegebenen T-Zellrezeptorendomänstruktur eingeführt werden. Die Antigene können natürlich vorkommende Moleküle oder chemisch synthetisierte Moleküle oder rekombinante Moleküle sein, alle entweder in Lösung oder auf oder in Partikeln wie feste Phasen, auf oder in Zellen oder auf viralen Oberflächen.

Bevorzugte Antigene sind Serumproteine, Fc-Rezeptoren, wie Fc gamma I, II oder II, neonatale Fc Rezeptoren, Komplementmoleküle und Serumalbumine.

Der Begriff "Allergene, Tumor assoziierte Antigene, Selbstantigene, Enzyme, Fc-Rezeptoren, Proteine des Komplementsystems, Serummoleküle, bakterielle Antigene, pilzliche Antigene, einzellige Antigene und virale Antigene" gemäß der vorliegenden Erfindung soll alle Allergene und Antigene und Ziele umfassen, die durch einen T-Zellrezeptor oder Antikörper erkannt werden können, und Fragmente dieser Moleküle ebenso wie kleine Moleküle wie Haptene.

Die Bezeichnung "Epitop" wie hierin erfindungsgemäß verwendet, soll eine molekulare Struktur bedeuten, die einen spezifischen Bindungspartner vollständig bilden kann oder die ein Teil eines spezifischen Bindungspartners an eine Bindungsdomäne oder ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptid der vorliegenden Erfindung sein kann.

Chemisch kann ein Epitop entweder aus einem Kohlenhydrat, einem Peptid, einer Fettsäure, einer organischen, biochemischen oder anorganischen Substanz oder Derivaten davon oder jeglichen Kombinationen davon bestehen. Wenn ein Epitop ein Polypeptid ist, umfasst es für gewöhnlich mindestens 3 Aminosäuren, vorzugsweise 8 bis 50 Aminosäuren und besonders bevorzugt zwischen etwa 10-20 Aminosäuren im Peptid. Es gibt keine kritische Obergrenze für die Länge des Peptids, das beinahe die volle Länge der Polypeptidsequenz umfassen könnte. Epitope können entweder lineare oder konformative Epitope sein. Ein lineares Epitop umfasst ein einzelnes Segment einer Primärsequenz einer Polypeptidkette. Lineare Epitope können zusammenhängend oder überlappend sein. Konformative Epitope umfassen Aminosäuren, die durch Faltung des Polypeptids zur Bildung einer Tertiärstruktur zusammengeführt werden und die Aminosäuren grenzen in der linearen Sequenz nicht notwendigerweise aneinander an.

Speziell stellen Epitope mindestens einen Anteil diagnostisch relevanter Moleküle dar, d.h. die Abwesenheit oder Gegenwart eines Epitops in einer Probe steht qualitativ oder quantitativ in Beziehung mit entweder einer Krankheit oder dem Gesundheitszustand eines Patienten oder einem Verfahrensstatus bei einem Herstellungsverfahren oder einem Umwelt- oder Nahrungsstatus. Epitope können auch mindestens ein Teil von therapeutisch relevanten Molekülen sein, d.h. Moleküle, die von der spezifischen Bindungsdomäne angesteuert werden können, was den Verlauf der Krankheit ändert.

Bevorzugte "Allergene, Tumor assoziierte Antigene, Selbstantigene, Enzyme, Fc-Rezeptoren, Proteine des Komplementsystems, Serummoleküle, bakterielle Antigene, pilzliche Antigene, einzellige Antigene und virale Antigene" sind jene Allergene oder Antigene, die bereits gezeigt haben oder zeigen können, dass sie immunologisch oder therapeutisch wirksam sind, speziell solche, für die eine klinische Wirksamkeit bereits getestet wurde.

Gemäß einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung können weitere Bindungsfähigkeiten in die Strukturschleifenregionen der Polypeptide der T-Zellrezeptordomänen eingeführt werden, z. B. Bindungsfähigkeiten für kleine Moleküle, für Medikamente oder Enzyme, katalytische Stellen von Enzymen oder Enzymsubstraten oder die Bindung an ein Analoges eines Übergangszustands eines Enzymsubstrats.

Vorzugsweise ist die neue Antigenbindungsstelle in den Strukturschleifen dem unveränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptid fremd. Somit sind fremde Zielmoleküle wie Effektormoleküle, Serumproteine oder Fc-Rezeptoren oder Zelloberflächenrezeptoren als Bindungspartner des erfindungsgemäßen T-Zellrezeptordomänenpolypeptids bevorzugt.

Wie hierin verwendet bezieht sich die Bezeichnung "bindet spezifisch" oder "spezifische Bindung" auf eine Bindungsreaktion, die bestimmend für den passenden Liganden von Interesse in einer heterogenen Population von Molekülen ist. Unter kennzeichnenden Bedingungen (z.B. Immunnachweisverfahrensbedingungen) bindet das spezielle T-Zellrezeptordomänenpolypeptid somit an dessen besonderes "Zielmolekül" und bindet nicht in maßgeblicher Menge an andere in einer Probe vorhandenen Moleküle.

Die Bezeichnung "Expressionssystem" bezieht sich auf Nukleinsäuremoleküle, die eine gewünschte kodierende Sequenz und Kontrollsequenzen in operativer Verbindung enthalten, so dass Wirte, die mit diesen Sequenzen transformiert oder transfiziert sind, zur Produktion der kodierten Proteine befähigt sind. Um eine Transformation zu bewirken kann das Expressionssystem von einem Vektor umfasst werden; die relevante DNS kann dann jedoch auch in das Wirtschromosom eingebaut werden. Alternativ kann ein Expressionssystem zur in vitro

Transkription/Translation verwendet werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Polypeptid der TCR Domäne humanen oder tierischen Ursprungs, vorzugsweise vom Kamel, Kaninchen, Huhn, Ratte, Hund, Pferd, Schaf oder Maus.

Da das veränderte T-Zellrezeptorpolypeptid für verschiedene Zwecke verwendet werden kann, im besonderen in pharmazeutischen Zusammensetzungen, ist das T-Zellrezeptordomänenpolypeptid bevorzugt humanen oder murinen Ursprungs. Selbstverständlich kann das veränderte Polypeptid des T-Zellrezeptors auch ein humanisiertes oder chimäres T-Zellrezeptordomänenpolypeptid sein. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid humanen Ursprungs oder eine humanisierte Form eines T-Zellrezeptordomänenpolypeptids aus beliebiger Spezies.

Die Strukturschleifenregionen einer variablen Domäne des T-Zellrezeptors sind vorzugsweise aus Strukturschleifen ausgewählt, die die Aminosäuren 11 bis 19, Aminosäuren 43 bis 51, Aminosäuren 67 bis 80 oder Aminosäuren 90 bis 99 enthalten, wobei die Nummerierung die des IMGT ist.

Die Strukturschleifenregionen eines Polypeptids der konstanten Domäne des T-Zellrezeptors sind vorzugsweise aus Strukturschleifen ausgewählt, die die Aminosäuren 9 bis 20, Aminosäuren 27 bis 36, Aminosäuren 41 bis 78, Aminosäuren 82 bis 85, Aminosäuren 90 bis 102 oder Aminosäuren 107 bis 116 enthalten, wobei die Nummerierung der Aminosäureposition der Domänen die des IMGT ist.

Vorzugsweise sind die neuen Antigenbindungsstellen in den Strukturschleifen in T-Zellrezeptordomänenpolypeptiden, kodiert durch ausgewählte Nukleinsäuren, durch Substitution, Deletion und/oder Insertion von mindestens einem Nukleotid eingeführt.

Entsprechend einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung resultiert die Veränderung von mindestens einem Nukleotid in mindestens einer Strukturschleifenregion in einer Substitution, Deletion und/oder Insertion im T-Zellenrezeptordomänenpolypeptid die durch die Nukleinsäure kodiert wird.

Die Veränderung der mindestens einen Schleifenregion des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids kann zu einer Substitution, Deletion und/oder Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren, vorzugsweise Punktmutationen, Austausch von Aminosäuren ganzer Schleifen, weiter bevorzugt die Änderung von mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, bis zu 30 Aminosäuren führen.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Einführung von Veränderungen ist die ortsgerichtete Zufallsmutation. Mit diesem Verfahren werden zwei oder mehrere spezifischen Aminosäurereste der Schleifen unter Verwendung von zufällig generierten Einfügungen in diesen Strukturschleifen ausgetauscht oder eingeführt. Alternativ bevorzugt ist die Verwendung von Kombinationsansätzen.

Die mindestens eine Region ist vorzugsweise durch Zufalls-, Semizufalls- oder, im besonderen, durch ortsgerichtete Zufallsmutagenese-Verfahren mutiert oder verändert.

In einer anderen vorzugsweisen Ausführungsform sind mindestens zwei, in einer anderen bevorzugten Ausführungsform mindestens drei Strukturschleifenregionen eines T-Zellrezeptordomänenpolypeptids durch Zufalls-, Semizufalls- oder, im besonderen, durch zielgerichtete Zufallsmutagenese-Verfahren mutiert oder verändert.

Diese Verfahren können dazu verwendet werden, um Aminosäureveränderungen an gewünschten Positionen des erfindungsgemäßen T-Zellrezeptordomänenpolypeptids zu machen. In

diesen Fällen werden die Positionen zufällig ausgewählt oder die Änderungen der Aminosäuren werden unter Verwendung bestimmter Regeln gemacht. Beispielsweise können bestimmte Reste zu irgendeiner Aminosäure mutiert werden, während andere Reste zu einer ausgewählten Auswahl von Aminosäuren mutiert werden können. Das kann durch eine schrittweise Art durch abwechselnde Zyklen von Mutation und Selektion oder gleichzeitig erfolgen.

Ein vorzugsweises Verfahren gemäß der Erfindung verweist auf ein zufällig verändertes Nukleinsäuremolekül, das für ein T-Zellenrezeptordomänenpolypeptid kodiert, umfassend mindestens eine Nukleotid wiederholende Einheit innerhalb einer Region die für eine Strukturschleife kodiert, welche die Sequenz 5'- NNS -3', 5'- NNN -3' oder 5'- NNK -3' aufweist. In einigen Ausführungsformen umfasst die veränderte Nukleinsäure Kodons ausgewählt aus der Gruppe von TMT, WMT, RMC, RMG, MRT, SRC, KMT, RST, YMT, MKC, RSA, RRC, NNK, NNN, NNS oder eine beliebige Kombination davon (die Kodierung erfolgt gemäß IUPAC).

Das zufällig veränderte Nukleinsäuremolekül kann die oben angegebenen Wiederholungseinheiten umfassen, die für sämtliche bekannten natürlicherweise vorkommenden Aminosäuren oder eine Teilmenge davon kodieren.

Die Veränderung des Nukleinsäuremoleküls kann durch Einführung synthetischer Oligonukleotide in ein größeres Nukleinsäuresegment oder durch de novo Synthese eines vollständigen Nukleinsäuremoleküls ausgeführt werden. Die Synthese der Nukleinsäure kann mit Trinukleotid-Bausteinen ausgeführt werden, welche die Zahl von Unsinn-Sequenzkombinationen verringern würden, wenn eine Teilmenge von Aminosäuren kodiert werden soll (z.B. Yanez et al. *Nucleic Acids Res.* (2004) 32: e158; Virnekas et al. *Nucleic Acids Res.* (1994) 22: 5600-5607).

Vorzugsweise sind die zu verändernden Stellen an der Oberfläche präsentierte Aminosäuren. Eine Oberflächenpräsentation von Aminosäuren von Strukturschleifen kann aus bekannten Proteinstrukturen von T-Zellrezeptordomänenpolypeptiden eingeschätzt werden und durch Analogie (Homologie) für solche Aminosäuren, für die keine experimentell bestimmte Struktur erhältlich ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen die in die mindestens eine Strukturschleife eingeführten Veränderungen mindestens 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 Aminosäuren, die nicht natürlicherweise an der jeweiligen Stelle der Strukturschleife des nicht veränderten Polypeptids der T-Zellenrezeptordomäne vorkommen.

Die Veränderung von Aminosäuren kann vorzugsweise beeinflusst werden, um Aminosäuren in Strukturschleifenregionen einzuführen, für die bekannt ist, dass sie regelmäßig an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind (z.B. Lea & Stewart (1995) *FASEB J.* 9: 87-93; Fellhouse et al. (2006) *J Mol Biol.* 357: 100-114; Adib-Conquy et al. (1998) *International Immunology* 10: 341-346; Lo Conte et al. (1999) *J Mol Biol.* 285: 2177-2198; Zemlin et al. (2003) *J Mol Biol.* 334: 733-749).

In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Bibliothek von Polypeptidvarianten, die T-Zellrezeptordomänenpolypeptide gemäß der Erfindung als Selektionspool verwendet, wobei die Veränderungen mindestens eine, besonders bevorzugt mindestens zwei Aminosäuren pro veränderter Strukturschleife bevorzugt aus der Gruppe der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Isoleucin, Serin, Methionin, Alanin und Asparagin enthalten oder einführen.

Die Veränderung der Strukturschleife des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids gemäß der vorliegenden Erfindung ist vorzugsweise eine Deletion, Substitution oder eine Insertion von einer oder mehreren Aminosäuren.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sind mindestens 1, vorzugsweise mindestens 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10 und bis zu 30 Aminosäuren deletiert, mit anderen Aminosäuren substituiert (auch mit veränderten Aminosäuren) oder in die Strukturschleifenregion des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids inseriert. Allerdings soll die Höchstzahl der in die Strukturschleifenregion eines T-Zellrezeptordomänenpolypeptids inserierten Aminosäuren die Zahl von 30, vorzugsweise 25, mehr bevorzugt 20 Aminosäuren nicht übersteigen.

Wie im Stand der Technik hinlänglich bekannt, gibt es eine Vielzahl von Selektionstechnologien, die für die Identifizierung und Isolierung von Proteinen mit bestimmten Bindungsmerkmalen und Affinitäten verwendet werden können, die beispielsweise Präsentationstechnologien wie etwa Phagenpräsentation, Ribosomenpräsentation, Zelloberflächenpräsentation und ähnliche, wie unten beschrieben umfassen. Verfahren für die Herstellung und das Screening von TCR Varianten sind im Stand der Technik gut bekannt.

Die Nukleinsäuremoleküle die für die T-Zellenrezeptordomänenpolypeptide (und in der gesamten Beschreibung unten immer mitumfasst: T-Zellrezeptoren und T-Zellrezeptorfragmente enthaltend ein verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid) können in Wirtszellen kloniert werden, die exprimiert und deren Bindungsspezifitäten nachgewiesen wurden. Diese Vorgehensweisen werden unter Verwendung hinlänglich bekannter Verfahren durchgeführt, und eine Vielzahl von Methoden, die in der vorliegenden Anmeldung Verwendung finden können, werden in Molecular Cloning--A Laboratory Manual, 3.sup.rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001) sowie Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) beschrieben. Die Nukleinsäuren die für die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung kodieren, können in einen Expressionsvektor eingefügt werden, um die Polypeptide der T-Zellenrezeptordomäne zu exprimieren. Expressionsvektoren umfassen typischerweise ein Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne, das in operativer Weise - das heisst, in einem funktionellen Verhältnis positioniert - mit Kontroll- oder regulatorischen Sequenzen, selektierbaren Markern, beliebigen Fusionspartnern und/oder zusätzlichen Elementen verbunden ist. Die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung können durch Kultivierung einer mit einer Nukleinsäure, vorzugsweise einem Expressionsvektor, der eine Nukleinsäure enthält, die für das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid kodiert, transformierten Wirtszelle unter den geeigneten Bedingungen zur Induktion oder Hervorrufung der Expression der veränderten T-Zellrezeptordomäne hergestellt werden. Die Verfahren zur Einführung exogener Nukleinsäuremoleküle in eine Wirtszelle sind im Stand der Technik hinlänglich bekannt und variieren je nach dem verwendeten Wirt. Es können selbstverständlich ebenso nicht-zelluläre oder zellfreie Expressionssysteme für die Expression veränderter T-Zellrezeptordomänenpolypeptide eingesetzt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide nach der Expression aufgereinigt oder isoliert. Veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptide können auf eine Vielzahl dem Fachmann bekannter Weisen isoliert oder aufgereinigt werden. Übliche Aufreinigungsverfahren umfassen chromatographische Techniken, elektrophoretische, immunologische, Präzipitations-, Dialyse-, Filtrations-, Konzentrations- und chromatographische Fokussierungstechniken. Die Aufreinigung kann häufig durch einen bestimmten Fusionspartner ermöglicht werden. Beispielsweise können TCRs unter Verwendung eines Glutathionharzes aufgereinigt werden, wenn eine GST-Fusion eingesetzt wird, einer Ni^{2+} -Affinitätschromatographie, wenn ein His-Tag eingesetzt wird oder eines immobilisierten Anti-flag Antikörpers, wenn ein Flag-Tag verwendet wird. Für eine allgemeine Anleitung in geeigneten Aufreinigungstechniken siehe z.B. Scopes, "Protein Purification: Principles and Practice", 1994, 3. Auflage, Springer-Science and Business Media Inc., NY oder Roe, "Protein Purification Techniques: A Practical Approach", 2001, Oxford University Press. Es ist selbstverständlich ebenso möglich das erfindungsgemäße veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid auf der Oberfläche eines Wirts zu exprimieren, insbesondere auf der Oberfläche einer bakteriellen, Insekten- oder Hefezelle oder auf der Oberfläche von Phagen oder Viren.

Veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der Erfindung können unter Verwendung einer Vielzahl von Methoden gescreent werden, einschließlich aber nicht beschränkt auf solche, die in vitro Nachweisverfahren, in vivo Nachweisverfahren und Nachweisverfahren auf Zellbasis sowie Selektionstechnologien verwenden. Automatisierte Screeningtechnologien und solche mit hohem Durchsatz können in den Screeningverfahren eingesetzt werden. Das Screening kann die Verwendung eines Fusionspartners oder einer Markierung einsetzen, beispielsweise eines Enzyms, einer Immunmarkierung, einer isotopischen Markierung oder einer Markierung mit einem kleinen Molekül, wie etwa einem fluoreszierenden oder kalorimetrischen Farbstoff oder einem luminogenen Molekül.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die funktionellen oder biophysikalischen Eigenschaften der T-Zellrezeptordomänenpolypeptide in einem in vitro Nachweisverfahren gescreent. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der TCR auf Funktionalität hin gescreent, beispielsweise seine Fähigkeit, eine Reaktion zu katalysieren oder seine Bindungsspezifität, Kreuzreaktivität und/oder seine Affinität mit dem Zielmolekül.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können die vorteilhaften veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide in vivo selektiert werden, z.B. durch Einführung dieser in eine Zelle oder einen Organismus. Die spezifisch bindenden Varianten können entweder aus Körperflüssigkeit wie etwa Blut oder lymphatischer Flüssigkeit oder aus besonderen Organen isoliert werden, in Abhängigkeit von den erforderlichen Eigenschaften der veränderten Domänen.

Nachweisverfahren können eine Vielzahl von Nachweismethoden einsetzen, einschließlich aber nicht begrenzt auf chromogene, fluoreszierende, luminisierende oder isotopische Markierungen.

Wie im Stand der Technik bekannt, selektieren einige Screeningverfahren auf vorteilhafte Mitglieder einer Biobibliothek. Die Verfahren werden hierin als "Selektionsverfahren" bezeichnet, und diese Verfahren finden in der vorliegenden Erfindung zum Screening veränderter T-Zellrezeptordomänenpolypeptide Verwendung. Wenn Bibliotheken von Varianten von T-Zellrezeptordomänenpolypeptiden unter Verwendung eines Selektionsverfahrens gescreent werden, werden nur solche Mitglieder einer Bibliothek, die vorteilhaft sind, das heißt, die einige Selektionskriterien erfüllen, vermehrt, isoliert und/oder beobachtet. Wie geschätzt werden wird, da nur die tauglichsten Varianten beobachtet werden, erlauben solche Verfahren die Durchforstung von Bibliotheken, welche größer als solche sind, welche die Tauglichkeit von Bibliotheksmitgliedern individuell nachweisen. Die Selektion wird durch jedes beliebige Verfahren, jede Technik oder jeden Fusionspartner ermöglicht, welche, kovalent oder nicht kovalent, den Phänotyp des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids mit dessen Genotyp verbinden, das heißt die Funktion eines mit der Nukleinsäure, welche für diesen kodiert. Beispielsweise wird die Verwendung einer Phagenpräsentation als Selektionsverfahren durch die Fusion von Bibliotheksmitgliedern an ein Phagenhüllprotein ermöglicht. Am häufigsten wird das Protein des Gens III eines filamentösen Phagen verwendet, es können allerdings auch andere Hüllproteine wie etwa Protein VIII, Protein VII, Protein VI und Protein IX verwendet. Auf diese Weise selektiert oder isoliert die Selektion oder Isolation veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptide, welche einige Kriterien erfüllen, beispielsweise die Bindungsaffinität gegenüber dem Zielmolekül des Polypeptids der T-Zellenrezeptordomäne, ebenso die Nukleinsäure, welche für diese kodiert. Einmal isoliert können das Gen oder die Gene, welche für die veränderten Polypeptide der T-Zellenrezeptordomäne kodieren, amplifiziert werden. Dieses Verfahren der Isolierung und Amplifikation, als Panning bezeichnet, kann wiederholt werden, wobei die Anreicherung von vorteilhaften Varianten von T-Zellrezeptordomänenpolypeptiden in der Bibliothek ermöglicht wird. Die Nukleinsäuresequenzierung der angehefteten Nukleinsäure gestattet schließlich die Identifikation des Gens.

Im Stand der Technik sind eine Vielzahl von Verfahren bekannt, die in der vorliegenden Erfindung zum Screening von Bibliotheken von T-Zellenrezeptordomänenpolypeptiden Anwendung finden können (WO04044004A2, WO05116646A1 and WO9839482A1; Dunn et al. (2006) Protein Sci. 15:710-721; Richmann et al. (2006) Protein Eng Des Sel. 19:255-264). Diese um-

fassen, sind aber nicht beschränkt auf alle Techniken die für die Selektion von spezifischen Antikörpern und Peptiden wie Phagenpräsentation verwendet werden (Phage display of peptides and antibodies: a laboratory manual, Kay et al., 1996, Academic Press, San Diego, Calif., 1996; Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10838; Smith, 1985, Science 228: 1315-1317) und dessen Abarten wie etwa selektive Phageninfektion (Malmborg et al., 1997, J Mol Biol. 273: 544-551), selektiv infizierender Phage (Krebber et al., 1997, J Mol Biol. 268: 619-630) und Panning mit verzögerter Infektivität (Benhar et al., 2000, J Mol Biol. 301: 893-904), Zelloberflächenpräsentation (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol., 12: 395-399) wie etwa Präsentation auf Bakterien-(Georgiou et al., 1997, Nat Biotechnol. 15: 29-34; Georgiou et al., 1993, Trends Biotechnol. 11: 6-10; Lee et al., 2000, Nat Biotechnol. 18: 645-648; Jun et al., 1998, Nat Biotechnol. 16: 576-80), Hefe- (Boder & Wittrup, 2000, Methods Enzymol. 328: 430-44; Boder & Wittrup, 1997, Nat Biotechnol. 15: 553-557) und Säugetierzellen (Whitehorn et al., 1995, Bio/technology 13: 1215-1219) sowie in vitro Präsentationstechniken (Amstutz et al., 2001, Curr Opin Biotechnol. 12: 400-405) wie etwa Polysomenpräsentation (Mattheakis et al., 1994, Proc Natl Acad Sci. USA 91: 9022-9026), Ribosomenpräsentation (Hanes et al., 1997, Proc Natl Acad Sci. USA 94: 4937-4942), mRNA Präsentation (Roberts & Szostak, 1997, Proc Natl Acad Sci. USA 94: 12297-12302; Nemoto et al., 1997, FEBS Lett. 414: 405-408) und das Ribosomeninaktivierungs-Präsentationssystem (Zhou et al., 2002, J Am Chem Soc. 124, 538-543).

Weitere Selektionsverfahren, die in der vorliegenden Erfindung Verwendung finden können, umfassen Verfahren, die nicht auf Präsentation beruhen, wie etwa in vivo Verfahren einschließlich aber nicht beschränkt auf periplasmatische Expression und cytometrisches Screening (Chen et al., 2001, Nat Biotechnol. 19: 537-542), den Antikörperfragment-Komplementierungsnachweis (Johnsson & Varshavsky, 1994, Proc Natl Acad Sci. USA 91: 10340-10344; Pelletier et al., 1998, Proc Natl Acad Sci. USA 95: 12141-12146) und das Two-Hybrid-Screening in Hefe (Fields & Song, 1989, Nature 340: 245-246) verwendet im Selektionsmodus (Visintin et al., 1999, Proc Natl Acad Sci. USA 96: 11723-11728). In einer alternativen Ausführungsform wird die Selektion durch einen Fusionspartner ermöglicht, der an eine spezifische Sequenz auf dem Expressionsvektor bindet, wodurch der Fusionspartner und das zugehörige Mitglied der T-Zellrezeptordomänenpolypeptid-Bibliothek kovalent oder nicht-kovalent mit der Nukleinsäure, welche für diese kodiert, verbunden werden. Beispielsweise beschreibt WO9308278 einen solchen Fusionspartner und eine Technik, die in der vorliegenden Erfindung Verwendung finden können. In einer alternativen Ausführungsform kann es zu einer in vivo Selektion kommen, wenn die Expression des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids der Zelle irgendeinen Wachstums-, Reproduktions- oder Überlebensvorteil vermittelt.

Einige Selektionsverfahren werden als "gerichtete Evolutionsverfahren" bezeichnet. Diese Verfahren umfassen das Paaren oder Hervorbringen von bevorzugten Sequenzen während der Selektion, manchmal unter Einfügung von neuen Mutationen. Wie vom Fachmann geschätzt werden wird, können die gerichteten Evolutionsverfahren die Identifizierung der am meisten bevorzugten Sequenzen in einer Vielzahl von Polypeptiden erleichtern und kann die Verschiedenartigkeit der gescreenten Sequenzen erhöhen. Im Stand der Technik sind eine Anzahl gerichteter Evolutionsverfahren bekannt, welche in der vorliegenden Erfindung zur Erzeugung und zum Screening von T-Zellrezeptordomänenpolypeptiden Anwendung finden können, einschließlich aber nicht beschränkt auf DNA-Shuffling (PCT WO00/42561; PCT WO01/70947), Exon-Shuffling (Kolkman & Stemmer, 2001, Nat Biotechnol. 19: 423-428), Familien-Shuffling (Cramer et al., 1998, Nature 391: 288-291), selektive kombinatorische Randomisierung (WO03012100; WO04018674A1), zufällige Erzeugung von Chimären auf transienten Vorlagen (Coco et al., 2001, Nat Biotechnol. 19: 354-359), molekulare Evolution durch "staggered extension process" (StEP) in vitro Rekombination (Zhao et al., 1998, Nat Biotechnol. 16: 258-261; Shao et al., 1998, Nucleic Acid Res. 26: 681-683), Exonuklease vermittelter Genaufbau (U.S. Patentschrift Nr. 6,352,842; U.S. Patentschrift Nr. 6,361,974), Genort Sättigungsmutagenese (U.S. Patentschrift Nr. 6,358,709), Genwiederaufbau (U.S. Patentschrift Nr. 6,358,709), SCRATCHY (Lutz et al., 2001, Proc Natl Acad Sci. USA 98: 11248-11253), DNS Fragmentierungsverfahren (Kikuchi et al., Gene 236: 159-167), einzelsträngiges DNS-Shuffling (Kikuchi et

al., 2000, Gene 243: 133-137 sowie die Antikörpermanipulationstechnologie durch direkte Evolution (Angewandte Molekulare Evolution) (U.S. Patentschrift Nr. 5,824,514; U.S. Patentschrift Nr. 5,817,483; U.S. Patentschrift Nr. 5,814,476; U.S. Patentschrift Nr. 5,763,192; U.S. Patentschrift Nr. 5,723,323.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform werden Varianten der T-Zellrezeptordomänenpolypeptide unter Verwendung von einem oder mehreren auf Zellen basierenden oder in vivo Nachweisverfahren gescreent. Bei solchen Nachweisverfahren werden typischerweise aufgereinigte oder nicht-aufgereinigte veränderte T-Zellenrezeptordomänenpolypeptide von außen
10 zugegeben, so dass Zellen individuellen Polypeptiden der T-Zellenrezeptordomäne oder Pools von veränderten Polypeptiden der T-Zellenrezeptordomänen, die zu einer Bibliothek gehören, ausgesetzt sind. Diese Nachweisverfahren beruhen typischerweise, aber nicht immer, auf der gewünschten Funktion des T-Zellenrezeptordomänenpolypeptids, das heisst, der Fähigkeit des erfindungsgemäß veränderten Polypeptids der T-Zellenrezeptordomäne, an sein Zielmolekül zu
15 binden und ein biochemisches Ereignis zu vermitteln, beispielsweise eine Effektorfunktion, Serumhalbwertszeit, Liganden/Rezeptor Bindungshemmung, Apoptose und ähnliche. Solche Nachweisverfahren umfassen oftmals die Überwachung der Zellantwort auf das Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne, beispielsweise das Überleben der Zelle, den Zelltod, die Veränderung in der zellulären Morphologie oder die transkriptionelle Aktivierung, wie etwa die zelluläre Expression eines natürlichen Gens oder eines Reportergens. Solche Nachweisverfahren können
20 beispielsweise die Fähigkeit von T-Zellrezeptordomänenpolypeptids messen, ADCC, ADCP oder CDC hervorzurufen. Bei einigen Nachweisverfahren kann es erforderlich sein, zusätzliche Zellen oder Bestandteile hinzuzufügen, das heisst zusätzlich zu den Zielzellen, beispielsweise Serumkomplement- oder Effektorzellen wie etwa periphere Blutmonozyten (PBMCs), NK Zellen, Makrophagen und ähnliche. Solche zusätzlichen Zellen können von einem beliebigen Organismus stammen, vorzugsweise vom Menschen, Mäusen, der Ratte, dem Kaninchen und dem Affen. T-Zellrezeptordomänenpolypeptide können die Apoptose bestimmter Zelllinien verursachen, welche das Zielmolekül exprimieren, oder sie können den Angriff auf Zielzellen durch Immunzellen vermitteln, welche dem Nachweisverfahren zugegeben wurden. Verfahren zur
30 Überwachung von Zelltod oder -lebensfähigkeit sind im Stand der Technik bekannt und umfassen die Verwendung von Farbstoffen, immunchemischen, zytochemischen und radioaktiven Reagenzien. Beispielsweise können Caspase-Färbungsnachweise die Messung von Apoptose ermöglichen, und die Aufnahme oder Freisetzung von radioaktiven Substraten oder fluoreszierenden Farbstoffen können es ermöglichen, das Zellwachstum oder die Zellaktivierung zu überwachen. Alternativ können tote oder beschädigte Zellen durch Messung der Freisetzung eines
35 oder mehrerer natürlicher intrazellulärer Bestandteile überwacht werden, z.B. der Lactatdehydrogenase. Die transkriptionelle Aktivierung kann auch als ein Verfahren zum Nachweis der Funktion in Nachweisverfahren auf Zellbasis dienen. In diesem Fall kann die Antwort durch Nachweis von natürlichen Genen überwacht werden, welche aufreguliert sein können, beispielsweise kann die Freisetzung bestimmter Interleukine gemessen werden oder alternativ kann die Auswertung durch ein Reportersystem erfolgen. Nachweisverfahren auf Zellbasis können auch die Messung morphologischer Veränderungen von Zellen als Antwort auf die Anwesenheit veränderter T-Zellrezeptordomänenpolypeptide umfassen. Die Zelltypen für solche Nachweisverfahren können prokaryotisch oder eukaryotisch sein, und es kann eine Anzahl von
45 im Stand der Technik bekannten Zelllinien eingesetzt werden.

Alternativ können Screeningverfahren auf Zellbasis durchgeführt werden unter Verwendung von Zellen, die mit Nukleinsäuren transformiert oder transfiziert wurden, welche für die Varianten von Polypeptiden der T-Zellenrezeptordomäne kodieren. In diesem Fall werden die Varianten
50 Polypeptide der T-Zellenrezeptordomäne den Zellen nicht von aussen zugegeben (z.B. analog zu Auf der Maur, 2004, Methods 34: 215-224). In einem weiteren alternativen Verfahren nützt das Screening auf Zellbasis die Zelloberflächenpräsentation. Es kann ein Fusionspartner eingesetzt werden, welcher die Präsentation veränderter Polypeptide der T-Zellenrezeptordomäne auf der Oberfläche von Zellen ermöglicht (wie für Antikörper gezeigt: Witrup, 2001, Curr Opin Biotechnol. 12: 395-399).

In einer bevorzugten Ausführungsform kann die Immunogenität der veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide experimentell bestimmt werden unter Verwendung eines oder mehrerer immunologischer oder auf Zellen basierender Nachweisverfahren (z.B. Koren et al., 2002, Current Pharmaceutical Biotechnology 3: 349-360; Chirino et al., 2004, Drug Discovery Today 9: 82-90; Tangri et al., 2005, J Immunol. 174: 3187-3196; Hermeling et al., 2004, Pharm Res. 21: 897-903). In einer bevorzugten Ausführungsform werden ex vivo T-Zellaktivierungs-Nachweisverfahren verwendet, um die Immunogenität experimentell zu quantifizieren. Bei diesem Verfahren werden Antigen-präsentierende Zellen und naive T-Zellen von passenden Spendern mit einem Peptid oder einem ganzen Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne des Interesses ein oder mehrere Male herausgefordert. Die T-Zellaktivierung kann unter Verwendung einer Anzahl von Verfahren nachgewiesen werden, z.B. durch Überwachung der Cytokinfreisetzung oder Messung der Aufnahme von Tritium-markiertem Thymidin. In bevorzugten Ausführungsformen wird die LUMINEX Technologie zur Messung der Cytokinfreisetzung verwendet (z.B. de Jager et al., Clin Diagn Lab Immunol., 2003, 10: 133-139), oder die Herstellung von Interferon gamma wird unter Verwendung von Elispot Nachweisverfahren überwacht (Schmitt et al., 2000, J Immunol Meth., 24: 17-24).

Die biologischen Eigenschaften der veränderten Polypeptide der T-Zellenrezeptordomäne der vorliegenden Erfindung können in Zell-, Gewebs- und Gesamtorganismusexperimenten gekennzeichnet werden. Wie im Stand der Technik bekannt, werden Medikamente häufig an Tieren getestet, einschließlich aber nicht beschränkt auf Mäuse, Ratten, Kaninchen, Hunden, Katzen, Schweine und Affen, um die Wirksamkeit eines Medikaments zur Behandlung gegen eine Krankheit oder ein Krankheitsmodell zu messen oder die pharmakokinetischen Eigenschaften, die Toxizität und weitere Eigenschaften eines Medikaments zu messen. Die Tiere können als Krankheitsmodelle bezeichnet werden. Therapeutika werden häufig an Mäusen getestet, einschließlich aber nicht beschränkt auf nackte Mäuse, SCID Mäuse, Xenograft-Mäuse und transgene Mäusen (einschließlich genetischer Knock-in und Knock-out Mutanten). Solche Experimente können aussagekräftige Daten zur Bestimmung des Potentials der Polypeptidvariante, als Therapeutikum verwendet zu werden, bereitstellen. Es kann jeder beliebige Organismus, vorzugsweise Säugetiere, zum Testen verwendet werden. Auf Grund ihrer genetischen Ähnlichkeit mit Menschen, können Affen geeignete therapeutische Modelle sein und können somit verwendet werden, um die Wirksamkeit, Toxizität, pharmakokinetischen Eigenschaften oder eine weitere Eigenschaft der veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung zu testen. Das Testen von Medikamentenanwärtern an Menschen ist am häufigsten zur Zulassung von Therapeutika erforderlich, und somit werden diese Experimente selbstverständlich in Betracht gezogen. Die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung können folglich an Menschen getestet werden, um deren therapeutische Wirksamkeit, Toxizität, Immunogenität, pharmakokinetische Eigenschaften und/oder weitere klinische Eigenschaften zu bestimmen.

Die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung können in einem weiten Bereich von Produkten Anwendung finden. In einer Ausführungsform wird die Polypeptidvariante der T-Zellenrezeptordomäne der vorliegenden Erfindung zur Therapie oder Prophylaxe, zur präparativen oder analytischen Verwendung, als Diagnostikum, industrielle Verbindung oder ein Forschungsreagens, vorzugsweise als Therapeutikum verwendet. Die Polypeptidvariante der T-Zellenrezeptordomänen kann in einer T-Zellrezeptordomänenpolypeptid-Zusammensetzung Anwendung finden, die monoklonal, oligoklonal oder polyklonal ist. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung verwendet, um Zielzellen zu töten, welche das Zielantigen tragen, beispielsweise Krebszellen. In einer alternativen Ausführungsform werden die veränderten Polypeptide der T-Zellenrezeptordomäne der vorliegenden Erfindung verwendet, um das Zielantigen zu blockieren, diesem entgegen zu wirken oder mit diesem zu wirken, beispielsweise durch Entgegenwirken gegenüber einem Cytokin oder Cytokinrezeptor. In einer alternativ bevorzugten Ausführungsform werden die veränderten Polypeptide der T-Zellenrezeptordomäne der vorliegenden Erfindung verwendet, um das Zielantigen zu blockieren, diesem

entgegen zu wirken oder mit dem Zielantigen zu wirken und die Zielzellen zu töten, welche das Zielantigen tragen.

In einer alternativ bevorzugten Ausführungsform werden die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung verwendet, um Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren von Wachstumsfaktoren zu blockieren, diesen entgegen zu wirken oder mit diesen zu wirken und die Zielzellen zu töten, welche das Zielantigen tragen oder benötigen.

In einer alternativ bevorzugten Ausführungsform werden die veränderten Polypeptide der T-Zellenrezeptordomäne der vorliegenden Erfindung verwendet, um Enzyme oder Substrate von Enzymen zu blockieren, diesen entgegen zu wirken oder mit diesen zu wirken.

In einer weiteren alternativ bevorzugten Ausführungsform werden die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung verwendet, um infektiöse Agenzien, wie etwa Viren, Bakterien oder Pilze zu neutralisieren.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform zeigen die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung gesteigerte Serum Halbwertszeit.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform zeigen die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung Effektorfunktionsfähigkeiten.

Die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung können für zahlreiche therapeutische Zwecke verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein T-Zellrezeptor, welcher das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptide umfasst, einem Patienten verabreicht, um eine spezifische Erkrankung zu behandeln. Ein "Patient" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfasst sowohl Menschen als auch andere Tiere, vorzugsweise Säugetiere und besonders bevorzugt Menschen. Mit "spezifischer Erkrankung" wird hierin eine Erkrankung bezeichnet, die durch Zugabe einer pharmazeutischen Zusammensetzung, welche ein verändertes Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne der vorliegenden Erfindung umfasst, gelindert werden kann.

In einer Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid das einzige therapeutisch aktive Agens, das dem Patienten verabreicht wird. Alternativ wird das erfindungsgemäße veränderte T-Zellenrezeptordomänenpolypeptide in Kombination mit einem oder mehreren weiteren therapeutischen Agenzien verabreicht, einschließlich aber nicht beschränkt auf cytotoxische Agenzien, chemotherapeutische Agenzien, Cytokine, wachstumshemmende Agenzien, anti-hormonelle Agenzien, Kinasehemmer, anti-angiogenetische Agenzien, cardioprotektive Mittel oder weitere therapeutische Agenzien. Das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid kann gleichzeitig mit einem oder mehreren anderen therapeutischen Diäten verabreicht werden. Beispielsweise kann eine Variante des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids der vorliegenden Erfindung gemeinsam mit Chemotherapie, Strahlungs-therapie oder sowohl Chemotherapie als auch Strahlungstherapie formuliert und dem Patienten verabreicht werden. In einer Ausführungsform kann das veränderte Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne der vorliegenden Erfindung in Verbindung mit einem oder mehreren Antikörpern verabreicht werden. Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können das veränderte Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne der vorliegenden Erfindung sowie ein oder mehrere weitere Anti-Krebstherapien zur Behandlung von Krebszellen ex vivo eingesetzt werden. Es wird in Betracht gezogen, dass eine solche ex vivo Behandlung zur Knochenmarkstransplantation und insbesondere zur autologen Knochenmarkstransplantation nützlich sein kann. Es wird selbstverständlich in Betracht gezogen, dass das Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne der Erfindung in Kombination mit darüber hinaus weiteren therapeutischen Techniken, wie etwa der Chirurgie, eingesetzt werden können.

Eine Vielzahl weiterer therapeutischer Agenzien können zur Verabreichung mit den veränderten

T-Zellenrezeptordomänenpolypeptiden der vorliegenden Erfindung Verwendung finden. In einer Ausführungsform wird das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid mit einem anti-angiogenetischen Agens verabreicht, das eine Verbindung darstellt, welche die Entwicklung von Blutgefäßen blockiert oder diese zu einem gewissen Grade beeinträchtigt. Der anti-angiogenetische Faktor kann beispielsweise ein kleines Molekül oder ein Protein, zum Beispiel ein Antikörper, eine Fc Fusion oder ein Cytokin sein, das an einen Wachstumsfaktor oder einen Rezeptor für einen Wachstumsfaktor bindet, der an der Förderung der Angiogenese beteiligt ist. Der hierin bevorzugte anti-angiogenetische Faktor ist ein Antikörper, der an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) bindet. In einer alternativen Ausführungsform wird das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid mit einem therapeutischen Agens verabreicht, das eine adaptive Immunantwort induziert oder erhöht, beispielsweise ein Antikörper, der CTLA-4 zum Ziel hat. In einer alternativen Ausführungsform wird das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid mit einem Tyrosinkinasehemmer verabreicht, wobei es sich um ein Molekül handelt, das zu einem gewissen Grade die Tyrosinkinaseaktivität einer Tyrosinkinase hemmt. In einer alternativen Ausführungsform werden die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der vorliegenden Erfindung mit einem Cytokin verabreicht. Mit "Cytokin" wie hierin verwendet wird ein allgemeiner Begriff für Proteine bezeichnet, die von einer Zellpopulation freigesetzt und die auf eine andere Zelle als interzelluläre Botenstoffe, einschließlich Chemokine, wirken.

Es werden pharmazeutische Zusammensetzungen in Betracht gezogen, wobei veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptide der gleichen oder verschiedener Spezifitäten der vorliegenden Erfindung und ein oder mehrere therapeutisch aktive Agenzien formuliert werden. Formulierungen der Polypeptidvarianten der vorliegenden Erfindung werden zur Lagerung durch Mischen des veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids der vorliegenden Erfindung, welche den gewünschten Reinheitsgrad aufweisen, mit wahlweisen pharmazeutisch verträglichen Trägern, Bindemitteln oder Stabilisatoren (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980, 16. Auflage, Osol, A. Herausg.) in Form lyophilisierter Formulierungen oder wässriger Lösungen vorbereitet. Die zur in vivo Verabreichung zu verwendenden Formulierungen sind vorzugsweise steril. Dies wird in einfacher Weise durch Filtration über sterile Filtermembranen oder andere Verfahren erreicht. Die veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide und weitere hierin offenbarte therapeutisch aktive Agenzien können ebenso als Immunoliposomen und/oder in Mikrokapseln eingeschlossen formuliert werden.

Die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid der vorliegenden Erfindung umfasst, vorzugsweise in Form einer sterilen wässrigen Lösung, kann auf eine Vielzahl von Weisen durchgeführt werden, einschließlich aber nicht beschränkt auf oral, subkutan, intravenös, intranasal, intraotical, transdermal, topisch (z.B. Gele, Salben, Lotionen, Cremes etc.), intraperitoneal, intramuskulär, intrapulmonar, vaginal, parenteral, rektal oder intraocular.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Expressionssystem einen Vektor. Es kann jeder beliebige im Stand der Technik bekannte geeignete Expressionsvektor zu diesem Zweck geeigneterweise verwendet werden.

Das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid wird vorzugsweise in einer Wirtszelle exprimiert, vorzugsweise in einem Bakterium, in Hefe, in einer Pflanzenzelle, in einer Insektenzelle, in einer tierischen Zelle oder Säugetierzelle oder in einem Organ einer Pflanze oder eines Tieres oder in einer vollständigen Pflanze oder einem Tier.

Es kann eine große Vielzahl von geeigneten Wirtszellen zur Expression des veränderten Polypeptids der Erfindung verwendet werden, einschließlich aber nicht beschränkt auf Säugerzellen (tierische Zellen), Pflanzenzellen, Bakterien (z.B. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), Insektenzellen und Hefe (z.B. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*). Es werden beispielsweise eine Vielzahl von Zelllinien, die in der vorliegenden Erfindung Anwendung finden können, im ATCC Zelllinienkatalog beschrieben, der von der American Type Culture Collection erhältlich ist. Fer-

ner können ebenso Pflanzen und Tiere als Wirte zur Expression des erfindungsgemäßen T-Zell-rezeptordomänenpolypeptids verwendet werden. Die Expressions- ebenso wie die Transfektionsvektoren oder -kassetten können entsprechend des verwendeten Wirts gewählt werden.

Selbstverständlich können auch nicht-zelluläre oder zellfreie Proteinexpressionssysteme verwendet werden. In vitro Transkriptions/Translations-Proteinexpressionssysteme, die Protein in genügenden Mengen herstellen, bieten viele Vorteile einer zellfreien Proteinexpression, wodurch der Bedarf an mühsamen stromaufwärtigen und stromabwärtigen Schritten (z.B. Wirtszelltransformation, -kultur oder -lyse), die typischerweise mit Expressionssystemen auf Zellbasis verbunden sind, vermieden wird.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Moleküls, das ein Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne oder ein pharmazeutisches Präparat davon umfasst, das mindestens eine Veränderung einer strukturellen Schleifenregionen des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids umfasst und die Bestimmung der Bindung des Moleküls an ein Epitop eines Antigens, wobei das unveränderte Molekül im wesentlichen nicht an das Epitop bindet, welches die Schritte umfasst:

- Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptid kodiert, welche mindestens eine Strukturschleifenregion umfasst,
- Veränderung mindestens eines Nukleotidrests mindestens einer Strukturschleifenregionen,
- Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
- Expression des veränderten T-Zellenrezeptordomänenpolypeptids,
- Kontaktierung des exprimierten veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids mit einem Epitop,
- Bestimmung, ob das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid an das Epitop bindet sowie
- Bereitstellung des veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids, welches an das Epitop bindet und wahlweise Konfektionierung dessen zu einem pharmazeutischen Präparat.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines multispezifischen Moleküls, welches in spezifischer Weise an mindestens ein erstes Molekül bindet oder eine pharmazeutische Präparation davon, das mindestens eine Veränderung in jeder von mindestens einer Strukturschleifenregion eines T-Zellrezeptordomänenpolypeptids aufweist sowie Bestimmung der spezifischen Bindung der mindestens einen Schleifenregion an mindestens ein zweites, aus der Gruppe bestehend aus Allergenen, Tumor assoziierten Molekülen, Selbstantigenen, Enzymen, Fc-Rezeptoren, Proteinen des Komplementsystems, Serum-molekülen, bakteriellen Antigenen, pilzlichen Antigenen, einzelligen Antigenen und viralen Antigenen ausgewähltes Molekül, wobei das T-Zellenrezeptordomänenpolypeptid welche eine unveränderte Strukturschleifenregion enthält, nicht in spezifischer Weise an das mindestens eine zweite Molekül bindet, umfassend die Schritte:

- Bereitstellung einer Nukleinsäure, welche für ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptide kodiert, das spezifisch an mindestens ein erstes Molekül bindet, welches mindestens eine Strukturschleifenregion umfasst,
- Veränderung mindestens eines Nukleotidrests mindestens einer der Schleifenregionen, die von der Nukleinsäure kodiert werden,
- Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
- Expression des veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids,
- Kontaktierung des exprimierten veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids mit mindestens einem zweiten Molekül und
- Bestimmung, ob das veränderte T-Zellenrezeptordomänenpolypeptid spezifisch an das zweite Molekül bindet sowie
- Bereitstellung des veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids, welches spezifisch an das mindestens eine zweite Molekül bindet und wahlweise Konfektionierung dessen zu ei-

nem pharmazeutischen Präparat.

Ein TCR der vorliegenden Erfindung kann aus einer Alpha (oder einer Gamma) Kette und einer Beta (oder einer Delta) Kette bestehen, die zusammen eine an einen spezifischen Bindungspartner bindende variable Region bilden, und eine zweite Spezifität kann durch veränderte Strukturschleifen entweder der Alpha (oder Gamma) Kette oder der Beta (oder Delta) Kette der variablen oder konstanten Domäne gebildet werden.

Die Bindungsstelle kann auch durch mindestens eine oder mehr als eine nicht-CDR Schleifen auf zwei variablen oder konstanten Domänen (z.B. ein variable Domäne der schweren Kette und eine variable Domäne der leichten Kette die strukturell benachbart sind) gebildet werden.

Der veränderte T-Zellrezeptor oder das Derivat kann ein vollständiger T-Zellrezeptor oder ein T-Zellrezeptorfragment (z.B. lösliches TCR, einzelkettiges TCR) sein, das mindestens ein verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid enthält.

Er kann mono- oder multivalent an Bindungspartner binden oder sogar mit unterschiedlicher Valenz für die verschiedenen Bindungspartner, in Abhängigkeit vom Entwurf. Beispielsweise ein T-Zellrezeptorfragment oder, äquivalent dazu, ein scTCR kann in einer Weise manipuliert werden, dass die Strukturschleifen der beiden variablen Domänen getrennt manipuliert werden, um an dasselbe Epitop zu binden wie die durch die CDRs gebildete Bindungsstelle, resultierend in einem trivalenten T-Zellrezeptor oder entsprechend einem scTCR. Wenn beispielsweise die durch CDRs geformte natürliche Bindungsstelle ein anderes Zielepitop als die veränderten variablen Domänen erkennt, dann wird das resultierende TCR Fragment oder scTCR monovalent an das erste Ziel binden und bivalent an das zweite Ziel das unabhängig von den veränderten Strukturschleifen der variablen Domänen gebunden wird. Dieses Prinzip des Bausteinaufbaus kann auf verschiedene Arten angewendet werden wie dies für den Fachmann offensichtlich sein wird.

Da eine Anzahl von verschiedenen Strukturschleifen für die Selektion und den Entwurf einer spezifischen Bindungsstelle in den nicht-CDR Regionen der Alpha (Gamma) und Beta (Delta) Domänen verfügbar sind, ist es möglich, T-Zellrezeptorderivate mit sogar mehr als zwei Spezifitäten zu entwerfen. Zum Beispiel, Valpha und Vbeta Domänen, die ein erstes Ziel durch ihre CDRS erkennen, können getrennt manipuliert werden, um spezifisch an verschiedene (zweite und dritte) Ziele zu binden, die durch Interaktionen der veränderten Strukturschleifen in der entsprechenden variablen Domäne vermittelt wurden. Dadurch kann ein trispezifischer T-Zellrezeptor oder ein Fragment davon, wie ein einzelkettiger T-Zellrezeptor, der monovalent an jedes seiner verschiedenen Ziele bindet, gebildet werden.

Die spezifischen Bindungsdomänen innerhalb einer Polypeptidkette können mit oder ohne einem Peptidlinker verbunden werden und müssen nicht notwendigerweise in der natürlichen Ordnung sein.

Weder konstante noch variable Domänen der T-Zellrezeptoren vermitteln Effektorfunktionen, was der Grund dafür ist, weshalb T-Zellrezeptorfragmente keine ADCC, ADCP oder CDC zeigen. Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, eine T-Zellrezeptorbindung an Effektormoleküle wie Fc Rezeptoren und Komplementproteine zu entwickeln. Veränderte Schleifen in den T-Zellrezeptordomänen können aus einer Bibliothek von veränderten Schleifenstrukturen ausgewählt werden oder entwickelt werden, um an ein oder mehrere Effektormoleküle zu binden. Ein T-Zellrezeptor oder dessen Fragment mit solchen Effektormolekülbindungsstellen könnte Antikörper-ähnliche Effektorfunktionen ermöglichen, und könnte, abhängig von den Anforderungen, mit schwacher oder starker ACC und ADCP und/oder Komplementaktivierung entwickelt werden.

Um auf potentielle Effektorfunktionen solcher erfindungsgemäßer T-Zellrezeptordomänenpoly-

peptide zu selektieren, können Bibliotheken von Polypeptiden der T-Zellenrezeptordomänen auf die Bindung an Fc-Rezeptoren und/oder Komplementfaktoren wie etwa C1q selektiert werden. Fcgamma Rezeptoren für die Selektion können entweder auf der Oberfläche von Zellen, welche die entsprechenden Rezeptoren natürlicherweise exprimieren, bereitgestellt werden oder durch Expression und Aufreinigung des extrazellulären Anteils des entsprechenden Rezeptors. IFN-g stimulierte U937 Zellen (CRL-1503, American Type Culture Collection) können als Zielzellen zur Isolierung von durch Phagen präsentierte veränderte Polypeptide der T-Zellenrezeptordomäne verwendet werden, die spezifisch an den Hochaffinitäts-IgG-Rezeptor FcgammaRI binden (ähnlich zu Berntzen et al., 2006, Protein Eng Des Sel. 19(3): 121-8). Die Bindung an den Fc Rezeptor kann durch FACS unter Verwendung von U937 Zellen als Zielzellen getestet werden, die spezifisch mit ausgewählten veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptiden gefärbt werden. Ferner können die extrazellulären Domänen menschlicher Fcgamma Rezeptoren kloniert und als lösliche Proteine oder Fusionsproteine exprimiert werden und zur Analyse der spezifischen Bindung an potentielle Bindungspartner verwendet werden (z.B. wie in Berntzen et al., 2005, J Immunol Methods 298(1-2): 93-104). Die Identifizierung und Charakterisierung veränderter Polypeptide der T-Zellenrezeptordomänen, die spezifisch an den Komplementfaktor C1q binden, können im wesentlichen auf ähnliche Weise ausgeführt werden (z.B. wie in Lauvrak et al., 1997, Biol Chem. 378(12): 1509-19).

Um die in vivo Halbwertszeit eines Moleküls enthaltend ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptid zu erhöhen, kann auf die Bindung an FcRn mit Bibliotheken erfindungsgemäßer mutierter T-Zellrezeptordomänenpolypeptide selektiert werden.

FcRn Rezeptoren zur Selektion können entweder an der Oberfläche von Zellen bereitgestellt werden, welche die entsprechenden Rezeptoren natürlicherweise exprimieren oder durch Expression und Aufreinigung des extrazellulären Anteils des entsprechenden Rezeptors. Für den Zweck der vorliegenden Erfindung kann ein erstes Screening nach FcRn auf mutierte T-Zellrezeptordomänenpolypeptide (oder Moleküle, die solche mutierte Polypeptide der T-Zellrezeptordomänen enthalten) selektieren, die ferner in vitro getestet und überdies in FACS Experimenten durch Bindung an Zellen, die einen FcRn Rezeptor exprimieren, gekennzeichnet werden können. Screening und Selektion können auch pH Abhängigkeiten bei der Bindung an FcRn berücksichtigen (wie beschrieben in PCT WO02/060919; PCT WO97/34631). Es kann ferner durch Affinitätsreihung der Bindung an verschiedene rekombinante FcRn, Isoforme und Allotypen gekennzeichnet werden, z.B. mit Oberflächen-Plasmonresonanztechniken (z.B. wie in Dall' Acqua et al., Journal of Immunology, 2002, 169: 5171-5180).

Die T-Zellrezeptoren umfassen bevorzugt entweder eine Alpha- und Beta-Kette oder eine Gamma- und Delta-Kette des T-Zellrezeptors oder eines Teils davon.

Der modifizierte T-Zellrezeptor kann eine Alpha- oder eine Beta-Kette oder eine Gamma- und eine Delta-Kette, mindestens mit einer variablen Domäne umfassen.

Der T-Zellrezeptor gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst bevorzugt mindestens eine konstante und/oder mindestens eine variable Domäne eines T-Zellrezeptors oder eines Teils davon.

Ein anderer bevorzugter T-Zellrezeptor gemäß der vorliegenden Erfindung besteht aus einer Domäne einer Alpha, Beta, Gamma oder Delta-Kette, oder einem Teil davon, mit mindestens zwei Strukturschleifenregionen, und ist dadurch gekennzeichnet dass die mindestens zwei Strukturschleifenregionen mindestens zwei Aminosäureveränderungen enthalten, die mindestens zwei veränderte Strukturschleifenregionen bilden, wobei die mindestens zwei veränderten Strukturschleifenregion spezifisch an mindestens ein Epitop eines Antigens binden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die spezifische Bindung des veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids an ein Molekül durch ein Bin-

dungsnachweisverfahren bestimmt, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus immunologischen Nachweisverfahren, vorzugsweise "enzyme linked immunosorbent assays" (ELISA), Oberflächen-Plasmonresonanznachweisverfahren, Nuklear-Magnet-Resonanzspektroskopie des Sättigungstransferunterschieds, Transfer NOE (trNOE) Nuklear-Magnet-Resonanzspektroskopie, kompetitive Nachweisverfahren, Gewebefestbindungsnachweisverfahren, Lebendzellbindungsnachweisverfahren und Zellextrakt-nachweisverfahren.

Bindungsnachweisverfahren können unter Verwendung einer Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren durchgeführt werden, einschließlich aber nicht beschränkt auf FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer)- und BRET (Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer)- basierende Nachweisverfahren, "Amplified Luminescent Proximity Homogenous" Nachweisverfahren, "Scintillation Proximity" Nachweisverfahren, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), SPR (Oberflächen-Plasmonresonanz), isothermale Titrationskalorimetrie, differentielle Scanningkalorimetrie, Gelelektrophorese sowie Chromatographie einschließlich Gelfiltration.

Das veränderte Polypeptid der Erfindung ist vorzugsweise mit einer Markierung verbunden, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus organischen Molekülen, Enzymmarkierungen, radioaktiven Markierungen, Farbmarkierungen, fluoreszenten Markierungen, chromogenen Markierungen, lumineszenten Markierungen, Haptenen, Digoxigenin, Biotin, Metallkomplexen, Metallen, kolloidalem Gold und Gemischen davon.

Das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid kann mit weiteren Molekülen verbunden sein, welche den einfachen Nachweis des Konjugats in beispielsweise Bindungsnachweisverfahren (z.B. ELISA) und Bindungsstudien gestatten.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Polypeptid, das eine Domäne des T-Zellrezeptors oder Kombinationen davon mit mindestens zwei Schleifenregionen umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass jede der mindestens zwei Strukturschleifenregionen mindestens eine Aminosäureveränderung umfasst, die mindestens zwei veränderte Strukturschleifenregionen bildet, wobei die mindestens zwei veränderten Strukturschleifenregionen spezifisch an mindestens ein Epitop eines Antigens binden.

Es wird bevorzugt, auf molekulare Weise mindestens ein verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid (= das an den spezifischen Partner über die nicht-variablen Sequenzen oder Strukturschleifen bindet) mit mindestens einem weiteren Bindungsmolekül zu kombinieren, das ein Antikörper, Antikörperfragment, ein löslicher Rezeptor, ein Ligand oder ein weiteres Polypeptid der T-Zellrezeptordomänen sein kann.

Das weitere Bindungsmolekül, das mit dem mindestens einen veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptid der Erfindung kombiniert ist, wird ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus proteinartigen Molekülen, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten.

Die Strukturschleifenregionen der veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptide können spezifisch an jede Art von Bindungsmolekülen binden, insbesondere an proteinartige Moleküle, Proteine, Peptide, Polypeptide, Nukleinsäuren, Glykane, Kohlenhydrate, Lipide, kleine und große organische Moleküle, anorganische Moleküle. Selbstverständlich kann das veränderte Polypeptid der T-Zellrezeptordomänen mindestens zwei Schleifenregionen umfassen, wobei jede der Schleifenregionen spezifisch an unterschiedliche Moleküle oder Epitope binden kann.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das an die veränderte Strukturschleifenregion bindende Molekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus tumorassoziierten Antigenen, insbesondere EpCAM, tumorassoziiertem Glykoprotein-72 (TAG-72), tumorassoziiertem Antigen CA 125, Prostata-spezifischem Membranantigen (PSMA), Melanomassoziiertem Antigen von hohem Molekulargewicht (HMW-MAA), tumorassoziiertem

Antigen, das Lewis Y bezogenes Kohlenhydrat exprimiert, carcinoembryonischem Antigen (CEA), CEACAM5, HMFG PEM, Mucin MUC1, MUC18 sowie Cytokeratintumorassoziiertem Antigen, bakteriellen Antigenen, viralen Antigenen, Allergenen, Allergie-bezogenen Molekülen IgE, cKIT und Fc-Epsilon-Rezeptor I, Irp60, IL-5 Rezeptor, CCR3, rotem Blutzellrezeptor (CR1),
 5 menschlichem Serumalbumin, Mäuseserumalbumin, Rattenserumalbumin, neonatalem Fc-gamma-Rezeptor FcRn, Fc-gamma-Rezeptoren Fc-gamma RI, Fc-gamma RII, Fc-gamma RIII, Fc-alpha Rezeptoren, Fc-epsilon Rezeptoren, Fluoreszein, Lysozym, Toll-artiger Rezeptor 9; Erythropoietin, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33 (p67 Protein), CD38, CD40, CD40L,
 10 CD52, CD54, CD56, CD64, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, Interferon alpha, Interferon beta, Interferon gamma, TNF-alpha, TNFbeta2, TNFalpha, TNFalphabeta, TNF-RI, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, TRAIL Rezeptor-1, A1 Adenosinrezeptor, Lymphotoxin Beta Rezeptor, TACI, BAFF-R, EPO, LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, Integrin beta1,
 15 Integrin beta2, Integrin alpha4/beta7, Integrin alpha2, Integrin alpha3, Integrin alpha4, Integrin alpha5, Integrin alpha6, Integrin alphaV, alphaVbeta3 Integrin, FGFR-3, Keratinozyten Wachstumsfaktor, VLA-1, VLA-4, L-Selektin, anti-Id, E-Selektin, HLA, HLA-DR, CTLA-4, T-Zellrezeptor, B7-1, B7-2, VNR-Integrin, TGFbeta1, TGFbeta2, Eotaxin1, BLYS (B-Lymphozytenstimulator), Komplement C5, IgE, IgA, IgD, IgM, IgG, Faktor VII, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), Gewebefaktor, VEGF, VEGFR, Endothelinrezeptor, VLA-4, Kohlenhydraten wie etwa Blutgruppenantigenen und verwandten Kohlenhydraten, Galili-Glykosylierung, Gastrin, Gastrinrezeptoren, tumorassoziierten Kohlenhydraten, Hapten NP-cap oder NIP-cap, T-Zellrezeptor alpha/beta, E-Selektin, P-Glykoprotein, MRP3, MRP5, Glutathion-S-transferase pi (Multi-Medikamenten-Resistenzproteine), Alpha-granuläres Membranprotein (GMP) 140, Digoxin, placentale alkalische Phosphatase (PLAP)
 25 und testikuläre PLAP-ähnliche alkalische Phosphatase, Transferrinrezeptor, Heparanase I, menschliches Cardiac-Myosin, Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), Hüllglykoprotein gH des menschlichen Cytomegalovirus (HCMV), HIV gp120, HCMV, Respiratory Syncytial Virus RSV F, RSVF Fgp, VNR-Integrin, Hep B gp120, CMV, gpIIbIIIa, HIV IIIB gp120 V3 Schleife, Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fgp, Herpes Simplex Virus (HSV) gD Glykoprotein, HSV gb Glykoprotein, HCMV gb Hüllglykoprotein Clostridium perfringens Toxin und Fragmenten davon.

Vorzugsweise wird das Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus pathogenem Antigen, tumorassoziiertem Antigen, Enzym, Substrat, Selbstantigen, organischem Molekül oder
 35 Allergen. Besonders bevorzugt werden Antigene ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus viralen Antigenen, bakteriellen Antigenen oder Antigenen von pathogenen Eukaryoten oder Phagen. Bevorzugte virale Antigene umfassen HAV-, HBV-, HCV-, HIV I-, HIV II-, Parvovirus-, Influenza-, HSV-Hepatitisviren-, Flaviviren-, Westnil Virus-, Ebolavirus-, Pockenvirus-, Blatternvirus-, Masernvirus-, Herpesvirus-, Adenovirus-, Papillomavirus-, Polyomavirus-, Parvovirus-, Rhinovirus-, Coxsackievirus-, Poliovirus-, Echovirus-, Japanischer Enzephalitisvirus-, Denguevirus-, Zecken Enzephalitisvirus-, Gelbfieberevirus-, Coronavirus-, Respiratory Syncytial Virus-, Parainfluenzavirus-, La Crosse Virus-, Lassavirus-, Rabiesvirus-, Rotavirus- Antigene; bevorzugte bakterielle Antigene umfassen Pseudomonas-, Mycobacterium-, Staphylococcus-, Salmonella-, Meningokokken-, Borellia-, Listeria-, Neisseria-, Clostridium-, Escherichia-, Legionella-,
 45 Bacillus-, Lactobacillus-, Streptococcus-, Enterococcus-, Corynebacterium-, Nocardia-, Rhodococcus-, Moraxella-, Brucella-, Campylobacter-, Cardiobacterium-, Francisella-, Helicobacter-, Haemophilus-, Klebsiella-, Shigella-, Yersinia-, Vibrio-, Chlamydia-, Leptospira-, Rickettsia-, Mycobacterium-, Treponema-, Bartonella-Antigene. Bevorzugte eukaryotische Antigene von pathogenen Eukaryoten umfassen Antigene von Giardia, Toxoplasma, Cyclospora, Cryptosporidium, Trichinella, Hefen, Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Blastomyces, Histoplasma, Coccidioides.

Das erfindungsgemäß veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid kann vorzugsweise an
 55 eines der oben offenbarten Moleküle binden. Diese Moleküle umfassen auch Allergene.

Das veränderte Polypeptid der Erfindung ist vorzugsweise mit einer Markierung verbunden, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus organischen Molekülen, Enzymmarkierungen, radioaktiven Markierungen, Farbmarkierungen, fluoreszierenden Markierungen, chromogenen Markierungen, luminiszierenden Markierungen, Haptenen, Digoxigenin, Biotin, Metallkomplexen, Metallen, kolloidalem Gold und Gemischen davon.

Veränderte Polypeptide, die mit oben angegebenen Markierungen verbunden sind, können beispielsweise in diagnostischen Verfahren verwendet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen oder eines mit einem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen T-Zellrezeptordomänenpolypeptids zur Herstellung eines Impfstoffs zur aktiven Immunisierung. Dabei wird das T-Zellrezeptordomänenpolypeptid entweder als antigene Medikamentensubstanz zur Formulierung eines Impfstoffs verwendet oder zum Herausfischen oder Abfangen antigener Strukturen zur Verwendung in einer Impfstoffformulierung verwendet.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen oder eines mit einem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen T-Zellrezeptordomänenpolypeptids zur Herstellung einer Proteinbibliothek von Polypeptiden, welche veränderte Moleküle der T-Zellrezeptordomäne umfasst.

Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur spezifischen Bindung und/oder zum Nachweis eines Zielmoleküls, das die Schritte umfasst:

- (a) In Kontakt bringen eines Moleküls, welches ein erfindungsgemäßes verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid umfasst oder ein Molekül, das ein nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliches T-Zellrezeptordomänenpolypeptid umfasst mit einer Testprobe, welche in Verdacht ist, das Zielmolekül zu enthalten und
- (b) Nachweis der potentiellen Bildung eines spezifischen T-Zellrezeptordomänenpolypeptid/Molekül-Komplexes.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur spezifischen Isolierung eines Zielmoleküls, das die Schritte umfasst:

- (a) In Kontakt bringen eines Moleküls, welches ein erfindungsgemäßes verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid umfasst oder ein Molekül, das ein nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliches T-Zellrezeptordomänenpolypeptid umfasst mit einer Probe, welche das Zielmolekül enthält,
- (b) Abtrennung des gebildeten spezifischen Komplexes aus dem Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne und dem Zielmolekül und
- (c) wahlweise Isolierung des Zielmoleküls aus dem Komplex.

Die T-Zellrezeptordomänenpolypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung können dazu verwendet werden, spezifische Zielmoleküle aus einer Probe zu isolieren. Wenn multispezifische T-Zellrezeptordomänenpolypeptide verwendet werden, kann mehr als ein Zielmolekül aus einer Probe isoliert werden. Es ist besonders vorteilhaft, veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptide in diesen Verfahren zu verwenden da es erlaubt, z.B., eine Matrix mit homogener Oberfläche mit einer darauf immobilisierten definierten Menge an Bindungspartnern (d.h. modifizierten Polypeptiden der T-Zellenrezeptordomäne) zu bilden, die an zu isolierende Zielmoleküle binden können. Im Gegensatz dazu kann, wenn monospezifische Bindungspartner verwendet werden, keine homogene Matrix gebildet werden, da einzelne Bindungspartner nicht mit der gleichen Effizienz an die Matrix binden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum zielgerichteten Hinleiten einer Verbindung auf ein Zielmolekül, das die Schritte umfasst:

- (a) In Kontakt bringen eines Moleküls, das ein erfindungsgemäßes T-Zellenrezeptordomänenpolypeptid umfasst oder eines Moleküls, das eine mit einem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliches verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid umfasst, das in der Lage ist, spezifisch an die Verbindung zu binden,
- 5 (b) Hinleiten des Moleküls, das einen Komplex aus dem T-Zellrezeptordomänenpolypeptid und der Verbindung umfasst, zu dem Zielmolekül.

Erfindungsgemäße veränderte Polypeptide der T-Zellenrezeptordomäne können zum Hinleiten mindestens einer Verbindung, die an die CDRs und/oder veränderten Strukturschleifenregionen gebunden ist, zu dem Zielmolekül verwendet werden. Solche veränderte Polypeptide der T-Zellenrezeptordomänen können dazu verwendet werden, um therapeutische Substanzen in zielgerichteter Weise zu einem bevorzugten Wirkungsort im Laufe der Behandlung einer Krankheit zu leiten.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Molekülbibliothek, die ein erfindungsgemäßes oder mit einem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliches Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne umfasst.

Bevorzugte Verfahren für die Konstruktion dieser Bibliothek können oben und in den Beispielen gefunden werden. Die Bibliothek gemäß der vorliegenden Erfindung kann dazu verwendet werden, um T-Zellrezeptordomänenpolypeptide die an bestimmte Moleküle binden, zu identifizieren.

Im besonderen betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Proteinbibliothek die T-Zellrezeptordomänenpolypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung oder erhältlich nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung enthalten zur Entwicklung von T-Zellrezeptorderivaten.

Ein bestehender T-Zellrezeptor kann durch Einführung von Antigenbindungsstellen in eine Domäne geändert werden unter Verwendung einer Proteinbibliothek der betreffenden veränderten Wildtypdomäne von mindestens 10, vorzugsweise 100, besonders bevorzugt 1 000, besonders bevorzugt 10 000, besonders bevorzugt 100 000, insbesondere mehr als 1 000 000 Domänenvarianten, jedes mit mindestens einer veränderten Strukturschleife.

Bevorzugt umfassen die Domänenvarianten mindestens zwei veränderte Strukturschleifen. Die Bibliothek wird daraufhin auf Bindung an das spezifische Antigen gescreent. Nach molekularer Charakterisierung auf die gewünschten Eigenschaften wird das ausgewählte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid durch gentechnische Verfahren in den ursprünglichen T-Zellrezeptor kloniert, so dass es die Wildtypregion ersetzt. Alternativ kann nur die DNS, welche für die veränderten Strukturschleifen kodiert oder für die mutierten Aminosäuren kodiert ausgetauscht werden, um einen T-Zellenrezeptor mit der zusätzlichen Bindungsstelle für das spezifische Antigen zu erhalten.

Alternativ kann die Veränderung in den Strukturschleifen der Domänen mit der Domäne in deren natürlichem Zusammenhang ausgeführt werden, z.B. in Form eines zellgebundenen T-Zellrezeptors, eines löslichen T-Zellrezeptors, eines einzelkettigen TCR, eines Zipper dimerisierten TCR oder einer Kombination dieser mit jedem anderen Molekül. Der Vorteil dieses Aufbaus ist, dass das Screening mit Veränderungen in ihrer gewünschten Umgebung durchgeführt wird und daher jeder Einfluss der verschiedenen Veränderungen auf die Struktur oder Funktion des Restes des Moleküls leicht beobachtet wird.

Die Wahl der Stelle der mutierten, antigen-spezifischen Strukturschleife ist abhängig von der Struktur des ursprünglichen T-Zellrezeptors und vom Zweck der zusätzlichen Bindungsstelle. Wenn, beispielsweise, das ursprüngliche T-Zellrezeptor ein einzelkettiger TCR ist, ist eine Veränderung von Strukturschleifen in den zwei variablen Domänen möglich. Wenn der ursprüngliche T-Zellrezeptor ein löslicher TCR mit konstanten und variablen Domänen ist, können

Strukturschleifen an einer Seite einer jeden variablen Domäne sowie an den Strukturschleifen auf zwei Seiten jeder konstanten Domäne verändert werden.

Zur Erzeugung einer Bibliothek können Bibliotheken von mutierten ursprünglichen Molekülen hergestellt werden, die Mutationen in einer oder mehreren Strukturschleifen einer oder mehrerer T-Zellrezeptordomänen aufweisen. Die Selektion mit vollständigen mutierten ursprünglichen Molekülen kann einige Vorteile aufweisen, da die Selektion auf Antigenbindung mit einer veränderten Strukturschleife die sterisch vorteilhaften Veränderungen liefert. Beispielsweise kann es vorteilhaft sein, wenn das vollständige Molekül ein einzelkettiger TCR ist, die Bibliothek von mutierten ursprünglichen einzelkettigen TCRs auf die Bindung an ein Antigen zu screenen, gefolgt von einem Screening der spezifischen bindenden Moleküle auf Bindung an das Antigen, welches von den CDR Schleifen erkannt wird (ursprüngliche Spezifität). In einem alternativen Selektionsverfahren kann das ursprüngliche- das erste- Antigen während des Screenings auf Bindung an ein Antigen mit den veränderten Strukturschleifen an die CDR-Schleifen gebunden sein. Dieses gleichzeitige Screening kann die bevorzugte Selektion von Klonen erlauben die Mutationen in den Strukturschleifen enthalten, die die Bindung der veränderten T-Zellrezeptordomäne an sein ursprüngliches Ziel das es durch seine CDR Schlaufen erkennt, nicht negativ beeinflussen.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine Bibliothek von Varianten T-Zellrezeptordomänenpolypeptiden mit mindestens einer Aminosäurepositionsvariante in mindestens einer der Strukturschleifen. Die Bibliothek kann TCR Domänen der Alpha, Beta, Gamma und Delta Kette oder oder Gemische und molekulare Kombinationen davon umfassen. Bevorzugt hat die Polypeptidvariante der T-Zellrezeptordomäne der Bibliothek mindestens 2, mindestens 3, mindestens 4 Aminosäurepositionsvarianten in mindestens einer Strukturschleife.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine Einzelketten-TCR-Bibliothek mit mindestens einer Aminosäurepositionsvariante in mindestens einer der Strukturschleifen irgendeiner der scTCR Domänen.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine Zipper-dimerisierte TCR Bibliothek mit mindestens einer Aminosäurepositionsvariante in mindestens einer der Strukturschleifen irgendeiner der Domänen des Leucin- Zipper-dimerisierten TCR.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine TCR Bibliothek mit mindestens einer Aminosäurepositionsvariante in mindestens einer der Strukturschleifen irgendeiner der Domänen des TCR.

Wieder eine andere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine Bibliothek löslicher TCRs mit mindestens einer Aminosäurepositionsvariante in mindestens einer der Strukturschleifen irgendeiner der Domäne des löslichen TCR.

Die Größenanforderung (d.h. die Anzahl von Proteinvarianten) einer Proteinbibliothek, die verschiedenartig mutierte T-Zellrezeptordomänenpolypeptide oder Fusionsmoleküle mutierter T-Zellrezeptordomänenpolypeptide umfasst, ist abhängig von der Aufgabe. Im allgemeinen muss eine Bibliothek zur de novo Erzeugung einer Antigenbindungsstelle größer sein als eine Bibliothek, die zur weiteren Veränderung einer bereits bestehenden manipulierten Antigenbindungsstelle, die durch eine veränderte Strukturschleife gebildet wird, verwendet wird (z.B. zur Steigerung der Affinität oder der Veränderung der Feinspezifität gegenüber dem Antigen).

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenso eine Polypeptidbibliothek oder eine Nukleinsäurebibliothek, die mehrere Polypeptide umfasst, enthaltend T-Zellenrezeptordomänenpolypeptide oder mindestens eine in einer Minidomäne enthaltene Strukturschleifenregion, oder dafür kodierende Nukleinsäuremoleküle. Die Bibliothek enthält Mitglieder mit unterschiedlichen Veränderungen, wobei die Vielzahl durch die Veränderungen in der mindestens einen Strukturschleifenregion

bestimmt wird. Die Nukleinsäurebibliothek umfasst vorzugsweise mindestens 10 verschiedene Mitglieder (mit mindestens einer, bevorzugt mindestens zwei, mehr bevorzugt mindestens drei, am meisten bevorzugt mindestens vier potentiellen Aminosäureveränderungen) und umfasst besonders bevorzugt mindestens 100, besonders bevorzugt 1 000 oder 10 000 unterschiedliche Mitglieder (z.B. entworfen durch "Randomisierungsstrategien" oder kombinatorische Techniken). Noch stärker diversifizierte individuelle Mitgliederanzahlen, wie etwa mindestens 1 000 000 oder mindestens 10 000 000 werden ebenfalls bevorzugt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Kombination zweier verschiedener Polypeptide der T-Zellenrezeptordomänen, die aus mindestens zwei erfindungsgemäßen Bibliotheken ausgewählt sind, um multispezifische T-Zellrezeptoren zu erzeugen. Diese ausgewählten spezifischen Domänen von T-Zellenrezeptordomänenpolypeptiden können miteinander oder mit anderen Molekülen kombiniert werden, ähnlich wie Bausteine, um die optimale Anordnung der Domänen zu entwerfen, um die erwünschten Eigenschaften zu erlangen, wie etwa Kombinationen von Spezifitäten und/oder Valenzen.

Ferner können ein oder mehrere T-Zellenrezeptordomänenpolypeptide an zahlreichen oder allen unterschiedlichen Stellen eines Proteins eingeführt werden, ohne die Struktur des Proteins zu zerstören. Durch solche „Domänenshuffling“-Techniken werden neue Bibliotheken erschaffen, die wiederum auf die erwünschten Eigenschaften selektiert werden können.

Die bevorzugte Bibliothek enthält erfindungsgemäße T-Zellrezeptordomänenpolypeptide oder Derivate davon.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein Bindungsmolekül für ein Antigen (Antigen-bindendes Molekül), das mindestens ein Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne sowie mindestens eine Strukturschleifenregion umfasst, die erfindungsgemäß zur Bindung an das Antigen verändert wurde, wobei das Bindungsmolekül keine relevante und/oder spezifische Bindungsaktivität mit seinen CDR-Schleifen aufweist, allerdings mit einer neu eingeführten spezifischen Bindungsaktivität in der Strukturschleifenregion.

Auch für die erfindungsgemäßen Antigen-bindenden Moleküle wird bevorzugt, dass die neuen Antigenbindungsstellen in den Strukturschleifen durch randomisierende Technologien eingeführt werden, d.h. durch Veränderung eines oder mehrerer Aminosäurereste mindestens zweier Strukturschleifen durch Randomisierungstechniken oder durch Einführung zufallsgemäß erzeugter Einfügungen in solche Strukturschleifen. Alternativ wird die Verwendung kombinatorischer Ansätze bevorzugt.

Gemäß eines weiteren Aspekts betrifft die vorliegende Erfindung einen veränderten T-Zellrezeptor, der eine Antigenbindungsstelle aufweist, die dem unveränderten T-Zellrezeptor fremd ist und in eine, zwei, drei oder mehrere Strukturschleifen mindestens einer Domäne eingesetzt ist. Die Bezeichnung "fremd" bedeutet, dass die Antigenbindungsstelle nicht natürlicherweise durch die spezifischen Strukturschleifenregionen der T-Zellrezeptordomäne gebildet wird.

Gemäß noch eines weiteren Aspekts betrifft die vorliegende Erfindung einen veränderten T-Zellrezeptor, der eine Antigenbindungsstelle aufweist, die dem unveränderten Immunoglobulin fremd ist und in eine, zwei, drei oder mehrere Strukturschleifen mindestens einer Domäne eingesetzt ist, wobei der veränderte T-Zellrezeptor an das Antigen mit einer Affinität von mindestens 10^3 mol^{-1} , mindestens 10^4 mol^{-1} , mindestens 10^5 mol^{-1} , mindestens 10^6 mol^{-1} , mindestens 10^7 mol^{-1} , mindestens 10^8 mol^{-1} oder mindestens 10^9 mol^{-1} bindet.

Bevorzugte erfindungsgemäße T-Zellrezeptordomänenpolypeptide umfassen mindestens zwei Antigenbindungsstellen, wobei die erste Stelle an ein erstes Epitop bindet und die zweite Stelle an ein zweites Epitop bindet.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das vorliegende Polypeptid der T-Zellenrezeptordomäne mindestens drei Schleifenregionen, wobei die erste Schleifenregion an ein erstes Epitop bindet und die zweite und dritte Schleifenregion an ein zweites Epitop binden. Entweder die mindestens erste oder mindestens zweite und dritte Schleifenregion oder beide können eine Strukturschleife enthalten. Die erfindungsgemäßen T-Zellenrezeptordomänen umfassen die Fragmente davon, die im Stand der Technik als funktionell bekannt sind, welche die erfindungsgemäßen wesentlichen Elemente enthalten: die erfindungsgemäß veränderten Strukturschleifenregionen.

Vorzugsweise setzt sich der erfindungsgemäße T-Zellrezeptor aus mindestens zwei T-Zellrezeptordomänen oder einem Anteil davon, einschließlich einer Minidomäne, zusammen, und jede Domäne enthält mindestens eine Antigenbindungsstelle.

Ebenfalls wird eine erfindungsgemäße T-Zellrezeptordomänenpolypeptid bevorzugt, das mindestens eine Domäne der variablen Region eines T-Zellrezeptors und mindestens eine Domäne der konstanten Region eines T-Zellrezeptors umfasst; beispielsweise eine variable Domäne, die in mindestens zwei Strukturschleifen verändert ist, mit einer konstanten Domäne.

Das erfindungsgemäß bevorzugte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid umfasst eine Domäne, die mindestens 50 % Homologie mit der unveränderten Domäne aufweist.

Die Bezeichnung "Homologie" zeigt an, dass Polypeptide dieselben oder konservierte Reste an entsprechenden Positionen in deren primären, sekundären oder tertiären Struktur aufweisen. Die Bezeichnung erstreckt sich auch auf zwei oder mehrere Nukleotidsequenzen, welche für die homologen Polypeptide kodieren.

Eine "homologe T-Zellrezeptordomäne" bezeichnet eine erfindungsgemäße TCR Domäne, die mindestens 50 % Identität der Aminosäuresequenz hinsichtlich einer nativen Vollängensequenz eines Gerüsts der TCR Domäne aufweist oder jedes beliebigen Fragmentes einer Vollängensequenz einer TCR Domäne wie hierin offenbart. Vorzugsweise weist eine homologe TCR Domäne mindestens etwa 50 % Identität der Aminosäuresequenz, besonders bevorzugt mindestens etwa 55 % Identität der Aminosäuresequenz, besonders bevorzugt mindestens etwa 60 % Identität der Aminosäuresequenz, besonders bevorzugt mindestens etwa 65 % Identität der Aminosäuresequenz, besonders bevorzugt mindestens etwa 70 % Identität der Aminosäuresequenz, besonders bevorzugt mindestens etwa 75 % Identität der Aminosäuresequenz, besonders bevorzugt mindestens etwa 80 % Identität der Aminosäuresequenz, besonders bevorzugt mindestens etwa 85 % Identität der Aminosäuresequenz, besonders bevorzugt mindestens etwa 90 % Identität der Aminosäuresequenz, besonders bevorzugt mindestens etwa 95 % Identität der Aminosäuresequenz mit einer nativen Sequenz einer TCR Domäne auf oder mit jedem beliebigen anderen spezifisch definierten Fragment einer Vollängensequenz einer TCR Domäne wie hierin offenbart.

Die "Prozentuale (%) Identität der Aminosäuresequenz" ist in Hinsicht auf die hierin bezeichneten TCR Domänensequenzen als Prozentsatz der Aminosäurereste in einer Anwartersequenz definiert, der mit den Aminosäureresten in der spezifischen Sequenz TCR Domäne identisch ist, nach Sequenzvergleich der Sequenz und, falls erforderlich, Einführung von Lücken, um die maximale prozentuale Sequenzidentität zu erhalten, und wobei beliebige konservative Substitutionen nicht als Teil der Sequenzidentität in Betracht gezogen werden. Ein Sequenzvergleich zum Zweck der Bestimmung der prozentualen Identität der Aminosäuresequenz kann auf zahlreiche Weisen erreicht werden, die dem Fachmann geläufig sind, beispielsweise unter Verwendung öffentlich zugänglicher Computersoftware wie etwa BLAST, BLAST-2, ALIGN oder Megalign (DNASTAR) Software. Der Fachmann kann die angemessenen Parameter zur Messung des Sequenzvergleichs bestimmen, einschließlich von beliebigen Algorithmen, die zum Erhalt der maximalen Sequenzübereinstimmung über die gesamte Länge der verglichenen Sequenzen benötigt wird.

Die Werte der % Sequenzidentität der Aminosäuren können wie unten beschrieben unter Verwendung des WU-BLAST-2 Computerprogramms erhalten werden (Altschul et al., Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)). Die meisten der WU-BLAST-2 Suchparameter sind auf die voreingestellten Werte eingestellt. Solche, die nicht auf die Ausgangswerte eingestellt sind, d.h. die anpassbaren Parameter, sind auf die folgenden Werte eingestellt: Überlappungsbereich=1, Überlappungsfraktion=0,125, Wortschwelle (T)=11 und Treffermatrix= BLOSUM62. Wenn WU-BLAST-2 eingesetzt wird, wird ein Wert der % Identität der Aminosäuren bestimmt durch Teilung (a) der Anzahl der übereinstimmenden identischen Aminosäurereste zwischen der Aminosäuresequenz der interessierenden TCR Domäne, das eine Sequenz aufweist, die von der nativen variablen Domäne des TCR Domäne abgeleitet ist, und der zu vergleichenden interessierenden Aminosäuresequenz (d.h. die Sequenz, mit der die interessierende TCR Domäne verglichen wird, wobei es sich um die unveränderte TCR Domäne handeln kann), wie mit WU-BLAST-2 bestimmt, durch (b) die gesamte Anzahl von Aminosäureresten der nicht-randomisierten Anteile der interessierenden TCR Domäne. Beispielsweise ist in der Aussage "ein Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz X aufweist, die mindestens 80 % Identität der Aminosäuresequenz zu einer Aminosäuresequenz Y aufweist" die Aminosäuresequenz A die interessierende Vergleichsaminosäuresequenz, und die Aminosäuresequenz B ist die Aminosäuresequenz der interessierenden TCR Domäne.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Polypeptid ein T-Zellrezeptor oder ein bispezifischer einzelkettiger T-Zellrezeptor oder ein bispezifischer Zipper-dimerisierter T-Zellrezeptor oder ein bispezifischer löslicher T-Zellrezeptor. Es wird ferner bevorzugt, dass das Polypeptid eine bispezifische Domäne oder einen Teil davon umfasst.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann für jeden beliebigen im Stand der Technik für T-Zellrezeptoren und Immunglobuline bekannten Zweck verwendet werden, aber erlaubt auch Anwendungen, die von der Kombination der durch die vorliegende Erfindung eingeführten Spezifitäten abhängig sind. Demgemäß werden die erfindungsgemäßen Polypeptide vorzugsweise zur therapeutischen und vorbeugenden Anwendung verwendet (z.B. als eine aktive oder passive Immunotherapie, für die Immunmodulierung); zur präparativen und analytischen Anwendung und zur diagnostischen Anwendung.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Kit von Bindungspartnern, der enthält

- (a) ein Polypeptid, das ein verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid umfasst, das eine Antigenbindungsstelle aufweist, die in eine oder mehr Strukturschleifen eingesetzt ist sowie
- (b) ein Bindungsmolekül, das ein Epitop des Antigens enthält.

Ein solches Bindungsmolekül des erfindungsgemäßen Kits kann zur Identifizierung der Bindungsspezifität des Polypeptids verwendet werden, ein erfindungsgemäß verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid enthält. Unter Verwendung des Bindungsmoleküls des Kits gemäß der vorliegenden Erfindung kann die Potenz des erfindungsgemäßen veränderten Polypeptides bestimmt werden. Die Potenz ist, wie hier definiert, die Bindungsfähigkeit des veränderten Moleküls der Erfindung an dessen Antigen. Die Bindung kann quantitativ und/oder qualitativ bestimmt werden, hinsichtlich der Spezifität und/oder Affinität und/oder Avidität, wie für Zwecke der Qualitätsprüfung verwendet.

Ferner kann das Bindungsmolekül eines erfindungsgemäßen Kits zur Selektion des Polypeptids, das ein erfindungsgemäßes verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid umfasst, aus einer Bibliothek verwendet werden, die aus mindestens 10, vorzugsweise mindestens 100, besonders bevorzugt mindestens 1 000, besonders bevorzugt mindestens 10 000, insbesondere mindestens 100 000 Polypeptiden mit unterschiedlichen Veränderungen in den Strukturschleifen besteht.

Erfindungsgemäß ist es eines der Schlüsselmerkmale der vorliegenden Erfindung, dass die Manipulation des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids in Bereichen stattfindet, die normalerweise nicht an der Antigenbindung beteiligt sind, mit anderen Worten, in anderen Bereichen als den CDRs einer variablen Domäne eines TCR. Es wurde beobachtet, dass die spezifische Faltung von T-Zellrezeptordomänen die Einführung von zufälligen Mutationen in Bereiche erlaubt, die strukturell zu den CDRs analog sind, sich aber in der Position in Sequenz und Struktur unterscheiden. Die durch die vorliegende Erfindung identifizierten Bereiche sind, wie CDRs, Schleifenregionen, welche die Beta-Stränge der Immunoglobulinfaltung der T-Zellrezeptordomänenpolypeptide verbinden. Diese Strukturschleifenregionen können, wie in der vorliegenden Erfindung beschrieben, mutiert werden, ohne die Bindung der Domänen des T-Zellrezeptors zu beeinträchtigen, die durch die CDR Schleifen vermittelt wird. Durch Mutation der Strukturschleifenregionen wird eine neue molekulare Bindungsoberfläche oder Bindungstasche erzeugt, welche in Größe und Gestalt der durch die CDR Schleifen der natürlichen Antigenbindungsstelle eines T-Zellrezeptors gebildeten Bindungsoberfläche oder Bindungstasche ähnelt. Da die Strukturschleifen auch durch Einsetzen zusätzlicher Aminosäuren ausgedehnt werden können, kann die Architektur der neu erzeugten Bindungsstelle an das Zielmolekül, an welches diese binden sollte, angepasst werden. Beispielsweise können tiefe Bindungstaschen, die besonders zur Bindung kleiner Moleküle geeignet sind, bevorzugt durch lange Schleifen gebildet werden, d.h. Strukturschleifen, denen zusätzliche Aminosäuren in ihre Sequenz eingesetzt wurden, während ziemlich flache Bindungsoberflächen, die gut zur Bindung an Zielmoleküle mit einer großen, flachen molekularen Oberfläche geeignet sind, bevorzugt gebildet werden, wenn die Reste in den Strukturschleifen ohne das Einsetzen zusätzlicher Reste mutiert werden.

Insbesondere wird hierin beschrieben, dass durch Einführung zufälliger Mutationen in die Beta-Stränge A-B, C'-D und E-F verbindenden Schleifen einer menschlichen oder humanisierten variablen Domäne eines TCR, mutierte Domänen selektiert werden können, die spezifisch an entweder menschliches Serumalbumin oder an den Fc Rezeptor binden, welche normalerweise nicht von Domänen menschlichen TCR erkannt und gebunden werden. Die eingeführten Mutationen umfassen Mutationen, bei denen ausgewählte Aminosäurereste in den Wildtypsequenzen durch zufällig gewählte Reste ersetzt wurden, und sie umfassen ferner Insertionen von zusätzlichen Aminosäureresten in die oben beschriebenen Schleifen.

In analoger Weise sind die Domänen aus jeder beliebigen Klasse von T-Zellrezeptoren und von T-Zellrezeptoren jeder beliebigen Species für diese Art von Manipulation zugänglich. Ferner können nicht nur die in den Beispielen der vorliegenden Erfindung angesteuerten spezifischen Schleifen manipuliert werden, sondern es kann jede beliebige Schleife, die Beta-Stränge in T-Zellrezeptordomänen verbindet, auf dieselbe Weise manipuliert werden.

Manipulierte T-Zellrezeptordomänen aus jedem beliebigen Organismus und aus jeder beliebigen Klasse können erfindungsgemäß entweder als solche (als Einzeldomänen) oder als Teil eines größeren Moleküls verwendet werden. Beispielsweise können sie Teil eines intakten T-Zellrezeptores sein, welcher dementsprechend seine "normale", durch die 6 CDRs gebildete Antigenbindungsregion sowie die neue, manipulierte Antigenbindungsregion aufwies. Auf diese Weise könnte ein multispezifischer, z.B. bispezifischer T-Zellrezeptor erzeugt werden. Die manipulierten T-Zellrezeptordomänen können auch Teil eines beliebigen Fusionsproteins sein. Die Verwendung dieser manipulierten T-Zellrezeptordomänen liegt im allgemeinen Gebiet der Verwendung von T-Zellrezeptoren und Immunoglobulinen.

Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung mehr im Detail erklären, allerdings ohne sie einzuschränken.

Beispiele:

Beispiel 1

Eine Anzahl verschiedener Bibliotheken werden konstruiert, basierend auf einer löslichen Version des 1G4 TCR, welches spezifisch für das NY-ESO Eitop (WO2005113595) ist.

Die Gene der Bibliothek sind zusammengesetzt aus spezifischen synthetischen Oligonukleotiden zusammengesetzt und als alpha und beta Ketten des Vollängen TCR auf filamentösen Phagen präsentiert. Die alpha Kette ist in löslicher Form exprimiert, und die beta Kette ist als „in-frame“ Fusion mit dem GenIII Hüllprotein des M13 Bakteriophagen exprimiert. Die alpha Kette hat einen nicht-nativen Cysteinrest (kodiert durch die Mutation Thr84Cys (IMGT Nummerierung)) und die Betakette hat einen nicht-nativen Cysteinrest (kodiert durch die Mutation Ser79Cys (IMGT Nummerierung)) um eine Heterodimerbildung zu ermöglichen. Klonierung, Selektion und Charakterisierung kann wie in Li et al. (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354 beschrieben erfolgen. Die folgenden 1G4 TCR Gen und Bibliotheksgenpaare sind in den drei-Cistron Phagen-Displayvektor pEX746 kloniert. Das essentielle ist wie in Li et al. (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354 beschrieben.

- a) 1G4 alpha-Kette Wildtypgen in Kombination mit V-beta 1G4-1 Bibliotheksgen
- b) 1G4 alpha-Kette Wildtypgen in Kombination mit V-beta 1G4-2 Bibliotheksgen
- c) 1G4 alpha-Kette Wildtypgen in Kombination mit C-beta 1G4-1 Bibliotheksgen
- d) 1G4 alpha-Kette Wildtypgen in Kombination mit C-beta 1G4-2 Bibliotheksgen
- e) 1G4 beta-Kette Wildtypgen in Kombination mit V-alpha 1G4-1 Bibliotheksgen
- f) 1G4 beta-Kette Wildtypgen in Kombination mit V-alpha 1G4-2 Bibliotheksgen
- g) 1G4 beta-Kette Wildtypgen in Kombination mit C-alpha 1G4-1 Bibliotheksgen
- h) 1G4 beta-Kette Wildtypgen in Kombination mit C-alpha 1G4-2 Bibliotheksgen

Unten sind die Sequenzen für die 1G4 Wildtypketten und für Bibliotheken in sowohl der alpha und beta Kette, mit variablen und konstanten Domänen die für jede Kette separat randomisiert werden.

Für jede, Valpha, Calpha, Vbeta and Cbeta, sind zwei Bibliotheken vorhanden: eine mit nur Eratzstücken, eine mit zusätzlichen Insertionen. Das bedeutet dass unten eine Gesamtheit von 8 Bibliotheken beschreiben ist.

Gen des 1G4 alpha-Ketten Wildtyps, Genbank Zugangsnr. CS230225 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

```

1 ATGCAGGAGG TGACACAGAT TCCTGCAGCT CTGAGTGTCC CAGAAGGAGA AAACCTGGTT CTCACCTGCA GTTCACTGA TAGCGCTATT TACAACCTCC
101 AGTGGTTTAG GCAGGACCCT GSGAAAGGTC TCACATCTCT GTTGCTTATT CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAAAGTGA AGACTTAATG CCTGGCTGGA
201 TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTTATACAT TGCAGCTTCT CAGCCTGGTG ACTCAGCCAC CTACCTCTGT GCTGTGAGGC CCACATCAGG AGGAAGCTAG
301 ATACCTACAT TTGGAAGAGG AACCAAGCCTT ATTGTTTATC CGTATATCCA GAACCCGTAC CCTGCCGTGT ACCAGCTGAG AGAATGTAAA TTTAAGTATA
401 AGTCTGTCTG CCTATTACCC GATTTTGATT CTCAAACAAA TGTGTACAAA AGTAAGGATT CTGATGTGTA TATCAGAGAC AAATGTGTGC TAGACATGAG
501 GTCTATGGAC TTCAAGAGCA ACAGTGCTGT GGCCTGGAGC AACAAATCTG ACTTTGCATG TGCAAACGCC TTCAACAACA GCATTATTCG AGAAGACACC
601 TTCTTCCCA GCCCAGAAAG TTCCTAA

```

Protein des alpha-Ketten Wildtyps, Genbank Zugangsnr. CS230225 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

```

MQEVTQ:PAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRDPPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVAVRPTSGGSYIPTFGRGTSLVHFIYQNFPAVYQL
RDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWNSKSDFACANAFNNSIIFEDTFPPSPSS#

```

Gen der V-alpha-Bibliothek 1G4-1 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

1 ATGCAGGAGG TGACACAGAT TCCTGCAGCT CTGAGTGTCC CANNNSNNSN SNNSTTGGTT CTCAACTGCA GTTTCAGTGA TAGCGCTATT TACAACCTCC
 101 AGTGGTTTAG GCAGGACCCT GGGAAAGGTC TCACATCTCT GTTGCTTATT CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAAAGTGA AGACTTAATG CCTCGCTGGA
 201 TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTTATACAT TNNNSNNSN NSCCTGGTG ACTCAGCCAC CTACCTCTGT GCTGTGAGGC CCACATCAGG AGGAGCTAG
 301 ATACCTACAT TTGGAAGAGG AACCAGCCTT ATTGTTTCATC CGTATATCCA GAACCCGTGAC CCTGCCGTGT ACCAGCTGAG AGACTCTAAA TCCAGTGACA
 401 AGTCTGTCTG CCTATTACCC GATTTTGATT CTCAAACAAA TGTGTACAAA AGTAAGGATT CTGATGTGTA TATCACAGAC AAATGTGTGC TAGACATGAG
 501 GTCTATGGAC TTCAAGAGCA ACAGTGTCTG GGCCTGGAGC AACAAATCTG ACTTTGCATG TGCAAACGCC TTCAACAACA GCATTATTCC AGAAGACACC
 601 TTCTTCCCA GCCCAGAAAG TTCTTAA

Protein der V-alpha-Bibliothek 1G4-1 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

10 MQEVTQIPAAALSVFXXXXLVNCSFTDSAIYNLQWFRQDPFGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSGRSTLYIXXXPGDSATYLCVAVRPTSGGSYIPTFGRGTSLVHPYIQNPDAVYQL
 RDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWNSKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS*

Mutierte Reste:

15 EGEN 15-18
 AASQ 92-95

Gen der V-alpha-Bibliothek 1G4-2 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

20 1 ATGCAGGAGG TGACACAGAT TCCTGCAGCT CTGAGTGTCC CANNNSNNSN SNNSTTGGTT CTCAACTGCA GTTTCAGTGA TAGCGCTATT TACAACCTCC
 101 AGTGGTTTAG GCAGGACCCT GGGAAAGGTC TCACATCTCT GTTGCTTATT CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAAAGTGA AGACTTAATG CCTCGCTGGA
 201 TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTTATACAT TNNNSNNSN NSCCTGGTG ACTCAGCCAC CTACCTCTGT GCTGTGAGGC CCACATCAGG AGGAGCTAG
 301 ATACCTACAT TTGGAAGAGG AACCAGCCTT ATTGTTTCATC CGTATATCCA GAACCCGTGAC CCTGCCGTGT ACCAGCTGAG AGACTCTAAA TCCAGTGACA
 401 AGTCTGTCTG CCTATTACCC GATTTTGATT CTCAAACAAA TGTGTACAAA AGTAAGGATT CTGATGTGTA TATCACAGAC AAATGTGTGC TAGACATGAG
 501 GTCTATGGAC TTCAAGAGCA ACAGTGTCTG GGCCTGGAGC AACAAATCTG ACTTTGCATG TGCAAACGCC TTCAACAACA GCATTATTCC AGAAGACACC
 25 601 TTCTTCCCA GCCCAGAAAG TTCTTAA

Protein der V-alpha-Bibliothek 1G4-2 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

30 MQEVTQIPAAALSVF...LVNCSFTDSAIYNLQWFRQDPFGKGLTSLLLIQSSQREQTS...NASLDKSSGRSTLYI...PGDSATYLCVAVRPTSGGSYIPTFGRGTSLVHPYIQNPDAVYQL
 RDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWNSKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS*

Mutierte Reste:

35 EGEN 15-18
 GRL 70, 78, 79
 AASQ 92-95

Gen der C-alpha-Bibliothek 1G4-1 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

40 DNA Sequenz mit Translation:
 1 ATGCAGGAGG TGACACAGAT TCCTGCAGCT CTGAGTGTCC CAGAAGGAGA AAAGTTGGTT CTCAACTGCA GTTTCAGTGA TAGCGCTATT TACAACCTCC
 101 AGTGGTTTAG GCAGGACCCT GGGAAAGGTC TCACATCTCT GTTGCTTATT CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAAAGTGA AGACTTAATG CCTCGCTGGA
 201 TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTTATACAT TGCAGCTTCT CAGCCTGGTG ACTCAGCCAC CTACCTCTGT GCTGTGAGGC CCACATCAGG AGGAAAGCTAG
 301 ATACCTACAT TTGGAAGAGG AACCAGCCTT ATTGTTTCATC CGTATATCCA GAACCCGTGAC CCTGCCGTGT ACCAGCTGAG AGACTCTAAA TCCAGTGACA
 401 AGTCTGTCTG CCTATTACCC GATTTTGATT CTCAAACAAA TGTGTACAAA ACTNNSNNSN NSNNSGTGTA TATCACAGAC AAATGTGTGC TAGACATGAG
 45 501 GTCTATGGAC TTCAAGAGCA ACAGTGTCTG GGCCTGGAGC NNSNNSNNSN NSTTTGCATG TGCAAACGCC TTCAACAACA GCATTATTCC AGAAGACACC
 601 TTCTTCCCA GCCCAGAAAG TTCTTAA

Protein der C-alpha-Bibliothek 1G4-1 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

50 MQEVTQIPAAALSVFEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQDPFGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVAVRPTSGGSYIPTFGRGTSLVHPYIQNPDAVYQL
 RDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWNSKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS*

Mutierte Reste:

55 KDSD 43-77

NKSD 91-101

Gen der C-alpha-Bibliothek 1G4-2 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

```

5      1 ATGCAGGAGG TGACACAGAT TCCTGCAGCT CTGAGTGTCC CAGAAGGAGA AACTTGGTT CTCAACTGCA GTTCTACTGA TAGCGCTATT TACAACCTTC
101 AGTGGTTTAG GCAGGACCCT GGGAAAGGTC TCACATCTCT GTTGCTTATT CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAAGTGGG AGACTTAATG CCTGGCTGGA
201 TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTTATACAT TGCAGCTTCT CAGCCTGGTG ACTCAGCCAC CTACCTCTGT GCTGTGAGGC CCACATCAGG AGAAGCTTAT
301 ATACCTACAT TTGGAAGAGG AACCAGCCTT ATTGTTTATC GTTATATCCA GAACCTGAC CCTGCCGTGT ACCAGCTGAG AGACTCTAAA TCCAGTGAAG
401 AGTCTGTCTG CTTATTACCC GATTTTGATT CTCAAACAAA TGTGTCACAA AGTNNNNNSN NSNNNNNSGT GTATATCACA GACAAATGTG TGCTAGACAT
501 GAGGTCTATG GACTTCAAGA GCAACAGTGC TGTGGCCTGG AGCNNNNNSN NSNNNNNSTT TGCATGTGCA AACGCCITCA ACAACAGCAT TATTCAGAA
10 601 GACACCTTCT TCCCCAGCCC AGAAAGTTCC TAA

```

Protein der C-alpha-Bibliothek 1G4-2 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

```

15 HQEVTQIPAAISVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGLNLASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVAVRPTSGGSYIPTFGRTSLIVHPFIQNPFVAVTCL
RDKSSDKSVCLFTDFDSQINVEQSXXXXXVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSXXXXXACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS#

```

Mutierte Reste

Inserted residues "X"

```

20 KDSXD
   NKSDX

```

Gen des V-beta 1G4 Wildtyps, GenBank Zugangsnummer. CS230226 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

```

25      1 atgggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtccctgaaga caggacagag catgacactg
61 cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtccttgt atcgacaaga cccaggcatg
121 gggctgaggc tgattcatta ctcagtttgt gctggtatca ctgaccaagg agaagtcccc
181 aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct
241 gtcctctccc agacatctgt gtacttttgt gccagcagtt acgtcgggaa caccggggag
30 301 ctgttttttg qagaaggctc taggctgacc gtactggagg acctgaaaaa cgtgttccca
361 cccgaggtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacaccca aaaggccaca
421 ctgtgtgtcc tggcacacag cttctacccc gaccacgttg agctgagctg gtggtggaat
481 ggaaggaggy tgacagtggt ggtctgcaca gacccgcagc cctcaaggga gcagcccgcc
541 ctcaatgact ccagatagcg tctgagcagc cgctgaggg tctcggccac cttctggcag
35 601 gacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggtctctgga gaatgacgag
661 tggacccaggy atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga
721 gcaagactaa

```

Protein des V-beta 1G4 Wildtyps, GenBank Zugangsnummer. CS230226 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

```

40 MGVDTQPKFQVLKGTGSMTLQCAQDMNHEYSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPGNYNVRSTTDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFEGESRLTVLEDLKNVFPPEVAVF
EPSEAEISHTQATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTDRAKPVTCIVSAEWGRAD#

```

Gen der V-beta-Bibliothek 1G4-1 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

```

50      1 ATGGGTGTCA CTCAGACCCC AAAATTCCAG GTCCCTGNNNS NSNNNNNSNN SATGACACTG CAGTGTGCCC AGGATATGAA CCATGAATAC ATGTCTCTGT
101 ATCGACAAGA CCCAGGCATG GGGCTGAGGC TGATTATTAT CTACGTTGGT GCTGGTATCA CTGACCAAGG AGAAGTCCCC AATGGCTACA ATGTCTCTAG
201 ATCAACCACA GAGGATTTCG CGCTCAGGCT GNNSNNNSNS NNSCCCTCCC AGACATCTGT GTACTTCTGT GCCAGCAGTT ACCTCGGSA AACCAGGAGG
301 CTGTTTTTTG GAGAAGGCTC TAGGCTGACC GTACTGGAGG ACCTGAAAAA CGTGTTCCTA CCGGAGGTGG CTGTGTTTGA CCACATCAGG CCAGACATCT
401 CCCACACCCA AAAGGCCACA CTGGTGTGCC TGGCCACAGG CTTCTACCCC GACCACGTGG AGCTGAGCTG GTGGGTGAAT GGGAAAGGAGG TGCACAGTGG
501 GGTCTGCACA GACCCGCAGC CCCTCAAGGA GCAGCCCGCC CTCAATGACT CCAGATACGC TCTGAGCAGC CGCCTGAGGG TCTCGGCCAC CTTCTGGCAG
601 GACCCCGCGA ACCACTTCCG CTGTCAAGTC CAGTTCTACG GGCTCTCGGA GAATGACGAG TGGACCCAGG ATAGGGCCAA ACCCGTCACT CAGATCTGTA
701 GCGCCGAGGC CTGGGTGAGA GCAGACTAA

```

Protein der V-beta-Bibliothek 1G4-1 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

MGVTQTPKFQVLXXXXMTLQCAQDMNHEYMSWYRDPGMLRLIHYSVGAGITDQGEVPGNYNVSRTTDFPLRLXXXXPSQTSVYFCASSYVGNTEGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFFPEVAVF
EPSEAEISHTQKATLVCLATGFYFDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTDRAKPVQTIVSAEAWGRAI

Mutierte Reste

5
KTGQS 15-18
LSAA 92-95

Gen der V-beta-Bibliothek 1G4-2 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

10
1 ATGGGTGTCA CTCAGACCCC AAAATTCCAG GTCTGNNSN NSNNSNNSNN SATGACACTG CAGTGTGCC AGGATATGAA CCATGAATAC ATGTCTGGT
101 ATCGACAAGA CCCAGGCATG GGGCTGAGGC TGATTCATTA CTCAGTTGGT GCTGGTATCA CTGACCAAGG AGAAGTCCCC AATNNSTACN NSNNSCTCAG
201 ATCAACCACA GAGGATTTCG CGCTCAGGCT GNNSNNSNNS NNSCCTCCCC AGACATCTGT GTACTTCTGT GCCAGCAGTT ACGTCGGGAA CACCGGGGAG
301 CTGTTTTTTG GAGAAGGCTC TAGGCTGACC GTACTGGAGG ACCTGAAAAA CGTGTTCCTCA CCCGAGGTGG CTGTGTTTGA GCCATCAGAA GCAGAGATCT
401 CCACACCCCA AAAGGCCACA CTGGTGTGCC TGGCCACAGG CTTCTACCCC GACCACGTGG AGCTGAGCTG GTGGGTGAAT GGAAGGAGG TGCACAGTCT
15 501 GGTCTGCACA GACCCGCAGC CCCTCAAGGA GCAGCCCGCC CTCAATGACT CCAGATACGC TCTGAGCAGC CGCCTGAGGG TCTCGGCCAC CTTCTGGCAG
601 GACCCCGCA ACCACTTCCG CTGTCAAGTC CAGTTCTACG GGCTCTCGGA GAATGACGAG TGGACCCAGG ATAGGGCCAA ACCCGTCACC CAGATCGTCA
701 GCGCCGAGGC CTGGGGTAGA GCAGACTAA

Protein der V-beta-Bibliothek 1G4-2 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

20
MGVTQTPKFQVLXXXXMTLQCAQDMNHEYMSWYRDPGMLRLIHYSVGAGITDQGEVPGNYNVSRTTDFPLRLXXXXPSQTSVYFCASSYVGNTEGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFFPEVAVF
EPSEAEISHTQKATLVCLATGFYFDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTDRAKPVQTIVSAEAWGRAI

Mutierte Reste

25
KTGQS 15-18
G,—N, V 75, 77, 78
LSAA 92-95

Gen of C-beta-Bibliothek 1G4-1 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

30
1 ATGGGTGTCA CTCAGACCCC AAAATTCCAG GTCTGAAGA CAGGACAGAG CATGACACTG CAGTGTGCC AGGATATGAA CCATGAATAC ATGTCTGGT
101 ATCGACAAGA CCCAGGCATG GGGCTGAGGC TGATTCATTA CTCAGTTGGT GCTGGTATCA CTGACCAAGG AGAAGTCCCC AATGGGTACA ATGTCTGGT
201 ATCAACCACA GAGGATTTCG CGCTCAGGCT GCTGTGGGT GCTCCTCCCC AGACATCTGT GTACTTCTGT GCCAGCAGTT ACGTCGGGAA CACCGGGGAG
301 CTGTTTTTTG GAGAAGGCTC TAGGCTGACC GTACTGGAGG ACCTGAAAAA CGTGTTCCTCA CCCGAGGTGG CTGTGTTTGA CCATGAATAC CTAAGGCTON
35 401 NSNNSNNSNN SAAGGCCACA CTGGTGTGCC TGGCCACAGG CTTCTACCCC GACCACGTGG AGCTGAGCTG GTGGGTGAAT GGAAGGAGG TGCACAGTGG
501 GGTCTGCACA GACCCGCAGC CCCTCAAGGA GCAGCCCGCC CTCAATGACT CCAGATACGC TCTGAGCAGC CGCCTGAGGG TCNNSNNSNN SHNSTGNNS
601 GACCCCGCA ACCACTTCCG CTGTCAAGTC CAGTTCTACG GGCTCTCGGA GAATGACGAG TGGACCCAGG ATAGGGCCAA ACCCGTCACC CAGATCGTCA
701 GCGCCGAGGC CTGGGGTAGA GCAGACTAA

Gen der C-beta-Bibliothek 1G4-1 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

40
MGVTQTPKFQVLKTQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRDPGMLRLIHYSVGAGITDQGEVPGNYNVSRTTDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTEGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFFPEVAVF
EPSEAEXXXXKATLVCLATGFYFDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALNDSRYALSSRLRVXXXXDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTDRAKPVQTIVSAEAWGRAI

Mutierte Reste:

45
ISHTQ 14, 15, 15.1, 16, 17
SATFQ 92-95, 96.1

Gen der C-beta-Bibliothek 1G4-2 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

```

1 ATGGGTGTCA CTCAGACCCC AAAATTCCAG GTCCTGAAGA CAGGACAGAG CATGACACTG CAGTGTGCCC AGGATATGAA CCATGAATAC ATGTCTCTGT
101 ATCGACAAGA CCCAGGCATG GGGCTGAGGC TGATTCTTA CTCAGTTGGT GCTGGTATCA CTGACCAAGG AGAAGTCCCC AATGGCTACA ATGTCTCTAG
201 ATCAACCACA GAGGATTTC CGCTCAGGCT GCTGTGGGCT GCTCCCTCCC AGACATCTGT GTACTTCTGT GCCAGCACTT ACCTCGGGAA CACCGGGGAG
301 CTGTTTTTTG GAGAAGGCTC TAGGCTGACC GTACTGGAGG ACCTGAAAAA CGTGTTCCTA CCCGAGGTCG CTGTGTTTGA GCCATCAGAA GCAGAGNNNN
401 NSNNNSNNNN SNNNAAGGCC AACTGGTGT GCCTGGCCAC AGGCTTCTAC CCCGACCACG TGGAGCTGAG CTGGTGGGTG AATGGGAAGG AGGTGCACAG
5 501 TGGGGTCTGC ACAGACCCGC AGCCCTCAA GGAGCAGCCC GCCCTCAATG ACTCCAGATA CGCTCTGAGC AGCCGCCTGA GGCTCNSNN SNNNSNNNS
601 TGGNNSGACC CCCGCAACCA CTTCGCTGT CAAGTCCAGT TCTACGGGCT CTCGGAGAAT GACGAGTGA CCCAGGATAG GGCCAAACCC GTCACCCAGA
701 TCGTCAGCGC CGAGGCCTGG GGTAGAGCAG ACTAA

```

Protein der C-beta-Bibliothek 1G4-2 (inklusive Start Codon und Stop Codon):

```

MGVTQPKFQVLTKQSMTLQCAQDMNHEYSWYRQDFGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVINGVNSRSTTEFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVNGTGLFPGEGSLTLVLEDLKNNVFPEVAVF
EPSEAEXXXXXKATLVCLATGFYDPHVELSMWVNGKEVHSGVCTDPOPLKEQPALNDSRYALSSRLRVXXXXXXWDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQERAKNPTCTVSEAWTQD

```

Mutierte Reste:

Inserted residues "X"

ISHXTQ 14, 15, 15.1, 16, 17

SATXFQ 92-95, 96.1

Beispiel 2:

Nach Ligation der Bibliotheksinserts in den Vektor, werden die Schritte der Phagenpräparation gemäß den folgenden Standardprotokollen durchgeführt. Kurz gefasst, die Ligationsmischungen werden in *E. coli* TG1 Zellen durch Elektroporation transformiert. Darauf folgend werden die Phagenpartikel auf den *E. coli* TG1 Zellen mit dem Helfer Phagen M13-KO7 gerettet. Die Phagenpartikel werden dann aus dem Kulturüberstand mit PEG/NaCl in 2 Schritten präzipitiert, in Wasser gelöst und für die Selektion durch Panning verwendet oder, alternativ, werden sie bei minus 80 °C aufbewahrt.

Selektion von Klonen die spezifisch an humanes Serumalbumin binden:

Die in Beispiel 1 beschriebenen Bibliotheken werden in Panningrunden gemäß Standardprotokollen für die Isolierung von spezifisch bindenden Klonen verwendet. Kurz gefasst, die Phagenbibliotheken werden in Bindungspuffer (PBS, 1% Ovalbumin, 0.005% Tween 20) suspendiert und gegen direkt an Maxisorp Platten immobilisiertes humanes Serum Albumin gepannt (10 Mikrogramm/ml in PBS, über Nacht bei 4°C; Platten werden mit Blocker Casein geblockt (Pierce). Nach 2 Stunden werden ungebundene Phagen durch wiederholtes Waschen entfernt (PBS, 0.05% Tween 20) und gebundene Phagen werden mit 500 mM KCl, 10mM HCl, pH2 eluiert. 2, 3, 4 oder 5 dieser Panningrunden werden durchgeführt. Nach jeder Panningrunde auf humanem Serumalbumin werden die erhaltenen Klone selektiert und auf die Bindung an humanes Serumalbumin getestet.

Selektion von Klonen die spezifisch an FcRn binden:

Panning wird wie in WO02060919, Beispiel 6.2 beschrieben durchgeführt. In Kürze, die Phagen werden in 5 ml 20 mM MES, pH 6.0/5% Magermilch/0.05% Tween 20 resuspendiert und (100 Mikroliter of 5×10^{12} PFU/ml/Napf) zu 20 Vertiefungen einer Maxisorp Immunplatte (Nunc) zugegeben, die vorher mit 1 Mikrogramm murinem FcRn beschichtet wird und mit 5% Magermilch geblockt. Nach Inkubation für 2 Stunden bei 37°C werden die Vertiefungen 10-30 mal mit 20 mM MES, pH 6.0/0.2% Tween 20/0.3 M NaCl gewaschen und die Phagen durch Inkubation in 100 Mikroliter PBS, pH 7.4/Vertiefung für 30 min bei 37°C eluiert. Phagen werden dafür verwendet, exponentiell wachsende *E. coli* TG1 zu reinfizieren. 2, 3, 4 oder 5 dieser Panningrunden werden durchgeführt. Nach jeder Panningrunde auf FcRn werden die resultierenden Klone selektiert und auf Bindung an FcRn getestet.

Selektion von Klonen die spezifisch an Fc-gamma Rezeptoren binden:

Pannen gegen Fc-gammaRI, Fc-gammaRIIA, Fc-gammaRIIB and Fc-gammaRIIIB wird wie in Berntzen et al (2006) Protein Eng Des Sel 19:121-128 beschrieben, durchgeführt. Kurz gefasst, kultivierte Zellen die mit den Genen, die für Fc-gammaRI, Fc-gammaRIIA, Fc-gammaRIIB or Fc-gammaRIIIB kodieren, transfiziert werden, werden als Ziele für die Selektion von Phagenbibliotheken verwendet. Zellen, die Fc-gammaRI, Fc-gammaRIIA, Fc-gammaRIIB or Fc-gammaRIIIB natürlicherweise exprimieren, können auch für diesen Zweck benützt werden. Z.B. die Zelllinie U937 (American Type Culture Collection CRL-1503), die konstitutiv FcγRI, FcγRIIA and FcγRIIB exprimiert, kann als Ziel verwendet werden. Die Menge an FcγRI kann in dieser Zelllinie durch IFN-γ Stimulation, aufreguliert sein, was diesen Rezeptor zum häufigsten auf den FcγRs macht. Lösliche Versionen der Rezeptoren, die rekombinant in Bakterien, Hefe oder tierischen Zellen hergestellt werden können, können auch für diesen Zweck verwendet werden.

Nach jeder Panningrunde auf Fc-gammaRI, Fc-gammaRIIA, Fc-gammaRIIB or Fc-gammaRIIIB werden die resultierenden Klone selektiert oder auf Bindung an den ausgewählten Rezeptor getestet, z.B. durch ELISA oder Flow Zytometrie.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Manipulation eines T-Zellrezeptordomänenpolypeptids, das mindestens eine Veränderung in einer Strukturschleifenregion des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids umfasst, und Bestimmung der Bindung des T-Zellrezeptordomänenpolypeptids an ein Epitop eines Antigens, wobei das unveränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid im wesentlichen nicht an das Epitop bindet, welches die Schritte umfasst:
 - Bereitstellung einer Nukleinsäure, die für ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptid kodiert, welches mindestens eine Strukturschleifenregionen umfasst,
 - Veränderung mindestens eines Nukleotidrests von mindestens einer der Strukturschleifenregionen
 - Übertragung der veränderten Nukleinsäure in ein Expressionssystem,
 - Expression des veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids,
 - Kontaktierung des exprimierten veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids mit dem Epitop und
 - Bestimmung, ob das veränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid an das Epitop bindet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das T-Zellrezeptordomänenpolypeptid spezifisch an mindestens 2 Epitope bindet.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, *dadurch gekennzeichnet* dass das T-Zellrezeptordomänenpolypeptid humanen oder murinen Ursprungs ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet* dass das T-Zellrezeptordomänenpolypeptid abgeleitet von einer T-Zellrezeptordomäne ist, ausgewählt aus der variablen oder konstanten Domäne, bevorzugt aus der Gruppe bestehend aus V-alpha, V-beta, C-alpha und C-beta.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet* dass die veränderten Schleifenregionen der variablen Domänen mindestens eine Veränderung innerhalb der Aminosäuren 11 bis 19, Aminosäuren 43 bis 51, Aminosäuren 67 bis 80 oder Aminosäuren 90 bis 99 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Domänen die des IMGT ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet* dass die veränder-

ten Schleifenregionen der konstanten Domänen mindestens eine Veränderung innerhalb der Aminosäuren 9 bis 20, Aminosäuren 27 bis 36, Aminosäuren 41 bis 78, Aminosäuren 82 bis 85, Aminosäuren 90 bis 102 oder Aminosäuren 107 bis 116 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäureposition der Domänen die des IMGT ist.

- 5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, *dadurch gekennzeichnet* dass die Veränderung mindestens eines Nukleotids einer Nukleinsäure zu einer Substitution, Deletion und/oder Insertion von einer oder mehreren Aminosäuren des durch die Nukleinsäure kodierten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids führt.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, *dadurch gekennzeichnet* dass mindestens eine Aminosäure mindestens einer Strukturschleifenregion durch ortsgerichtete Zufallsmutation verändert wird.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 8, *dadurch gekennzeichnet*, dass das zufällig veränderte Nukleinsäuremolekül mindestens eine Nukleotid-Wiederholungseinheit umfasst, welche die Sequenz NNS, NNN, NNK, TMT, WMT, RMC, RMG, MRT, SRC, KMT, RST, YMT, MKC, RSA, RRC aufweist, wobei die Kodierung gemäß IUPAC ist.
- 20 10. Verwendung eines durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 erhältlichen T-Zellrezeptordomänenpolypeptids zur Herstellung einer Proteinbibliothek von T-Zellrezeptordomänenpolypeptidvarianten.
- 25 11. Bibliothek, die mindestens 10 durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 erhältliche Polypeptide der T-Zellrezeptordomäne mit einer Veränderung in mindestens einer Strukturschleifenregion umfasst.
- 30 12. Bibliothek, die mindestens 10 durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 erhältliche T-Zellrezeptordomänenpolypeptide mit Mutationen von mindestens drei Aminosäurepositionen in mindestens einer Strukturschleifenregion umfasst.
- 35 13. Eine Bibliothek nach den Ansprüchen 11 und 12 enthaltend Polypeptide der T-Zellrezeptordomäne ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus V-alpha, V-beta, C-alpha und C-beta.
- 40 14. Bibliothek enthaltend mindestens 10 T-Zellrezeptordomänenpolypeptide erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 mit mindestens einer Veränderung in mindestens einer Strukturschleifenregion.
- 45 15. Bibliothek enthaltend mindestens 10 T-Zellrezeptoren erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 mit Veränderungen in mindestens einer Strukturschleifenregion von einer Domäne ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus V-alpha, V-beta, C-alpha und C-beta.
- 50 16. Bibliothek enthaltend mindestens 10 T-Zellrezeptoren erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 mit mindestens 3 Veränderungen in mindestens einer Strukturschleifenregion.
- 55 17. Verfahren zur spezifischen Bindung und/oder zum Nachweis eines Moleküls, welches die Schritte umfasst:
 - (a) In Kontakt bringen einer Bibliothek von veränderten T-Zellrezeptoren nach einem der Ansprüche 10 bis 16 oder eines T-Zellrezeptordomänenpolypeptids erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 mit einer Testprobe die das Molekül enthält, und wahlweise
 - (b) Detektion der möglichen Bildung eines spezifischen T-Zellrezeptor/Molekül-Komplexes

18. Verfahren zur spezifischen Isolierung einer veränderten T-Zellrezeptorbindung an ein Molekül, umfassend die Schritte:
- (a) In Kontakt bringen der Bibliothek mit veränderten T-Zellrezeptoren nach einem der Ansprüche 10 bis 16 oder eines veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, mit einer Testprobe die das Molekül enthält,
 - (b) Abtrennen des gebildeten spezifischen T-Zellrezeptor/Molekül Komplexes, und
 - (c) wahlweise Isolieren des modifizierten -Zellrezeptors von dem Komplex.
19. Kit aus Bindungspartnern enthaltend
- (a) eine Bibliothek aus veränderten T-Zellrezeptoren nach einem der Ansprüche 10 bis 16 oder veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptiden erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und
 - (b) ein Bindungsmolekül, das ein Epitop eines Antigens enthält.
20. Verwendung eines Bindungsmoleküls eines Kits nach Anspruch 19 für die Selektion eines veränderten T-Zellrezeptordomänenpolypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 9 aus einer Bibliothek nach einem der Ansprüche 10 bis 19.
21. Ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptid enthaltend mindestens eine Strukturschleifenregion, wobei mindestens eine Schleifenregion mindestens eine die Bindung von mindestens einer veränderten Schleifenregion an eine Epitop eines Antigens ermöglichende Veränderung enthält, wobei das unveränderte T-Zellrezeptordomänenpolypeptid nicht an das Epitop bindet.
22. Ein T-Zellrezeptordomänenpolypeptid nach Anspruch 21, das an ein Epitop eines Antigens, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Serumproteinen, Fc-Rezeptoren, Komplementfaktoren und Serumalbuminen bindet.
23. Ein verändertes T-Zellrezeptordomänenpolypeptid nach Anspruch 21 oder 22 mit mindestens zwei veränderten Strukturschleifenregionen.
24. T-Zellrezeptor enthaltend mindestens eine veränderte T-Zellrezeptordomäne nach einem der Ansprüche 21 bis 23, wobei die veränderte Domäne ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus V-Alpha, V-Beta, C-Alpha, C-Beta, oder einem Teil davon und die mindestens eine veränderte Strukturschleifenregion mindestens 3 Aminosäureveränderungen enthält.
25. Molekül enthaltend mindestens eine veränderte T-Zellrezeptordomäne nach einem der Ansprüche 21 bis 24 und mindestens ein anderes Bindungsmolekül, wobei das andere Bindungsmolekül ausgewählt ist aus der Gruppe von veränderten T-Zellrezeptordomänen nach einem der Ansprüche 21 bis 24, Immunglobulinen, löslichen Rezeptoren, Liganden, Nukleinsäuren, und Kohlehydraten.
26. Molekül nach einem der Ansprüche 21 bis 25, *dadurch gekennzeichnet*, dass die veränderten Schleifenregionen einer variablen Domäne mindestens eine Veränderung innerhalb der Aminosäuren 11 bis 19, Aminosäuren 43 bis 51, Aminosäuren 67 bis 80 oder Aminosäuren 90 bis 99 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäureposition der Domänen die des IMGT ist.
27. Molekül nach einem der Ansprüche 21 bis 25, *dadurch gekennzeichnet* dass die Schleifenregionen einer konstanten Domäne mindestens eine Veränderung innerhalb der Aminosäuren 9 bis 20, Aminosäuren 27 bis 36, Aminosäuren 41 bis 78, Aminosäuren 82 bis 85, Aminosäuren 90 bis 102 oder Aminosäuren 107 bis 116 umfassen, wobei die Nummerierung der Aminosäurepositionen der Domänen die des IMGT ist.

28. Nukleinsäure kodierend für einen T-Zellrezeptor nach einen der Ansprüche 21 bis 27 oder ein Teil davon.

5 **Keine Zeichnung**

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55